

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700323

研究課題名(和文)皮質脊髄路と橋核での誘導型遺伝子発現制御技術を利用した軸索側枝形成機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the axon collateral branch formation mechanism using an inducible gene expression technique in corticospinal tract and pontine nuclei

研究代表者

猪口 徳一 (Iguchi, Tokuichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60509305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)： 大脳皮質からの主要な出力路である錐体路(皮質脊髄路)は主軸索より複数の神経核に軸索側枝を伸ばし、脳神経活動の協調性を可能としているが、側枝形成機構については不明である。我々は軸索側枝形成に關与する分子を得るためにマイクロアレイ解析を行い、側枝形成時期の側枝標的領域で発現の高い分子を得るとともに、候補因子に対する受容体についてリストを作成し、錐体路で網羅的にノックダウンを行い、側枝形成の阻害、若しくは促進効果を示す受容体を得た。さらに、候補因子を解析するために、橋核及び皮質脊髄路起始細胞への遺伝子導入法および、微小管プラスチン結合蛋白質を用いて微小管伸長端の動態を観察する実験系を確立した。

研究成果の概要(英文)： Corticospinal tract is a major subcortical output from the neocortex. During the development of corticospinal tract, axon collaterals protrude from their main shaft toward the various nuclei. Axon collaterals are thought to have an important role in the coordination of neural activities. However, molecular mechanisms by which axon collaterals are induced are mostly unknown. To obtain the molecules responsible for the induction of axon collaterals, we performed microarray analyses on the target of axon collaterals, and got some candidates. We also obtained the candidates of the receptor that responds to the signals from the target of axon collaterals. Knockdown of some candidate receptors in the corticospinal neurons showed inhibition or promotion of axon collateralization. To analyze the candidate molecules, we developed the analysis method enabling us manipulation of the gene expression and observation of the microtubule dynamics in the corticospinal tract and the pons.

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：神経科学 解剖学 発生・分化 神経回路 軸索側枝

1. 研究開始当初の背景

錐体路(皮質脊髄路)は高等動物における大脳皮質からの主要な出力路である。錐体路は大脳皮質第5層の神経細胞から伸長し、内包を通り、脊髄へと投射する(右図)。その主軸索からは、上丘、赤核、橋核、下オリーブ等に向かい側枝が形成され、その後、運動野、視覚野ごとに異なるパターンの軸索・側枝の退縮が起こり錐体路が完成する(O'Leary and Terashima, *Neuron*, 1988)。このような側枝形成を介する神経回路網は脳機能の調節や修飾など、脳の高次機能に重要な役割を担っている。側枝形成の研究は1980年代より、Dil 色素等のトレーサーによって詳細に行われ、その形態学的・解剖学的な理解は進んでいるが、実際の脳内で側枝形成が誘導される分子実態についての報告は驚くほど少ない。軸索からの側枝形成は培養神経細胞の実験で、いわゆる"branching"になぞらえて様々な関連分子が取り上げられることもあるが、錐体路での遺伝子制御が技術的に困難であり、それら分子の働きを実際の脳内で解析出来ないことが解明の進んでいない理由と思われる。

微小管はチューブリンの重合によって構築される細胞骨格であり、神経細胞の軸索伸長に必要不可欠な分子である。軸索が枝分かれする時、その内部では微小管切断分子によって短いフリーな微小管が産生されていることが細胞培養実験で報告されている(Conde and Cáceres, *Nat Rev Neurosci*, 2009)。ごく最近、神経栄養因子BDNFが微小管不安定化因子であるstathminを活性化することで軸索の枝分かれを誘導すること(Jeanneteau et al., *Nat Neurosci*, 2010)や、bFGFが微小管切断分子spastinによる微小管の切断活性の増加と軸索の枝分かれを促進すること(Qiang et al., *Mol Biol Cell*, 2010)が培養神経細胞を用いた実験で報告されている。以上の事実より、脳内錐体路においても軸索外からの刺激が微小管の切断や安定性を変化させることで軸索の枝分かれを制御している可能性が高いと考えられる。

脳内錐体路において軸索側枝を誘導する分子の実態は明らかになっていないものの、現在までに様々な検討がなされてきた。コラーゲンゲル内で大脳皮質と橋組織を共培養すると大脳皮質より進展した軸索の途中から、橋組織に向かって軸索側枝が誘導されることが報告されている(Sato et al., *Neuron*, 1994)。一方、橋核神経細胞は発生時に菱脳唇尾側領域で生まれ、腹側の橋核予定領域へと移動してくるが、その遊走が阻害されると、異所性に細胞クラスターをつくり、そこに向かって皮質脊髄路より側枝が形成されることが報告されている(Zhu et al., *Development*, 2009)。これらの知見は側枝形成を誘導する拡散性因子が橋組織より分泌されていることを示している。

