

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25870900

研究課題名(和文) 発生期大脳皮質における神経細胞の移動様式の変化と周囲血管網の関連性

研究課題名(英文) Relationship between the mode change of migrating neuron and vascular network in the developing cerebral cortex

研究代表者

西村 嘉晃 (NISHIMURA, Yoshiaki)

東北医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：50508603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳形成期に未成熟神経細胞は発達中の血管網に囲まれた空間を移動していく。両者間で何らかの制御が働いている可能性を考え、まず移動神経細胞の形態変化を制御する機構を解析した。大脳皮質のスライス組織をタイムラプス観察などにより調べた結果、Cdk5やp27kip1、JNKなどが関与することを明らかになった。一方血管網側についてもその詳細な形成過程を解析するためにタイムラプス観察を試みたが、スライス組織片において血管網は観察の早期に退縮してしまったため正常な形態変化の様子を記録したりその分子機構を解析することは出来なかった。

研究成果の概要(英文)：During brain formation, post-mitotic neurons migrate through the developing vascular network. To analyze their interaction, we first analyzed the mechanisms that control the morphological changes of migrating neurons. By using the ex vivo slice culture system of the cerebral cortex, it became clear that Cdk5, p27kip1, JNK etc. are involved. We also attempted time-lapse observation to analyze the detailed formation process of the vascular network. However, since the vascular network collapsed early in the slice tissue, we failed to record the normal morphological changes and analyze the molecular mechanism.

研究分野：神経発生学

キーワード：発生学・形態形成学 発生医学

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質を構成する興奮性神経細胞は、その大部分は脳室帯付近で誕生し、脳室下帯で移動速度を落とし一旦多数の突起を持つ多極性細胞になり一日程度滞留した後、一本の先端突起を持つロコモーション細胞になって速度を上げて脳表層付近まで移動する。整然とした層構造を持つ大脳皮質の構築にはこのような移動様式の変化を経ることが必須であることが知られているが、なぜこのような一過的な滞留と劇的な形態変化が必要であるかについては明らかにされていない。

我々はこれまでに大脳皮質を形成する神経細胞の移動の制御機構を解析してきた。その際、子宮内エレクトロポレーション法（外来遺伝子を胎仔脳の神経前駆細胞に簡便に導入する方法）とスライス培養法を組み合わせたライブイメージング技術を確立し、神経細胞移動に関与するいくつかの分子経路を示してきた。その過程において移動神経細胞を詳細に観察してきたが、脳室帯付近で誕生した神経細胞が最終配置場所へ向かう途中でなぜ移動速度を落として一旦多極性細胞になるかが疑問であった。一つの可能性として、神経細胞はロコモーション細胞になると再び移動速度を上げて脳表層へ向かうと同時に後方に軸索を形成するなどして成熟していくが、そのためには、神経細胞は動力源としての栄養の確保や軸索形成のための脂質の合成などに十分な時間を確保する必要があることが考えられる。また、この期間には多数の突起を伸ばすことで進路を探っていると考えられているが、それに加えて周囲の栄養環境を察知しやすくしているとも考えられる。そして、結果的に最終的な層構造の形成を含めた細胞運命の決定に関与していると考えられる。

そこで神経細胞を取り巻く周囲環境の影響を考え、準備実験として大脳皮質中の血管網や移動神経細胞の支持体である放射状グリアなどの可視化を試みた。その結果、脳の血管網は個体毎に異なる配置を示すが、決してランダムに配置しているのではなく一定の規則的なパターンを持って配置していることが読みとれた。また、移動神経細胞が形態変化や移動速度の変化を起こす領域と血管網のパターンの変化がある領域が極めて近接していることが分かった。

2. 研究の目的

大脳皮質を構成する神経細胞は脳室付近で誕生し、その後様々な形態変化や移動速度の変化を経ながら脳表層付近まで移動する。本研究では、神経細胞がこれらの移動様式の変化を経るために必要な環境として、移動神経細胞の周囲の血管網に注目する。大脳皮質の血管網は極めて規則的なパターンを持っており、また領域毎に異なる遺伝子発現を示すことが知られているため、本研究では神経細胞の移動様式の変化を周囲の血管網がど

のようにして制御しているかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス胎仔脳に簡便に外来遺伝子を導入することができる「子宮内エレクトロポレーション法」を用いて、移動神経細胞の細胞形態を EGFP で可視化した大脳皮質のスライスをタイムラプス顕微鏡下で培養し、その培養液中に様々な分子に対する機能阻害剤を添加することにより特定の分子の機能を抑制する実験を行い、ロコモーション細胞の移動に関わる分子をスクリーニングした(図1)。

