

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430046

研究課題名(和文) 遅生まれ皮質神経細胞が脳梁への軸索を確立するための分子機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism for establishment of the callosal axons from late born cortical neurons

研究代表者

田畑 秀典 (Tabata, Hidenori)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・神経制御学部・室長

研究者番号：80301761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類大脳皮質神経細胞は脳室帯(VZ)に直接由来するものと、脳室下帯(SVZ)での二次的な分裂を経て産生されるものがある。前者はSVZ下部に集積して多極性細胞の形態をとり、約24時間停留した後、脳の内側へと軸索を伸ばし、やがて脳梁の線維となる。SVZでさらに分裂する集団は前者のような集積は形成せず、SVZ内に広く分散する。本研究課題ではこれら2つの集団は異なる線維連絡を確立する可能性を考え、両者の産生バランスに関わる遺伝子の候補を得た。その内の1つは強制発現させるとSVZ分裂細胞の増加が観察され、その内在性タンパク質はSVZ分裂細胞そのものに発現することが示された。

研究成果の概要(英文)：In mammals, the cortical neurons are produced either directly from the neural stem cells in the VZ or secondary proliferative cells in the SVZ. We have previously reported that these two populations undergo distinct migratory behaviors in the late cortical plate development. The former accumulated in the lower SVZ, and then extended callosal axons medially. On the other hand, the latter did not accumulate as seen in the former, but spread widely in the SVZ. In this research project, we hypothesized that these two populations establish distinct axonal connectivity, especially regarding callosal axons. We identified a key gene regulating the production of SVZ-proliferative cells. Overexpression of this molecule enhanced the production of SVZ-proliferative cells. Immunohistochemical analysis revealed that it was expressed in the SVZ-proliferative cells themselves. The further observations how the overexpression of this molecule alter the neural networks are needed.

研究分野：神経発生学

キーワード：神経回路形成 神経発生 大脳皮質 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

哺乳類大脳皮質神経細胞は脳室帯 (VZ) あるいは脳室下帯 (SVZ) で誕生し、脳表面側へと移動する。我々は、皮質形成後期過程において、VZ で最終分裂を終えた皮質神経細胞は、多極性細胞の形態をとって SVZ 下部に約 24 時間留まり、その後、双極性細胞へと変化して皮質板 (CP) へと侵入することを観察した。多極性細胞が留まる SVZ 下部を多極性細胞蓄積帯 (MAZ) と呼ぶ。一方、VZ 離脱後もさらに分裂する集団は、MAZ に特異的に留まることなく中間帯 (IZ) に広く分布することを観察し報告した。前者の集団を SEP (slowly exiting population)、後者を REP (rapidly exiting population) と呼ぶ。SEP は MAZ から移動を再開する時期に軸索を内側へと伸ばし、この場所に脳梁の線維を作る。このことから、SEP と REP はそれぞれ異なる線維連絡を持つ神経細胞へと分化する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題では、SEP と REP を区別してラベルし、その線維連絡を特に脳梁線維と連合線維との違いに注目して観察すること、さらには SEP が脳梁線維を形成する分子機構を解明し、これが REP でも機能して脳梁線維形成に加わるのか、あるいは REP はこうした分子機構を持たず、連合線維等、別の線維連絡を形成する分子機構を有するのかを明らかにすることを目的として研究を開始した。SEP と REP を区別してラベルする方法を検討したが、これらを完全に区別して系譜解析することは困難であった。そこで、SEP と REP の産生比を調節する分子の同定を試み、これを操作した際にどのような線維連絡を持つ神経細胞が増加、減少するのかを検討することとした。

