

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791193

研究課題名（和文）

脳室下帯特異的発現遺伝子の大脳新皮質形成における役割の解明

研究課題名（英文）

The developmental role of the SVZ-specific gene in the neocortico-genesis.

研究代表者

荒巻 道彦（ARAMAKI MICHHIKO）

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：20338099

研究成果の概要（和文）：

大脳皮質の第 1 層から第 6 層は哺乳類にのみ認められ、脳室下帯を構成する神経細胞が最終的に大脳皮質の第 1 層から第 6 層を形成する。脳室下帯に特異的に発現する遺伝子は脳室下帯における神経細胞の機能に重要な役割を果たしていると考えられる。大脳皮質を構成する各神経細胞層における神経細胞の数は厳密に制御されており、本研究の結果から脳室下帯に特異的に発現する遺伝子が神経細胞の数を決定する重要な役割を担っている可能性があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Mammalian cerebral cortex consists of six layers. In the adult brain, upper layer neurons are key components in the highly sophisticated neuronal networks. During the brain development, upper layer neurons transiently develop the neuronal layer just above the ventricular zone, which is called the subventricular zone (SVZ). In this study, we examined the developmental role of the SVZ-specific gene and found that the SVZ is the place where the number of neurons are tightly regulated through the caspase-dependent apoptotic pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：発生・分化

1. 研究開始当初の背景

近年の分子遺伝学的研究の進歩によりこれまで明らかにされていなかった発達障害や自閉症などの原因遺伝子が同定されてきている。これらの疾患は幅広い臨床症状を有しており、細かい臨床診断および分類と原因遺伝子との関連づけが重要になってきている。最近の報告によると大脳新皮質形成期における神経細胞の移動障害が発達障害や自閉症、さらにはてんかんの発症に関わっていることが示唆されている。移動障害の程度と臨床症状の重症度には相関があると考えられて

いるが、その詳細については明らかになっていない。

哺乳類の大脳新皮質形成期には、後から誕生した神経細胞が先に生まれた神経細胞を追い抜くこと(inside-out pattern)で6層構造が形成される。脳室帯で誕生した神経細胞は、法線方向へ脳室下帯まで移動する。脳室下帯に移動した神経細胞は多極性神経細胞と呼ばれる細胞へと形態を変化させる。そして多極性神経細胞となった神経細胞が脳室下帯で約 24 時間程度留まった後に、双極性神経細胞へとさらに形態を変化させて脳表面へ向かって移動を再開させる。

ヒトを含めた哺乳類の脳室下帯は、大脳新皮質形成期中期頃から形成され始めることが知られている。共通する特徴としては、脳室下帯を構成する神経細胞が最終的に大脳皮質の第 6 層から第 4 層を形成するという点である。大脳皮質の第 6 層から第 4 層は哺乳類にのみ認められる特徴的な構造で、マウスと比べてヒトでは特に著しく発達しており、ヒトでは高次脳機能を担っていると考えられている。脳室下帯に特異的に発現する遺伝子は脳室下帯のみに発現し、大脳皮質の他の領域には発現していないことから、脳室下帯における神経細胞の機能に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで今回の検討では脳室下帯特異的発現遺伝子の 1 つである、UNC-5 homolog D (Unc5D) 遺伝子に注目し、その機能解析を行った。Unc5 遺伝子は、線虫からヒトに至るまで多くの生物種で認められ、ネトリンをリガンドに持つ膜受容体蛋白質として知られている。今までの報告から Unc5 遺伝子が神経細胞成長円錐に対するネトリンの反発因子としての作用に関わっていることが知られているが、大脳皮質形成期の脳室下帯での働きについては全く明らかにされていない。そこで、脳室下帯で Unc5D を発現している多極性神経細胞の発生学的な役割を明らかにすることで、脳室下帯が形成されるに至った進化的な意義と高次機能の獲得のメカニズムを解明するための端緒が得られると考えた。Unc5 ファミリー遺伝子は、膜受容体蛋白質として細胞内へシグナルを伝達する役割の他に、リガンドとなる蛋白質が存在しない場合には細胞に apoptosis を誘導する役割があることが知られている。発生期の脳室下帯に特異的に発現する Unc5D 遺伝子にもリガンドの非存在下では細胞を apoptosis に導く役割があると考えられる。大脳皮質を構成する各神経細胞層における神経細胞の数は厳密に制御されていることから、Unc5D 遺伝子も神経細胞数を調節する役割を担っているものと思われる。実験的に Unc5D 遺伝子の発現量を増加または減少させることで生じてくる細胞・組織レベルでの変化と個体レベルでの変化の解析が高次脳機能障害の発生機序を解明する上で重要な手がかりとなり得ると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大脳皮質の発生過程における脳室下帯の役割を明らかにし、ヒトの高次脳機能獲得のメカニズムを解明するための手がかりを得ることである。大脳皮質の 6 層構造は進化の過程で、哺乳類になって初めて獲得された構造で、第 6 層から第 4 層までの細胞群は爬虫類や鳥類には認められない。また、マウスの第 6 層から第 4 層と比べてヒトの第 6 層から第 4 層は著しく増大しており、

同じ哺乳類でも 6 層構造は大きく異なっている。一方で、これら第 6 層から第 4 層の細胞群は脳室下帯と呼ばれる、大脳新皮質形成期に一時的に認められる層構造を形成する共通点がある。最近の報告によると、ヒトの脳室下帯は内側脳室下帯と外側脳室下帯に分かれて発生し、特に外側脳室下帯が著しく発達している。そして、これらの脳室下帯には神経前駆細胞が存在し、将来の第 6 層から第 4 層に分布する膨大な数の神経細胞の産生を担っていると考えられている。マウスの脳室下帯にもヒトと同様に神経前駆細胞が存在していることが報告されている。今回の研究では、哺乳類に共通して認められる脳室下帯において、それを構成する神経細胞の機能を明らかにすることでヒトが高次脳機能を獲得するに至ったメカニズムを解明したいと考え、その基礎的研究を目的とした。具体的には、脳室下帯に特異的に発現している Unc5D 遺伝子に着目し、その働きについて明らかにしようと考えた。Unc5 ファミリーに属する遺伝子は膜受容体蛋白質で、そのリガンドはネトリンであることが明らかになっている。Unc5 ファミリーの他の遺伝子の働きから推測すると、Unc5D にはリガンドが結合することで膜受容体蛋白質として細胞内へシグナルを伝達する役割とともに、リガンドの非存在下では細胞を apoptosis に導く役割もあると考えられる。これまでの報告から、脳室下帯で産生された神経細胞は大脳皮質へ細胞移動する間に、全体の約 20~30% が apoptosis によって消失すると考えられている。すなわち、脳室下帯の前駆細胞は最終的に必要な数よりも多くの神経細胞を産生し、発生過程において apoptosis を誘導することでその数を調節しているのである。大脳皮質の 6 層構造を構成する各神経細胞層は互いに混じり合うことなく、各層には決まった数の神経細胞が配列される。この層構造が乱れて神経細胞の数や移動に異常が生じた場合、特にそれがヒトの大脳皮質の第 6 層から第 4 層までの細胞群であった場合には、高次脳機能に異常をきたすであろうことは容易に予測できる。実際に、細胞移動の異常が多くの精神・神経疾患と関連があることはこれまでの論文で報告されている。

3. 研究の方法

(1) Unc5D 遺伝子の発現抑制

まず、脳室下帯に特異的に発現が認められる Unc5D 遺伝子の発現抑制実験を行った。具体的には Unc5D の発現を特異的にノックダウンする shRNA ベクターを作製し、そのプラスミドベクターを胎生 14 日目のマウスの大脳に子宮内電気穿孔法の手法を用いて導入した。ノックダウンされた細胞は同時に導入された GFP 発現ベクターによってラベルした。Unc5D の発現抑制によって神経細胞

数の増加が認められるか否かを生後7日目のマウスを用いて評価した。また、神経細胞数の変化以外の形態学的な変化の有無についても同時に検証した。

(2) Unc5D 遺伝子の過剰発現

次に、Unc5D 遺伝子の過剰発現実験を行った。Unc5D の cDNA 配列を CAG promoter の下流に挿入した pCAG-Unc5D ベクターを用いて、このベクターを胎生 14 日目のマウス大脳に子宮内電気穿孔法の手法を用いて導入した。過剰発現された細胞は同時に導入された GFP 発現ベクターによってラベルした。Unc5D の過剰発現によって神経細胞が細胞死を起こすか否かを Caspase3 の免疫染色によって評価した。

(3) Unc5D の過剰発現による他の神経細胞への影響の検討

Unc5D の過剰発現が細胞移動を開始している周囲の神経細胞にどのような影響を与えるのかを検討するために、以下の実験を行った。マウス胎生 13 日目に pCAG-mCherry を子宮内電気穿孔法によって導入し、胎生 14 日目に pCAG-Unc5D を同様の手法で導入した。そのマウスを胎生 15 日目に評価した。

4. 研究成果

(1) Unc5D 遺伝子の発現抑制

マウスの胎生 14 日目に Unc5D 遺伝子の発現抑制ベクターを導入し P7 の時点で神経細胞数の増加の有無を評価したが、明らかな増加を認めなかった。一方で、Unc5D の発現を抑制した神経細胞の移動中の先端突起の長さを測定したところ、正常対照と比較して有意な延長を認めた(図 1、図 2、図 3)。このことから、Unc5D はそのリガンドの存在下では移動中の神経細胞の形態形成に関わる機能を担っている可能性が示唆された。

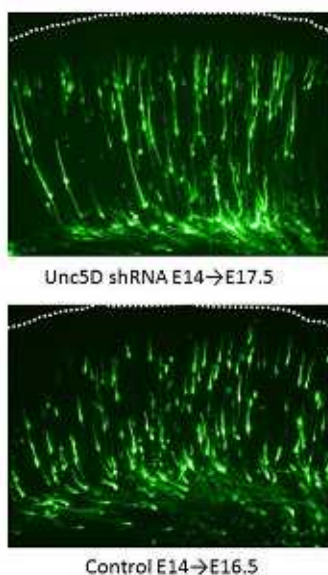


図 1

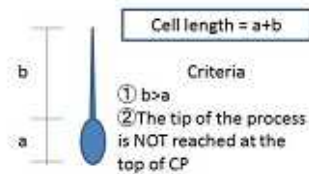


図 2

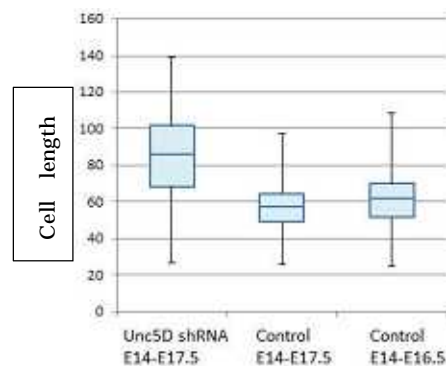


図 3

(2) Unc5D 遺伝子の過剰発現

マウスの胎生 14 日目に Unc5D 遺伝子の発現ベクターを導入して胎生 15 日目の時点で細胞死の有無について Caspase3 の免疫染色によって評価した。その結果、正常対照と比較して Unc5D の過剰発現によって有意に Caspase3 陽性細胞の数が増加した(図 4、図 5)。このことから、Unc5D はそのリガンドの非存在下では細胞死を誘導することが明らかとなった。