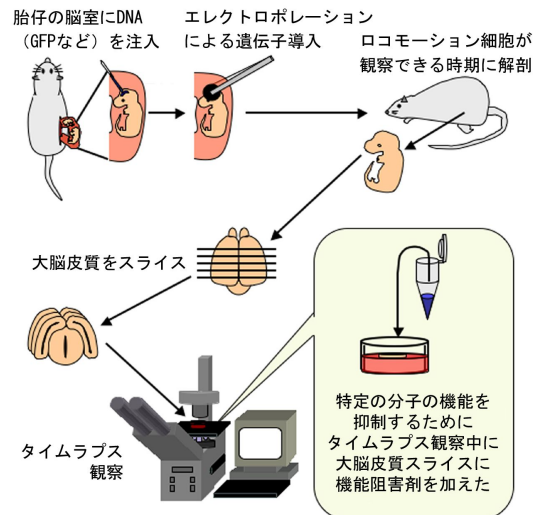


図1 スライス培養による阻害剤スクリーニング

さらに一つ一つのロコモーション細胞をより詳細な時間間隔で高倍率で観察することにより、ロコモーション細胞の時間依存的な形態変化を制御する分子機構を解析した。

(2) 大脳皮質の血管網が脳発生期にどのようにして形成されるかを調べるために、血管レポーターマウスとして Flt-tdsRed BAC Tg マウス(Matsumoto et al. Genesis, 2012; 50: 561-71) を用いて、固定切片を作製して共焦点顕微鏡を用いた観察および(1)で述べたスライス培養法を用いた経時的な観察を行った。

4. 研究成果

(1) 脳形成期における血管網形成はこれまで十分に理解されてこなかったため、血管レポーターマウスの脳切片を発生期の各ステージで固定して、血管網形成の様子を詳細に観察することが必要であった。そこで、血管レポーターマウスとして Flt-tdsRed BAC Tg マウス(Matsumoto et al. Genesis, 2012; 50: 561-71) を用いて、脳形成期の血管網形成の様子を共焦点顕微鏡を用いて観察したところ、脳の血管網は脳の領域ごとに異なるパターンを示すことが明らかになった。

(2) 神経細胞移動も脳の領域ごとに異なる

パターンを示すことが知られているため、両者の間には何らかの関連性があることが予想された。この関連性を明らかにするために、脳血管、神経細胞の詳細な形態変化の様子を記録し、それらをつなぐ機構を明らかにしていく必要性が生じた。そこで、まず比較的解析が容易な移動神経細胞の形態変化を制御する機構を解析するために、大脳皮質のスライス組織をタイムラプス観察し、その培養液中に様々な分子に対する機能阻害剤を手中するなどの方法を用いて、Cdk5 や p27kip1、Dcx、JNK などが関与することを明らかにした (Nishimura et al. Development, 2014;141:3540-50)。

(3) 血管網側についても、その詳細な形態変化の様子を解析するために(2)と同様のタイムラプス観察を試みたが、スライス組織片における血管網は観察の早期に退縮してしまっただけで、正常な形態変化の様子を記録したり、その分子機構を解析することは出来なかった。

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2件)

Yoshiaki V. Nishimura, Mima Shikanai, Mikio Hoshino, Toshio Ohshima, Yo-ichi Nabeshima, Ken-ichi Mizutani, Koh-ichi Nagata, Kazunori Nakajima, Takeshi Kawauchi. "Cdk5 and its substrates, DCX and p27^{kip1}, regulate cytoplasmic dilation formation and nuclear elongation in migrating neurons." Development. 141(18), pp.3540-50, 2014 (査読有), doi: 10.1242/dev.111294.

Yutaka Inaguma, Nanako Hamada, Hidenori Tabata, Ikuko Iwamoto, Makoto Mizuno, Yoshiaki V. Nishimura, Hidenori Ito, Rika Morishita, Motomasa Suzuki, Kinji Ohno, Toshiyuki Kumagai, Koh-ichi Nagata. "SIL1, a causative cochaperone gene of Marinesco-Sjögren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex." EMBO Molecular Medicine. 6(3), pp.414-29, 2014 (査読有), doi: 10.1002/emmm.201303069.