3. 研究の方法

我々は、発生過程マウス大脳皮質においては REP/SEP の産生比は脳外側では高く、内側では低いことを観察していた。これはマウスの領野によって、これらの産生比が厳密にコントロールされていることを示す。その分子実体を解明するため、両者の発現プロファイルの違いを比較検討した。具体的には GFP 発現ベクターを外側、および内側皮質 VZ に子宮内電気穿孔法により導入し、18 時間後 (REP と SEP が分かれる時期) に細胞を分散し、FACS により GFP 陽性細胞を採取した。このサンプルからマイクロアレイによりトランスクリプトーム解析を行い、内側、または外側に偏って発現する分子を同定した。候補となった分子はさらに *in situ hybridization* 法により内側-外側の発現勾配が確認されるものを選択した。これらの候補分子はさらに発現ベクターを作り、子宮内電気穿孔法により、機能解析を行い、REP/SEP 産生比に変化が生じるものをさらに選択した。

4. 研究成果

進化過程において、ヒトは巨大脳を獲得したが、その主要な要因は SVZ 分裂細胞の圧倒的な増加であり、これにより単位 VZ 面積当たりの神経細胞産生の飛躍的増加を可能にしている。本研究課題の REP とはまさに SVZ 分裂細胞であることから、候補分子と進化との関連が注目される。上記スクリーニングで *in situ hybridization* により内側-外側に発現勾配が認められた遺伝子は 38 種あり、これらの進化解析を慶應義塾大学理工学部の榎原教授との共同研究によりゲノム科学的に進めた。ほ乳類全般と霊長類内での淘汰圧を比較したところ、霊長類において *Megf11* と *Dmrt3* が正の選択を受け、*Ntrk2*、*Pmp22*、*Jag1* が負の選択 (よりアミノ酸配列が保存される方向の選択) を受けたことが示された (*Frontiers in Neuroanatomy*, Tabata et al.). 特に *Jag1* は Notch 受容体の直接のリガンドであり、*Megf11* は Notch 受容体と相互作用することが示されており、霊長類脳進化と Notch シグナルとの関連が示唆される。38 個の候補遺伝子のうち発生学的重要と考えられる 10 個に関してはさらに発現ベクターを作成し、これを子宮内電気穿孔法により導入し、REP 産生能への影響を解析した。その結果、2 つは REP 産生を負に、1 つは正に制御する因子であることが示された。正に制御する因子は *Jag1* であり、これを強制発現させると VZ からの離脱が促進され、SVZ に移動した導入細胞において、分裂細胞のマーカーである *Sox2* の陽性率が対照群と比較して有意に増加していた。SVZ には 1 回だけ分裂して 2 つの神経細胞を生み出す secondary proliferative cell と、長い上行性突起を保持したまま SVZ に移行し、上下に非対称分裂して、この突起を受け継いだものはさらに同様の分裂を繰り返しながら、神経細胞を産生する basal radial glia (bRG) あるいは outer SVZ radial glia-like (oRG) と呼ばれる神経幹細胞が存在する。霊長類では後者のタイプの神経幹細胞が SVZ 内に増加しており、これにより SVZ が肥大化し、巨大脳獲得につながったと考えられている。本来、マウス胎仔脳の SVZ 分裂はほとんどが secondary proliferative cell であるが、*Jag1* を強制発現させた場合のタイムラプス観察では、bRG として非対称分裂を起こす神経幹細胞が頻繁に認められた。*Jag1* は、細胞膜に固定された分子であることから、抗体染色においては、*Jag1* 陽性細胞の輪郭が可視化され、細胞形態を観察することができる。マウスにおける抗体染色の結果、*Jag1* 陽性細胞は VZ 内においてはスクリーニングの戦略と一致して、内側-外側の発現勾配が確認され、SVZ 内ではまばらに陽性細胞が観察された。SVZ 陽性細胞には長い上行性突起を持つ bRG の特徴的な単極性形態が観察され、またこれらは神経幹細胞のマーカーである *Pax6* に陽性であり、

