

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650166

研究課題名(和文) 大脳皮質で最も早く生まれるニューロン群の起源、発生様式と運命

研究課題名(英文) Origin and fate of earliest generated cortical neurons

研究代表者

村上 富士夫 (Murakami, Fujio)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：20089882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：皮質の神経細胞は一層の神経上皮(NE)から発生するが、その増殖に続き、非、又は対称分裂により神経細胞(N)又はbasal progenitor (BP)が生じ、さらにNE又はBPの対称分裂によってもNが生ずるとされている。しかし、これは胎生(E)12.5日目頃のマウスの皮質から得られた知見であり、これ以前のNの発生様式に関する知見は極めて乏しい。本研究ではE10.5に子宮内電気穿孔法でNE細胞を標識し、この問題に迫った。その結果、サブプレート細胞、皮質の全層の興奮性神経細胞が標識された。したがって、発生早期にはNEの増殖と平行してSP細胞が産生され、その後皮質の細胞が作られると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neuroepithelial cells (NEs) in mouse cortex are thought to initially self renew and then generate basal progenitor cells (BP). Neurons are then generated from either of them by symmetric or asymmetric divisions. This idea is based on observations of mouse embryos at around E12.5 and how neurons are generated at earlier stages remains largely unknown. Here we performed in utero electroporation at E10.5 and observed progeny of labeled NEs in mature brain. We found that subplate cells, cortical excitatory neurons all layers as well as astrocytes were labeled. This finding indicates that NEs generate subplate cells concomitantly with their self renewal. It also implies that these types of cells have common progenitor origins.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：大脳皮質 発生様式 興奮性神経細胞 子宮内電気穿孔

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質は6層構造を有しており、この層構造は脳室帯において時期特異的に適切な細胞が順次産生されることで構築され、脳が正常に機能する上で重要な役割を果たす。そのため層構造がいかにして構築されるかを理解することは重要である。皮質構築過程ではまずその最初期過程においてCajal-Retzius (CR) 細胞と subplate ニューロン (SPN) 細胞から構成されるPPと呼ばれる神経細胞層が構築される。つまりこれらは皮質で最初に生まれる神経細胞である。その後、皮質原基脳室帯から産生される皮質錐体細胞がPPの間へ順次侵入することで、皮質深層から浅層までの6層構造が構築されていく。従来これらの細胞群は全て皮質原基脳室帯から産生されることが予想されていたが、近年の研究から、PP構成細胞のうちCR細胞は皮質外の脳室帯から産生された後、皮質領域へと移動してくることが明らかになった。一方、SPNに関しては十分な知見がない。

2. 研究の目的

そこで本研究ではSPNが果たして皮質原基脳室帯から産生されるのか否か、また産生されるならばどのようにして脳室帯においてSPN産生から皮質錐体細胞の産生へと時間的なスイッチ機構が働いているのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

皮質原基脳室帯に存在する神経前駆細胞にベクターを導入するため、子宮内電気穿孔を胎生10.5日目の胎仔に対して行った。直径1.2mmのガラス管プレーで伸ばし、外径30-40 μm に

切りそろえ、研磨した。このガラス針に注射筒を用いてプラスミド溶液を充填した。

母マウスに10%ソムノペンチル/PBS(共立)を500 μl 投与し、麻酔が十分に効果を表した後に正中線に沿って開腹し、温PBSに浸した滅菌済ガーゼで開腹部周囲を覆い、片側の子宮を取り出してその上に載せた。次に上記のガラス針を用いてプラスミド溶液

[$\{pCAGGS-tdtomato:1\mu\text{g}/\mu\text{l}, pCAGGS-transposase:2.5\mu\text{g}/\mu\text{l}, pTo12-EGFP:1.5\mu\text{g}/\mu\text{l}\}$ または $\{pCAGGS-EGFP:1\mu\text{g}/\mu\text{l}\}$]を胎仔の側脳室に注入した。注入はインジェクター

(IM-30, Narishige)を用いて窒素ガス圧で注入した。プラスミド溶液を注入した胎仔の頭部領域を子宮越しに3mm円盤電極または1mm円盤電極(CUY650P2, Unique Medical Imada)で挟み、25V、50msの電気パルスをパルス間隔150msで5回かけることで遺伝子の導入を行った。電極を接触、固定させる位置を工夫し、皮質原基脳室帯に存在する神経前駆細胞へと遺伝子導入した。電気穿孔後、子宮を腹腔内に戻した。