2. 研究の目的

大脳皮質からの主要な出力路である錐体路は長く伸びた主軸索より複数の神経核に「軸索側枝」を伸ばす。「軸索側枝」は高度な脳の働きに必要な神経活動の協調性を実現する重要な機構であり、また、神経傷害領域への代償機構としての役割も担う。しかしながら、生体内において軸索側枝形成の制御機構はほとんど分かっていない。本研究の目的は、ヒトで高度な進化が見られ、大脳と小脳の協調的な神経活動を担う橋核への側枝形成をモデルに研究を進め、「皮質脊髄路軸索側枝形成に参与する分子の同定および軸索内細胞骨格動態の解析を通じて、軸索側枝形成機構を明らかにする」ことである。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレイ解析による側枝形成関連分子の探索

大脳と小脳の連絡に重要な役割を果たす橋核へと伸びる側枝に着目し、橋核から分泌されると考えられる側枝誘導因子を同定することを目的に、胎生17.5日から生後2週間までの発生段階ごとの橋核での遺伝子発現変化と橋核を含む側枝形成時期の脳領域(嗅球・橋核・上丘・小脳)での遺伝子発現情報をマイクロアレイを用いて解析し側枝形成に参与する候補分子を得る。

上記解析により得られた側枝形成関連候補分子(側枝形成時期の橋核で強く発現する分子)に加えて、文献データより同様に橋核で側枝形成時期に発現の高い分子、さらに、公共アレイデータより橋核発生異常マウスで発現の減少する分子(いずれも細胞外分子)をリガンド候補とし、それに対応する受容体のリストを作成する。その中で、特に皮質脊髄路神経細胞で発現の高いものを受容体候補分子として選択する。

(2) 脳内での候補遺伝子発現操作による皮質脊髄路側枝形成関連分子の同定

アレイ解析で得られた側枝形成誘導候補因子および候補受容体に対して実際の脳内において機能解析を行う。マウスでは錐体路軸索の起始細胞は胎生12日前後の大脳皮質脳室下帯で生まれ、法線方向に遊走し大脳皮質V層を作る。一方、橋核神経細胞も時期を同じくして、菱脳唇尾側領域から腹側橋核形成領域へと移動を始める。そこで、胎生12.5日目の脳室下帯、もしくは菱脳唇尾側へ子宮内電気穿孔法によって遺伝子導入することで、錐体路と橋核での候補分子の発現操作を行う。生後2日目に主軸索から橋核へ投射する軸索側枝の伸長度を数値化し評価することで実際に生体内において側枝形成に参与する分子を同定する。

(3)神経細胞軸索内の微小管動態解析手法の確立

神経細胞において、軸索がダイナミックに変動するとき（枝分かれや回路のつながり替え）には、その軸索内の微小管も、切断や伸長など大きく変動することが報告されており、微小管の安定制御や切断活性を持つ分子の関与が示唆されている。我々はこれまでの研究成果として、皮質脊髄路起始細胞が生まれる胎生 12.5 日の大脳皮質脳室帯に子宮内電気穿孔法で遺伝子を導入することで、皮質脊髄路神経細胞での遺伝子操作を可能とした。さらに、染色体組み込み型の遺伝子発現誘導手法を組み合わせることで、軸索側枝形成期や、成体脳内など、長期にわたって任意の時期に遺伝子操作を行うことが可能となった (Iguchi T, et al. *PLoS ONE*, 2012)。そこで、これらの手法を利用して、我々が見出した側枝誘導候補因子が微小管の安定性や切断に与える影響を調べるため微小管先端結合因子に蛍光蛋白質を融合したプローブを作成し、皮質脊髄路神経細胞軸索内の微小管動態解析手法を確立する。

4. 研究成果

(1)マイクロアレイ解析により側枝形成関連分子及び候補受容体を探索した

遺伝子発現プロファイル解析ツールであるマイクロアレイを用いて皮質脊髄路軸索側枝形成を誘導する分子の探索と解析をおこなった。具体的には、胎生 17.5 日、生後 1 日、5 日、14 日の橋核組織より mRNA を調製し発生段階ごとの橋核での遺伝子発現変化を解析した。また、橋核を含む側枝形成時期の脳領域（嗅球・橋核・上丘・小脳）での遺伝子発現プロファイルについても同様に解析した。その中で、橋核へ軸索側枝が伸び始める胎生 17.5 日目で発現が高く、なお且つ橋核で発現が高い分子を抽出した。さらに、細胞外に局在する分子に絞り込むことで、マウス 28868 遺伝子のうち 75 遺伝子（分泌タンパク質 24、膜タンパク質 27、機能未知 24）の候補分子を見出した。これら候補分子について RT-PCR 法、in situ hybridization 法を行いその発現様式をさらに詳細に解析したところ、実際に 6 つの遺伝子が軸索側枝標的脳領域に強く発現が認められた。