Jag1 は bRG そのものに発現していることが確認された。興味深いことに、皮質外側端から伸びる pallial-subpallial boundary (PSB) においては、特に強い発現が観察され、この部位においては Jag1 陽性細胞から伸びる突起が束状に束になって存在していた。マウス的大脑皮質は外側においては側脳室に面しない部分にまで張り出しており、これらの皮質神経細胞は SVZ での分裂により補われており、マウスの PSB は霊長類の SVZ に類似の構造であると考えられる。次に同じ抗体により霊長類胎仔脳での発現を検討した。サンプルとしては新世界猿の一種であるマーモセットの胎生 91 日目の切片を用いた。この時期は皮質神経細胞産生の後期であり、マウスの胎生 16 日目付近に相当する。この時期に霊長類胎仔では SVZ が著しく発達し、SVZ 内には高密度に bRG が存在する。Jag1 の染色はマウスとは異なり、VZ 内には内側-外側の発現勾配は認められず、また SVZ 内にはマウスよりも密に強い発現が観察された。SVZ 内ではマウスと同様に陽性細胞の上行性突起がラベルされ、これらの細胞は Pax6 陽性であった。従って、霊長類においても Jag1 は bRG そのものに発現することが示された。bRG は霊長類では高密度に、マウスではまばらに存在することが知られるが、他のほ乳類ではその中間的な組織像が観察される。そのような例としてフェレットの生後 6 日目(皮質形成後期)の脳切片に関しても観察したところ、Jag1 陽性細胞は、陰性の領域に隔てられながら放射方向に束を形成しており、やはりこれらは Pax6 陽性であった。Jag1 は細胞膜に固定された Notch 受容体のリガンドであり、隣接した細胞に対してシグナルを伝えると考えられる。霊長類胎仔では bRG が密集することにより互いに Jag1 シグナルを出し合い、さらに未分化性を維持して増幅し、さらに Jag1 のシグナルを受けやすい状態になっていくと考えられる。フェレットは束状に集まることで互いに Jag1 シグナルを受けやすくなっている。一方、マウスにおいてはまばらにしか bRG が存在せず、Jag1 陽性細胞が増幅できずに早期に分化過程に入るものと思われる。このような種間の比較を通じて、我々は Jag1 の発現強度が霊長類ではマウスよりも非常に高いことに気付いた。そこで、ヒトおよびマウスの BAC クローンから Jag1 の転写開始点上流および下流 5kbp の領域を単離し、Jag1 開始コドンの部分から Luciferase 遺伝子に置き換えたコンストラクトを作成し、これを子宮内電気穿孔法によりマウス胎仔脳へ導入してその転写活性を測定した。その結果、確かにヒトとマウスではヒトの配列の方が転写活性が高いことが示された。このような違いにより、霊長類では Jag1 は SVZ においても高い発現が維持され、Notch シグナルを互いに受けやすい状況が作られ、さらに bRG が増加して SVZ が肥大化すると考えられた。

線維連絡形成との関連では、ヒトでは同一半球内を結ぶ連合線維が著しく発達しており、bRG の増加と対応しているように見える。bRG(REP)が主に連合線維を形成し、SEP が主に脳梁軸索を形成するという仮説が正しいかを検証する一つの方法として、今回見つかった Jag1 の強制発現により bRG(REP)を増加させ、線維連絡が連合線維形成に偏るかを見ることが考えられる。しかし、マウスに子宮内電気穿孔法により Jag1 発現ベクターを導入しても、SVZ 内での導入細胞の密度は低く、SVZ に侵入すると、早期に分化過程に入ってしまうことが問題であった。現在、ヒト転写調節領域の制御下で Jag1 cDNA を発現するトランスジェニックマウスの解析を進めており、このマウスで REP 相当細胞が増加し、SVZ が肥大化するか、脳梁線維/連合線維の形成は変化するのかを今後さらに確認する必要がある。また、REP 特異的な細胞系譜解析法もゲノム編集の応用により開発を進めており、これらのツール開発の完成が、最終的に REP/SEP の線維連絡の特異性の解明に必要である。

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 17 件)

1. Goto, M., Mizuno, M., Matsumoto, A., Yang, Z., Jimbo, E.F., Tabata, H., Yamagata, T., Nagata, K.-I. (2017) Role of a circadian-relevant gene NR1D1 in brain development: possible involvement in the pathophysiology of autism spectrum disorders. *Sci Rep.* 1-12.