[学会発表](計14件)

西村嘉晃、「大脳皮質形成の制御機構の研究 -神経細胞移動と血管網形成の関係-」, 第3回日本血管生物医学会若手研究会、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県・淡路市) 3月3-4日、2017年

Jun Motoyama, Yoshiaki Nishimura. "Patterns of intracellular calcium fluctuation in precursor cells of the mouse neocortical ventricular zone" 49th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Kumamoto City Civic Hall & International Center (Kumamoto Pref, Kumamoto City), May 31-June 3, 2016

西村嘉晃、「胎生期における脳血管網のパターン形成」, 第2回日本血管生物医学会若手研究会、東北大学加齢医学研究所(宮城県・仙台市) 3月4-5日、2016年

西村嘉晃、「発生期大脳皮質における神経細胞移動の形態変化を制御する機構の解析」, 第42回脳神経科学コアセンターセミナー、東北大学医学部(宮城県・仙台市) 12月18日、2015年

西村嘉晃、「正常な脳内環境構築における血管網形成と神経組織形成」, 第1回日本血管生物医学会若手研究会、東京大学医学部(東京都・文京区) 2月6-7日、2015年

西村嘉晃、「発生期大脳皮質におけるロコモーション移動の形態変化を制御する機構の解析」, 第2回包括的神経グリア研究会(UNG2015)、オースプラザ(愛知県・名古屋市) 1月10-11日、2015年

Yoshiaki V. Nishimura, Mima Shikanai, Mikio Hoshino, Toshio Ohshima, Yo-ichi Nabeshima, Ken-ichi Mizutani, Koh-ichi Nagata, Kazunori Nakajima, Takeshi Kawauchi. "Cdk5 characterize migrating neurons-specific features, cytoplasmic dilation formation and nuclear elongation, in the developing cerebral cortex" 第37回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 11月25-27日、2014

Yoshiaki V. Nishimura, Mima Shikanai, Mikio Hoshino, Toshio Ohshima, Yo-ichi Nabeshima, Ken-ichi Mizutani, Koh-ichi Nagata, Kazunori Nakajima, Takeshi Kawauchi. "Cdk5 and JNK differentially regulate cortical neuronal migration and unique morphological changes" 第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学会大会合同年会、奈良県文化会館(奈良県・奈良市) 9月29日-10月1日、2014年

浜田奈々子、稲熊裕、田畑秀典、西村嘉晃、伊東秀記、水野誠、大野欽司、永田浩一、 “SIL1, a causative cochaperone gene of Marinesco-Sjogren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex.” 日本生化学会中部支部例会、名古屋大学（愛知県・名古屋市）5月24日、2014年

浜田奈々子、稲熊裕、田畑秀典、西村嘉晃、伊東秀記、水野誠、大野欽司、永田浩一、 “Analysis of cortical development defects using time-lapse imaging.” 第7回神経発生討論会、大阪大学吹田キャンパス（大阪府吹田市）3月13-14日、2014年

浜田奈々子、稲熊裕、田畑秀典、西村嘉晃、伊東秀記、水野誠、大野欽司、永田浩一、 “Analysis of cortical development defects using time-lapse imaging.” 第6回NAGOYAグローバルリトリート、あいち健康プラザ（愛知県・知多郡）2月14-15日、2014年

Yoshiaki V. Nishimura, Yutaka Inaguma, Masatsugu Ema, Mitsuharu Hattori, Koh-ichi Nagata, Ken-ichi Mizutani. 「マウス発生期大脳皮質の血管網形成」第21回日本血管生物医学会学術集会、千里阪急ホテル（大阪府・豊中市）9月26-28日、2013年

Koh-ichi Nagata, Yutaka Inaguma, Nanako Hamada, Hidenori Tabata, Yoshiaki Nishimura, Hidenori Ito, Makoto Mizuno, Ikuko Iwamoto, Rika Morishita, Motomasa Suzuki, Toshiyuki Kumagai. “SIL1, a causative gene of Marinesco-Sjogren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex” 第36回日本神経科学大会、第56回日本神経化学会大会、第23回日本神経回路学会大会 (Neuro2013) 京都国際会館（京都府・京都市）6月20-23日、2013年

Koh-ichi Nagata, Yutaka Inaguma, Yoshiaki V. Nishimura, Nanako Hamada, Makoto Mizuno, Hidenori Ito, Motomasa Suzuki, Masanori Hosokawa, Toshiyuki Kumagai. “Essential role of SIL1, a causative gene of Marinesco-Sjogren syndrome, in the architecture of cerebral cortex during development.” 24th ISN Biennial Meeting, Cancun (Mexico), Apr 22, 2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 嘉晃 (NISHIMURA, Yoshiaki)
東北医科薬科大学・医学部・助教
研究者番号：50508603

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし