

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430017

研究課題名(和文)皮質脊髄路側枝形成に關与するリガンド受容体シグナリングの解明

研究課題名(英文)Elucidation of ligand-receptor signaling that regulates the corticospinal tract collateralization

研究代表者

猪口 徳一 (IGUCHI, TOKUICHI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60509305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000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。この側枝形成を制御する分子機構を明らかとするべく、我々は、これまでにスクリーニングで得た側枝形成に關与する候補受容体とそのリガンドについて解析を進めた。すると、それら分子が皮質と橋核それぞれで相補的に発現し、その発現パターンが軸索側枝の投射領域の調節に關与する事が明らかとなった。さらに、脳傷害時の代償機構を担う側枝形成に關しても共通の受容体が關与することを示した。このことは、側枝形成現象の共通分子基盤の解明や、神経機能回復への応用などを考える上で、大変意義深い。

研究成果の概要(英文)：Corticospinal tract, which is the major subcortical output from the neocortex, extends the axon collaterals from the main shaft to several nuclei, enabling coordination of neural activity. In order to clarify the molecular mechanism controlling the formation of axon collaterals, we screened and analyzed candidate receptors and their ligands which are involved in axon collateral formation. We found that one of the candidate receptors (receptor #13) and its ligand were complementarily expressed in the cortex and the pontine nucleus, and their expression pattern determined the projection area of the axon collateral branches. Furthermore, receptor #13 was also involved in collateral branch formation that plays a compensatory mechanism during brain injury. These results are of great significance to elucidate the common molecular basis that underlies axon collateralization and to subsequently apply in recovery of neural function.

研究分野：神経科学

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

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。その軸索は脳発生に伴って大脳皮質第V層の神経細胞から伸長し、内包を通り、脊髄へと投射する。その主軸索からは、上丘、赤核、橋核、下オリ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・側枝の退縮を経て神経回路が完成する (O'Leary and Terashima, *Neuron*, 1988)。このような軸索側枝を介する神経回路は脳機能の調節や修飾を行うことで神経活動の協調性を実現し、脳の高次機能に重要な役割を担っている。また、側枝形成は傷害を受けた脳領域への代償機構としても重要な役割を担っており、傷害によって片側の回路が途切れてしまった時に、健常側から軸索側枝が伸び、やがて、傷害領域を代償するように働くことが知られている。側枝形成の研究は1980年代より、DiI色素等のトレーサーによって詳細に行われ (O'Leary and Stanfield, *Brain Res.*, 1985)、その形態学的・解剖学的な理解は進んでいるが、実際の脳内における側枝形成制御を担う分子実態についてはほとんど分かっていない。

脳内において軸索側枝形成機構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。研究分担者の佐藤らは、皮質脊髄路の側枝形成を研究する過程で、コラーゲンゲル内で大脳皮質と橋核組織片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を見いだした (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制御する分子が橋組織に発現していることを示している。

我々はこれまでに、側枝形成に関与するリガンドの探索を行い、側枝形成時期の橋核で強く発現する分子をアレイ解析から得ている。これに加え、文献データより同様に橋核で発現の高い分子、および、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、対応する受容体のうち皮質脊髄路神経細胞で発現の高い101の受容体を、側枝形成制御に関わる受容体候補分子として選出した。候補受容体それぞれに対して5種類のノックダウンベクターを同時に導入する、網羅的なノックダウンスクリーニングを実行した結果、これまでに、KDによって側枝形成が阻害された10受容体、促進された4受容体を得ている。

## 2. 研究の目的

大脳から脊髄へと長い軸索を伸ばす皮質脊髄路はその途中で複数の神経核に「軸索側枝」を伸ばす。「軸索側枝」は脊髄への出力と同時に複数の神経核に信号を送ることで、脳全体としての神経活動の協調性を実現し、一方で、神経傷害時に傷害領域を越えて伸びることで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を制御する分子およびシグナル機構はほとんど分かっていない。

本研究は、ヒトで高度に進化し、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」をモデルにその制御分子基盤を解き明することを目的とする。我々がこれまでに見出している軸索側枝形成に関与する候補受容体、及びそのリガンドの役割を生体脳において解析し、皮質脊髄路発達の軸索側枝の形成制御機構、さらには神経障害に対する代償機構としての軸索側枝形成機構の解明に取り組む。

## 3. 研究の方法

### (1) 受容体候補分子の K0 マウス脳組織における皮質脊髄路軸索側枝への影響の検証

我々はこれまでに、側枝形成への関与が示唆される101の受容体候補分子を得て、網羅的なノックダウンスクリーニングを実行した結果、側枝形成が阻害された10受容体、促進された4受容体を得ている。そこで、これら受容体遺伝子のK0マウスを作成し、若しくはその脳組織を取り寄せ、阻害・促進効果を検証する。具体的にはK0マウス大脳皮質に、DiIトレーサーを入れ、皮質脊髄路をラベルした後、矢状断切片を観察し、WTマウスと比較する。