本研究では皮質原基脳室帯からSPNが産生されるか否かを明らかにするため、皮質原基のみに遺伝子導入されることが非常に重要になる。胎生期初期過程(胎生11.5、12.5日目)の解析では遺伝子導入されたプラスミドベクターの蛍光が脳室帯において継続的に確認できるため、遺伝子導入箇所を明らかにすることができる。しかし胎生期後期(胎生18.5日目)の解析では、遺伝子導入するプラスミドDNAがプラスミドベクターだけでは、神経前駆細胞は分裂を経て蛍光が消えてしまい、遺伝子導入箇所が同定できなくなる。そこでプラスミドベクターに加えてpCAGGS-transposase,

pToI2-EGFPからなるトランスポゾンの系を組み込んだ。トランスポゾンの系では、transposaseによって、ToI2配列で挟まれたEGFPがゲノム上に組み込まれるため、その子孫細胞全てを標識することが出来る。本研究ではトランスポゾンを指標に遺伝子導入が皮質原基のみに行われたと考えられるサンプルにおいてのみ解析をおこなった。

これまでの研究からマウス胎生期においてSPNはマウス胎生10.5日目から12.5日目にかけて発生する(Price et al., 1997)。また胎生期初期過程においては、SPNはパイオニアニューロンとしての役割も知られており、大脳皮質において最も早く産生され成熟することで、後から産まれる皮質錐体細胞に先駆けて軸索を皮質下領域まで伸長させ、CR細胞と共にPPを構築すると考えられている(Allendoerfer and Shatz, 1994、De Carlos and O'Leary, 1992)。

本研究では、まず、SPNが新皮質原基脳室帯から産生されるか否かを解析するため、子宮内電気穿孔法を用いた。もしSPNが新皮質原基脳室帯から産生されるならば、SPNの産生開始時期である胎生10.5日目において、新皮質原基脳室帯に存在する神経前駆細胞に子宮内電気穿孔法により蛍光タンパク質を遺伝子導入する事で標識できるのではないかと考えた。

4. 研究成果

胎生10.5日目での遺伝子導入後、胎生11.5日目、12.5日目において、既に神経細胞が産生されているかどうかEGFP蛍光を指標に解析した。この遺伝子導入後短期間での解析には、遺伝子導入ベクターとして通常のプラスミドDNAをバックボーンとしたpCAGGS-EGFP

発現ベクターを用いた。胎生11.5日、12.5日において、蛍光標識された細胞は新皮質原基に相当する脳室帯に存在する神経前駆細胞およびそこから法線方向に存在する軟膜直下の細胞層に互って広く分布している様子が観察された。これらの標識細胞のうち、軟膜直下に分布する標識細胞は β -tubulin陽性であった。胎生11.5日目、12.5日目において皮質原基の軟膜直下付近に存在するこれらの標識された神経細胞はPPと考えられる神経細胞群の一部を構成していることが示唆される。この時期にPPを構成しているSPNに特異的に発現する分子マーカーは知られていない。一方、CR細胞にはリーリンが発現していることが知られている。そこでこれら標識細胞を同定するため、胎生12.5日目においてリーリンに対して免疫染色を行った(D'Arcangelo et al., 1997)。その結果、PP表層に多くのリーリン陽性細胞が観察されたが、EGFPで標識された細胞のうち、リーリンを発現しているものは観察されなかった。これらの結果から、EGFPで標識された細胞はPPの一部を構成し、CR細胞ではないことが示唆された。

次に、標識細胞が、過去にSPNの特徴として示されたパイオニアニューロンとして、皮質錐体細胞に先駆け既に軸索を皮質下領域へと伸長しているのかどうかを解析した。この解析には、神経細胞のみを標識することで軸索の伸長を容易に観察できるようにpNeuroD-Cre、pCALNL-EGFPを遺伝子導入した。今回の実験で用いられたNeuroDプロモーターによる遺伝子発現では、神経前駆細胞では発現されず、神経細胞に分化した後に発現する(Huang et al., 2000)。そのため、pNeuroD-Creは遺伝子導入された細胞が神経