2. Inoue M, Iwai R, Tabata H, Konno D, Komabayashi-Suzuki M, Watanabe C, Iwanari H, Mochizuki Y, Hamakubo T, Matsuzaki F, Nagata K-I, Mizutani K-I (2017) Prdm16 is crucial for progression of the multipolar phase during neural differentiation of the developing neocortex. *Development* 144: 385-399, 2017.

3. Hidenori Tabata and Koh-ichi Nagata (2016) Decoding the molecular mechanisms of neuronal migration using in utero electroporation., *Med Mol Morphol.* 49:63-75.

4. Hamada, N., Negishi, Y., Mizuno, M., Miya, F., Hattori, A., Okamoto, N., Kato, M., Tsunoda, T., Yamasaki, M., Kanemura, Y., Kosaki, K., Tabata, H., Saitoh, S., Nagata, K.-I. (2016) Role of a heterotrimeric G-protein, Gi2, in the corticogenesis: possible involvement in periventricular nodular heterotopia and

intellectual disability. *J. Neurochem.* 140, 82-95.

5. Hamada N, Ito H, Nishijo T, Iwamoto I, Morishita R, Tabata H, Momiyama T, Nagata K-I (2016) Essential role of the nuclear isoform of RBFox1, a candidate gene for autism spectrum disorders, in the brain development. *Sci Rep* 6:30805.

6. Inaguma Y, Ito H, Iwamoto I, Matsumoto A, Yamagata T, Tabata H, Nagata K-I (2016) Morphological characterization of Class III phosphoinositide 3-kinase during mouse brain development. *Med Mol Morphol* 49:28-33.

7. Hidenori Tabata (2015) Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Front. Neurosci.*, 9, 114.

8. Hamada N, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Tabata H, Nagata K-I (2015) Role of the cytoplasmic isoform of RBFox1/A2BP1 in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. *Molecular Autism* 6:56.

9. Kanatani S, Honda T, Aramaki M, Hayashi K, Kubo K-I, Ishida M, Tanaka DH, Kawauchi T, Sekine K, Kusuzawa S, Kawasaki T, Hirata T, Tabata H, Uhlén P, Nakajima K (2015) The COUP-TFII/Neuropilin-2 is a molecular switch steering diencephalon-derived GABAergic neurons in the developing mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:E4985-94.

10. Hashimoto H, Yuasa S, Tabata H, Tohyama S, Seki T, Egashira T, Hayashiji N, Hattori F, Kusumoto D, Kunitomi A, Takei M, Kashimura S, Yozu G, Shimojima M, Motoda C, Muraoka N, Nakajima K, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Fukuda K (2015) Analysis of cardiomyocyte movement in the developing murine heart. *Biochem Biophys Res Commun* 464:1000-1007.

11. Yutaka Inaguma, Hidenori Ito, Akira Hara, Ikuko Iwamoto, Ayumi Matsumoto, Takanori Yamagata, Hidenori Tabata, and Koh-ichi Nagata (2015) Morphological characterization of mammalian Timeless in the mouse brain development. *Neurosci. Res.*, 92, 21-28.

12. Makoto Mizuno, Ayumi Matsumoto, Nanako Hamada, Hidenori Ito, Akihiko Miyauchi, Eriko F Jimbo, Mariko Y Momoi, Hidenori

Tabata, Takanori Yamagata, and Koh-ichi Nagata (2015) Role of an adaptor protein Lin-7B in brain development: possible involvement in autism spectrum disorders. *J. Neurochem.*, 132(1), 61-69.

13. Hisayuki Hashimoto, Shinsuke Yuasa, Hidenori Tabata, Shugo Tohyama, Nozomi Hayashiji, Fumiyuki Hattori, Naoto Muraoka, Toru Egashira, Shinichiro Okata, Kojiro Yae, Tomohisa Seki, Takahiko Nishiyama, Kazunori Nakajima, Asako Sakaue-Sawano, Atsushi Miyawaki, and Keiichi Fukuda (2014) Time-lapse imaging of cell cycle dynamics during development in living cardiomyocyte. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 72, 241-249.

14. Yutaka Inaguma, Nanako Hamada, Hidenori Tabata, Ikuko Iwamoto, Makoto Mizuno, Yoshiaki Nishimura, Hidenori Ito, Rika Morishita, Motomasa Suzuki, Kinji Ohno, Toshiyuki Kumagai & Koh-ichi Nagata (2014) SIL1, a causative cochaperone gene of Marinesco-Sjogren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. *EMBO Mol. Med.*, 6(3), 414-429.

15. Hidenori Ito, Rika Morishita, Hidenori Tabata, and Koh-ichi Nagata (2014) Roles of Rho small GTPases in the tangentially migrating neurons. *Histol. Histopathol.*, 29(7), 871-879.

16. Hidenori Tabata, Hachiya Tsuyoshi, Koh-ichi Nagata, Yasubumi Sakakibara, and Kazunori Nakajima (2013) Screening for candidate genes involved in the production of mouse subventricular zone proliferative cells and an estimation of their changes in evolutionary pressure during primate evolution. *Front. Neuroanat.*, 7, article24. (H.Tabata and H.Hachiya are co-first authors, H.Tabata and K.Nakajima are corresponding authors)

17. Nanako Hamada, Hidenori Ito, Ikuko Iwamoto, Makoto Mizuno, Rika Morishita, Yutaka Inaguma, Sachiyo Kawamoto, Hidenori Tabata, and Koh-ichi Nagata (2013) Biochemical and morphological characterization of A2BP1 in neuronal tissue. *J. Neurosci. Res.*, 91(10), 1303-1311.

〔学会発表〕(計 15 件)

田畑秀典：大脳皮質発生過程における二次的神経細胞産生部位としての脳室下帯の成り立ちと脳進化との関連。日本分子生物

学会年会(フォーラム)(横浜)2016.12.1.

田畑秀典、佐々木恵、稲熊裕、伊東秀記、竹林浩秀、依馬正次、池中一裕、永田浩一、仲嶋一範: グリア前駆細胞の移動様式と血管との関連、シンポジウム: “形作りのダイナミクスとその制御機構の探索 ~ 新たな発生原理の解明を目指して” 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、ビッグパレットふくしま、郡山(福島県) 2016年3月28-30日

田畑秀典、佐々木恵、稲熊裕、伊東秀記、竹林浩秀、依馬正次、池中一裕、永田浩一、仲嶋一範: Erratic migration: a unique migratory behavior of astrocyte progenitors, 第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学学会大会、福岡国際会議場、福岡(福岡県)、2016年9月8-10日

Hidenori Tabata, Tsuyoshi Hachiya, Koh-ichi Nagata, Yasubumi Sakakibara, Kazunori Nakajima: Functional screening of the candidate genes involved in the expansion of the subventricular zone in primates using mouse embryos. (poster) 大脳新皮質構築終了国際シンポジウム「Neocortical Organization III」、東京、2016年2月11-12日

田畑秀典、佐々木恵、稲熊裕、伊東秀記、竹林浩秀、依馬正次、池中一裕、永田浩一、仲嶋一範: 皮質脳室帯由来グリア前駆細胞のダイナミックな移動様式、ワークショップ: “細胞のふるまいの制御から解き明かす大脳皮質形成機構” 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会(BMB2015)、神戸ポートアイランド、神戸(兵庫県) 2015年12月1-4日

Hidenori Tabata, Megumi Sasaki, Yutaka Inaguma, Hidenori Ito, Hirohide Takebayashi, Masatsugu Ema, Kazuhiro Ikenaka, Koh-ichi Nagata, and Kazunori Nakajima: Interaction between glia and blood vessels during cortical development, シンポジウム: “The ins and outs of neuro-vascular interactions” 第58回日本神経化学学会大会、大宮ソニックシティ、大宮(埼玉県) 2015年9月11-13日

Hidenori Tabata, Megumi Sasaki, Yutaka Inaguma, Hidenori Ito, Hirohide Takebayashi, Masatsugu Ema, Kazuhiro Ikenaka, Koh-ichi Nagata, and Kazunori Nakajima: Blood vessel-guided cell migration during late cortical plate development, 第38回日本神経科学大会、神戸国際会議場・神戸国際展示場、神戸(兵庫県) 2015年7月28-31日

Hidenori Tabata, Megumi Sasaki, Yutaka Inaguma, Hidenori Ito, Hirohide Takebayashi, Masatsugu Ema, Kazuhiro Ikenaka, Koh-ichi Nagata, and Kazunori Nakajima: Blood vessel-guided cell migration in the developing cerebral cortex. 第48回日本発生生物学会大会、つくば国際会議場、つくば(茨城県) 2015年6月3-5日

Hidenori Tabata, Tsuyoshi Hachiya, Koh-ichi Nagata, Yasubumi Sakakibara, Kazunori Nakajima: Functional screening of the candidate genes involving in the expansion of subventricular zone and the evolutionary analysis of them. Cortical Evolution Conference 2015, Toledo, Spain, 2015年5月18-20日

Hidenori Tabata, Megumi Sasaki, Hirohide Takebayashi, Masatsugu Ema, Kazuhiro Ikenaka, Koh-ichi Nagata, Kazunori Nakajima: Unique migration of glia progenitors during the cortical plate development in mice. International Symposium of Neurovascular Wiring, Kyoto, 2015年1月28日

Hidenori Tabata, Megumi Sasaki, Hirohide Takebayashi, Masatsugu Ema, Kazuhiro Ikenaka, Koh-ichi Nagata, Kazunori Nakajima: The unique migratory properties of glial progenitors derived from the cortical ventricular zone. 第37回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、横浜(神奈川県) 2014年9月11-13日

Hidenori Tabata, Megumi Sasaki, Hirohide Takebayashi, Masatsugu Ema, Kazuhiro Ikenaka, Koh-ichi Nagata, Kazunori Nakajima: The migration of glial progenitors derived from the cortical ventricular zone. Cortical Development Conference 2014, Crete, Greece, 2014年5月22-25日

Hidenori Tabata, Yasubumi Sakakibara, Koh-ichi Nagata, and Kazunori Nakajima: Functional screening of the genes involved in the production of progenitor cells in the subventricular zone in mice. Society for Neuroscience, Neuroscience 2013 Meeting, San Diego Convention Center, San Diego, California, U.S.A., 2013年11月9-13日

田畑秀典、榊原康文、永田浩一、仲嶋一範: 脳室下帯分裂細胞の産生調節に関わる分子の探索、第36回日本神経科学大会・第56回日本神経化学学会大会・第23回日本神経

回路学会大会合同大会 (Neuro2013)、国立京都国際会館、京都、2013 年 6 月 20-23 日

Hidenori Tabata, Satoshi Yoshinaga, Yasubumi Sakakibara, Koh-ichi Nagata, Kazunori Nakajima: Histological organization of mouse and primate subventricular zone in the developing cerebral neocortex. Neuro2013 Satellite Symposium “Molecular & Cellular Mechanisms of Brain Development & Evolution”, Kyoto Prefecural University Library Hall, Kyoto, 2013 年 6 月 19 日

〔その他〕

ホームページ

<http://www.inst-hsc.jp/d-molecular/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田畑 秀典 (Hidenori Tabata)

愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所・室長

研究者番号：80301761