上記解析により得られた側枝形成関連候補分子、文献データより同様に橋核で側枝形成時期に発現の高い分子、公共アレイデータより橋核発生異常マウスで発現の減少する分子をリガンド候補とし、それに対応する受容体のリストを作成した。Allen brain atlas 及び公共アレイデータを参考に実際に皮質脊髄路起始細胞に発現している分子を抽出し、101 の遺伝子を受容体候補分子として得

た。

(2)脳内で候補遺伝子の発現操作により皮質脊髄路側枝形成に影響を与える分子を得た

上記マイクロアレイ解析で得られた候補分子に関して発現ベクターにクローニングし、またドミナントネガティブフォームとして機能するコンストラクトを作成し、橋核での過剰発現、もしくはロックダウン実験を行い、皮質脊髄路の回路形成・側枝形成に及ぼす影響を調べた。候補分子の一つは細胞外領域を阻害分子として発現させると、軸索側枝形成を阻害する傾向がみられた。

また、受容体候補因子に関して、皮質脊髄路起始細胞で網羅的にロックダウンを行い、側枝形成に対する影響を調べた結果、側枝形成が阻害された 10 受容体、促進された 4 受容体を得た。ロックダウンによって側枝形成が阻害された受容体には、軸索誘導因子、接着因子に対する受容体や、機能未知のもの等が含まれ、中でも橋核でリガンドの発現が確認されている受容体は側枝形成誘導に関与している可能性が高いと考えられた。また、皮質下に投射する 5 層神経細胞は運動野、体性感覚野、視覚野といった領野ごとに特異的な側枝形成と側枝の刈り込み現象によって独自の神経回路を形成することが知られている。ロックダウンによって側枝形成が促進された受容体の中には大脳皮質領野特異的な発現様式を示すものが含まれており、領野特異的な軸索側枝の刈り込みや投射パターン制御への関与が示唆された。

(3)微小管プラス端結合因子を用いて皮質脊髄路軸索内の微小管動態解析手法を確立した

側枝形成領域において皮質脊髄路軸索内の細胞骨格の動態を調べることを目的に、微小管の伸長や切断をリアルタイムに観察可能な微小管プラス端結合蛋白質 EB3 に EGFP を融合した発現ベクターを作成した。軸索内では微小管のプラス端は軸索伸長方向に向いており、EB3 はそのプラス端特異的に結合するため、蛍光蛋白質である EGFP を融合させた蛋白質は軸索側枝の伸長端に集まることが予想される。実際に、このベクターを子宮内電気穿孔法で皮質脊髄路の起始細胞である大脳皮質 5 層神経細胞に導入し、初代細胞培養を行い、共焦点顕微鏡で高速タイムラプス撮影することで微小管伸長端の動態をリアルタイムに観察することに成功した。この手法を用いることで、候補因子を作用させたときの微小管の切断 (EB3-EGFP でラベルされた微小管プラス端の増減) や伸長 (EB3-EGFP の移動速度の変化) を評価することが可能となった。

本研究結果により、生体内でのアッセイに基づき、今までほとんど不明であった、側枝形成への関与が示唆される分子および受容体を新たに得ることが出来たこと、さらには皮質脊髄路神経細胞軸索内での微小管の動態を解析する手法を確立したことは、軸索側枝形成におけるシグナル機構を解く上で非常に意義深い。

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 2件)

1. Komada, M., Iguchi, T., Takeda, T., Ishibashi, M., Sato, M. Smoothed controls cyclin D2 expression and regulates the generation of intermediate progenitors in the developing cortex. *Neurosci Lett.* 547:87-91. (2013) (査読有). 猪口 (Iguchi, T)を含む2名は筆頭著者扱い
2. Xie, MJ., Yagi, H., Kuroda, K., Wang, CC., Komada, M., Zhao, H., Sakakibara, A., Miyata, T., Nagata, K., Oka, Y., Iguchi, T., Sato, M. WAVE2-Abi2 complex controls growth cone activity and regulates the multipolar-bipolar transition as well as the initiation of glia-guided migration. *Cereb Cortex.* 23(6):1410-23. (2013) (査読有).

[学会発表](計 2件)

1. Iguchi T, Omi M, Oka Y, Sato M. Search and analysis of the candidate molecules involved in axon collateralization in the corticospinal tract. Neuro2013, (2013) June.
2. Iguchi T, Oka Y, Kuroda K, Wang CC, Xie MJ, Yagi H, Sato M. Analyses on the potential candidates of collateral branch inducing factor that are specifically expressed in the targets of axon collaterals from the corticospinal projection. JSN-APSN 2012 神戸, (2012) Sept.

[図書](計 1件)

猪口徳一、佐藤 真、脳科学辞典編集委員会
「翼板」脳科学辞典(2013)
<http://bsd.neuroinf.jp/wiki/翼板>

[その他]

ホームページ等
<http://www.anat2.med.osaka-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

猪口 徳一 (IGUCHI TOKUICHI)
大阪大学大学院・医学系研究科・助教
研究者番号：60509305