細胞に分化することで初めて転写、翻訳が開始される。その後発現した Cre によって *pCALNL-EGFP* に含まれる loxP 配列で挟まれたストップコドンが取り除かれ、EGFP が発現する。このシステムを用いることで神経細胞のみを特異的に標識することができる。まずはこのシステムを用いる事で神経細胞のみを標識できるかどうかを確かめた。

III-tubulin との共発現を解析した結果、上述の *pCAGGS-EGFP* を遺伝子導入したものとは異なり、脳室帯における神経前駆細胞と考えられる III-tubulin 陰性細胞は標識されず、PP 領域に存在する III-tubulin 陽性神経細胞のみが標識されていた。標識細胞から伸張する軸索を観察したところ、過去の知見と一致して既に皮質下領域へと伸長していることが明らかになった。これらの結果から、今回胎生 10.5 日目の皮質原基脳室帯に対する遺伝子導入で標識された細胞は SPN のパイオニアニューロンの性質を獲得していることが明らかになった。

胎生期後期以降においては、SPN は細胞体位置、細胞形態、分子発現、軸索投射などの特徴が過去の研究から知られている。PP の一部を構成する SPN は皮質板へ侵入後、皮質板直下のサブプレートに分布する。我々は胎生 10.5 日目に遺伝子導入後、胎生 18.5 日目に解析した。遺伝子導入ベクターとしては、遺伝子導入時期に産生された神経細胞を標識するための *pCAGGS-tdtomato* 発現ベクタープラスミド DNA と、遺伝子導入部位を確認するための *pCAGGS-transposase* と *pTo12-EGFP* によるトランスポゾンプラスミド DNA を同時に導入した。本研究ではトランスポゾンの EGFP を指標に、新皮質原基のみに遺伝子導入が行われたと考えられるもののみを解析の対象

にした。

胎生 18.5 日目の皮質板には細胞が密に存在することが DAPI による核染色像からも確認出来た。遺伝子導入により標識された細胞の多くは皮質板よりもさらに深層のサブプレートに相当する領域に数多く分布していた。また蛍光強度の比較的弱い標識細胞は皮質板にも観察された。更に脳室帯から表層までの領域を 10 等分し、各領域に分布する標識細胞数の割合を定量したところ、約半数の標識細胞が中間帯の直上であるサブプレートに相当する領域に分布しており、残りの約半数が皮質板に亙って広く分布していた。これらの結果より標識細胞の多くはサブプレートに分布していた事が示唆される。

次に標識細胞が過去に報告されている SPN の軸索投射パターンを示しているかどうかを解析した。SPN は胎生期後期以降において視床領域へと軸索を伸張させることが知られているため、標識細胞の軸索投射パターンを解析したところ、皮質-視床投射神経線維が *tdtomato* により蛍光標識されているのが観察された。しかしながら、今回は皮質板領域にも細胞が標識されているため、これらの標識された軸索は SPN 以外の細胞から投射されている可能性も否定出来ない。

最後に分子マーカー、細胞形態に関して解析を行った。胎生 18.5 日目に SPN の一部に発現することが知られている *Nurr1* (Arimatsu et al., 2003, Hoerder-Suabedissen et al., 2008) に対して免疫染色を行ったところ、サブプレート領域においては *tdtomato* 標識細胞のうち、約 3 割の標識細胞が *Nurr1* を発現していた。またこれらサブプレート領域に分布していた標識細胞の多くは神経突起を接線方向にの

ばしており、皮質深層に分布する細胞と形態学的にも異なり、SPN の形態学的特徴を示していた。さらに皮質構築が完了した生後 21.5 日目においても同様の解析をおこなった結果、他の分子マーカーである CTGF の共発現も観察された。

以上の結果から、胎生期初期過程と同様に、胎生 10.5 日目の新皮質原基脳室帯に対する遺伝子導入により標識された細胞は胎生期後期以降においても SPN の特徴を持つことが明らかになった。つまり、少なくとも一部の SPN は新皮質原基脳室帯から産生されることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

Yan Zhu and Fujio Murakami. Chemokine CXCL12 and its receptors in the developing central nervous system: emerging themes and future perspectives. *Dev Neurobiol.* 査読有、72:1349-62, 2012

DOI:10.1002/dneu.22041

Yumiko Hatanaka, Kenta Yamauchi and Fujio Murakami. Formation of Axon-dendrite Polarity in situ: Initiation of Axons from Polarized and Non-polarized Cells Development. *Dev Growth Differ.* 査読有 54:398-407, 2012