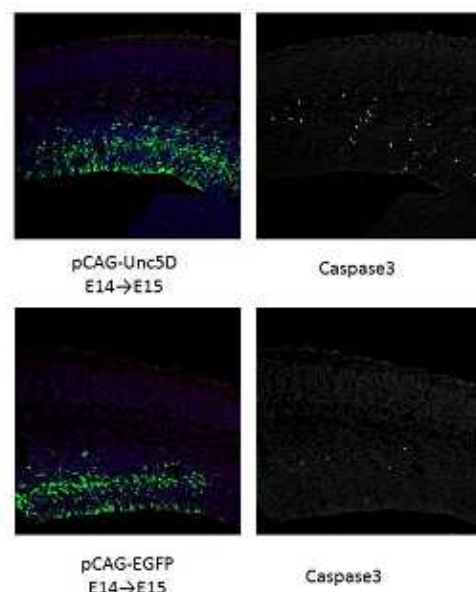


図 4

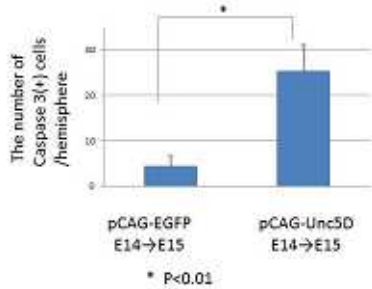


図 5

(3) Unc5D の過剰発現による他の神経細胞への影響の検討

Unc5D を過剰発現させることで、内在性のリガンドが枯渇し、そのリガンドを必要とする周囲の神経細胞へ影響を及ぼす可能性がある。我々が以前に行った検討で、Unc5D の発現は脳室下帯に認められることが分かっているが、脳室下帯には神経細胞のみならず、神経線維も走行している。特に脳室下帯から神経板へと移動を再開した神経細胞はその神経線維を脳室下帯に沿うように伸長させる。そこで、マウス胎生 13 日目に誕生した神経細胞を蛍光蛋白で標識 (mCherry) し、胎生 14 日に Unc5D の発現ベクターを導入して (GFP でラベル) から胎生 15 日目に神経細胞死の有無を Caspase3 の免疫染色によって評価した。その結果、Caspase3 は Unc5D を過剰発現させた細胞やその周囲の細胞のみならず、既に移動を再開している神経細胞においても陽性となっていることが確認された (図 6、図 7)。

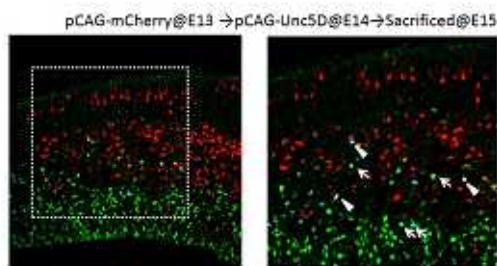
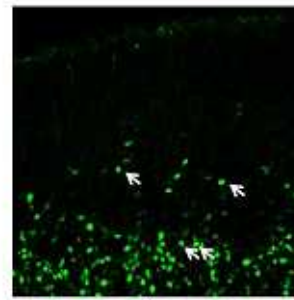
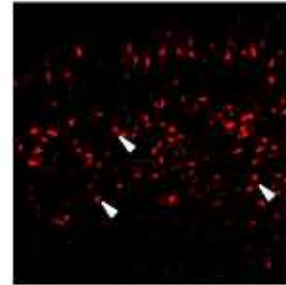


図 6



Unc5D



mCherry



Caspase3

図 7

以上の結果から、Unc5D を介した神経細胞数の制御は脳室下帯に留まっている神経細胞のみならず、皮質板へと移動を再開した神経細胞 (おそらく神経線維上に発現していると考えられる Unc5D を介して) でも行われる可能性が示唆された。

今後は、過剰な神経細胞死が個体に与える影響についても行動解析等の手法を用いて詳細に検討していく計画である。

5. 主な発表論文等

- [雑誌論文] (0 件)
- [学会発表] (0 件)
- [図書] (0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒巻 道彦 (ARAMAKI MICHIIHIKO)
 慶應義塾大学・医学部 特任助教
 研究者番号: 20338099