DOI:10.1111/j.1440-169X.2012.01344.x

Naoko Inamura, Toshiya Kimura, Satoshi Tada, Takashi Kurahashi, Mitsutoshi Yanagida, Yuchio Yanagawa, Kazuhiro Ikenaka, and

Fujio Murakami. Intrinsic and Extrinsic Mechanisms Control the Termination of Cortical Interneuron Migration. *J Neurosci*, 査読有、32: 6032-6042, 2012

DOI:10.1523/JNEUROSCI.3446-11.2012

Mitsutoshi Yanagida, Ryota Miyoshi, Ryohei Toyokuni, Yan Zhu and Fujio Murakami. Migration of cortical interneurons in living mouse

embryos: Dynamics of the leading process, nucleus and the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有、109:16737-42, 2012
DOI:10.1073/pnas.1209166109
Matsui R, Tanabe Y and Watanabe D, Avian adeno-associated virus vector efficiently transduces neurons in the embryonic and post-embryonic chicken brain. *D, PloS one*, 査読有、7(11):e48730, 2012

DOI:10.1371/journal.pone.0048730

Camilla Luccardini, Laetitia Hennekinne, Lucie Viou, Mitsutoshi Yanagida, Fujio Murakami, Nicoletta Kessar, Xufei Ma, Robert S Adelstein, René-Marc Mège and Christine Métin. N-Cadherin Sustains Motility and Polarity of Future Cortical Interneurons during Tangential Migration. *J. Neurosci.* 査読有、33:18149-18160, 2013
DOI:10.1523/JNEUROSCI.0593-13.2013

Yoshiaki Kita, Koichi Kawakami, Yoshiko Takahashi and Fujio Murakami. Development of cerebellar neurons and glia revealed by in utero electroporation: Golgi-like labeling of cerebellar neurons and glia. *PloS one* 査読有、8:7.07, 2013
DOI:10.1371/journal.pone.0070091

Masaki Shinohara, Yan Zhu and Fujio Murakami. Four-dimensional analysis of nucleogenesis of the pontine nucleus in the hindbrain. *J. Comp. Neurol.* 521:3340-57, 2013
DOI:10.1002/cne.23353

Makio Torigoe, Kenta Yamauchi, Atsushi Tamada, Ikuo Matsuda, Atsu Aiba, Valérie Castellani and Fujio Murakami. Role of neuropilin-2 in the ipsilateral growth of midbrain dopaminergic axons. *Eur J Neurosci*. 査読有、37:1573-83, 2013
DOI:10.1111/ejn.12190.

Kobayashi H., Kawauchi D., Hashimoto Y., Ogata T., and Murakami F. The control of precerebellar neuron migration by RNA binding protein Csd1. *Neuroscience*, 査読有、253, 292-303. 2013

DOI:10.1016/j.neuroscience.2013.08.

055.

〔学会発表〕(計 10 件)

山内健太、山崎真弥、崎村建司、梅林真由、村上富士夫、ネトリン1欠損マウスにおける後脳交連軸索の末梢への伸長、第35回日本神経科学大会、2012.9.18、名古屋国際会議場

鳥越万紀夫、山内健太、玉田篤史、松田育雄、餐場篤、村上富士夫、中脳ドーパミン作動性ニューロン軸索の非交差性投射におけるニューロピリン2の役割、第35回日本神経科学大会、2012.9.18、名古屋国際会議場

喜多善亮、村上富士夫、小脳脳室帯・菱脳唇由来細胞の分布パターン、第35回日本神経科学大会、2012.9.20、名古屋国際会議場

鳥越万紀夫、城崎航希、村上富士夫、前脳基底部における標識細胞群から生じる皮質抑制性介在ニューロンの多様性、第36回日本神経科学大会、2013.6.21、国立京都国際会館

片山悠司、萩本和也、村上富士夫、田辺康人、新皮質を構成するサブプレートニューロンの発生起源・分布・運命、第36回日本神経科学大会、2013.6.21、国立京都国際会館

〔その他〕

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/murakami-lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上富士夫 (MURAKAMI FUJIO)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：20089882

(2) 研究分担者

無し

(3) 連帯研究者

無し