### (2) 受容体候補およびリガンドの脳内分布の詳細な解析

皮質脊髄路への関与が検証された受容体に対して、in situ hybridization法、免疫組織染色法によりその脳内分布と細胞内(軸索内)分布、を詳細に調べる。また、リガンドが既知の場合はリガンドの局在も同様に調べる。これら受容体とリガンドの発現が脳発達にともない、また、軸索側枝形成の開始時期前後にどのように変化するかを明らかにする。

### (3) 側枝形成に関与する受容体とリガンドの機能発現機構を解析する

皮質脊髄路への関与が検証された受容体、およびそのリガンド(結合分子)をクローニングし、皮質脊髄路神経細胞、橋核にそれぞれ発現させ、側枝形成に対する影響を調べる。

橋核への遺伝子導入は胎生 12.5 日の菱脳唇尾側への子宮内電気穿孔法によって確立している。

#### (4) 神経傷害に対する代償機構としての軸索側枝形成との分子共通生についての検証

(1) ~ (3) の実験を通して得られた皮質脊髄路軸索形成に關与する受容体について、神経障害に対する代償機構としての軸索側枝形成に關与するかを調べる。受容体 K0 マウスで片側脳傷害マウスを作成し、脊髄で健常側から傷害側へと伸びる側枝の様子をトレーサーによって可視化し、WT と比較することで評価する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 受容体候補分子の K0 マウス脳組織における皮質脊髄路軸索側枝への影響の検証

我々がこれまでに、皮質脊髄路起始細胞での網羅的ノックダウン実験から見出した、側枝形成への関与が示唆される候補受容体について、K0 マウスの脳組織を用いて、軸索側枝への影響を検証した。国内外の研究施設より得た候補受容体の K0 マウス、または固定脳組織に加えて、3 候補受容体に対して CRISPR/Cas9 技術を利用して K0 マウスを作製した。各 K0 マウスについて、DiI トレーサーを大脳皮質運動野に入れ、皮質脊髄路をラベルし、橋核への軸索側枝を観察した。すると、その中で、KD によって側枝伸長促進効果がみられた候補受容体 #13 は、K0 マウスにおいても同様に側枝伸長が促進され、その投射パターンに乱れを生じていた。

##### (2) 受容体候補およびリガンドの脳内分布の詳細な解析

候補受容体 #13 と既知のリガンドについて、脳内分布の詳細な解析を行った。in situ hybridization 法にて脳内発現分布を調べると、興味深いことに、これら受容体とリガンドは共に、大脳皮質・橋核・小脳で発現しており、相補的な発現パターンを示した。また、橋核では、吻側に受容体 #13 を発現する細胞群が、尾側にリガンドを発現する細胞群が位置していたが、受容体 #13 K0 マウスではリガンドを発現する細胞群が吻側にも配置していた。#13 とそのリガンドは結合することで互いに反発するシグナルを伝達することが知られている。このことは、その発生において菱脳唇より腹側へと移動する橋核神経細胞群の吻尾方向の細胞配置にこれら分子の発現が関与し、その相補的配置によって、橋核への側枝の投射領域が制御されている可能性を示している。

さらに、候補受容体 #13 とそのリガンドについて、皮質脊髄路側枝形成領域での局在を

調べる為、タグを付加した発現ベクターを皮質脊髄路神経細胞に導入し、側枝形成途中である生後 2 日目で組織免疫染色を行った。その結果、受容体 #13、リガンド共に皮質脊髄路軸索に局在が見られ、分岐した軸索側枝にも局在することを確認した。

##### (3) 側枝形成に關与する受容体とリガンドの機能発現機構を解析する

側枝形成に關与する受容体 #13 とリガンドそれぞれを、皮質脊髄路起始細胞で KD し、橋核への軸索形成について詳細に調べた。いずれの KD においても、軸索側枝伸長が促進され、反発性シグナルを引き起こすことが予測されるお互いの発現している橋核領域へ側枝が進入している様子が観察された。逆に、受容体の皮質脊髄路での過剰発現はリガンドが発現する橋核尾側領域への軸索側枝の伸長が阻害され、また、リガンドの橋核での過剰発現は、大脳皮質受容体発現領域の起始細胞に由来する主軸索から橋核尾側領域へ伸びる側枝形成を阻害した。

以上の結果および、これら分子の脳内発現分布のデータをふまえると、大脳皮質や橋核でこれら分子を発現する細胞群が適切に配置することによって、大脳皮質の領野とそれに対応する橋核内領域との軸索側枝によるトポグラフィックな投射領域調節が行われていると考えられる。

##### (4) 神経傷害に対する代償機構としての軸索側枝形成との分子共通生についての検証

皮質脊髄路傷害時の代償機構としての軸索側枝形成について、本研究で得られた、K0 マウスで側枝伸長促進が見られた受容体 #13 の関与を調べた。受容体 #13 K0 マウスで大脳皮質吸引による片側運動野傷害モデルを作成し、Biotinylated Dextran Amines (BDA) を健常側大脳皮質運動野に注入することで皮質脊髄路をトレースし、4 週後に脊髄切片を作成し、正中を越えて傷害側へと伸びる側枝の数を WT と比較した。すると、受容体 #13 K0 マウスの頸髄において正中を越えて伸びる側枝の数が増加する傾向が見られた。このことより、神経傷害に対する代償機構としての軸索側枝形成にも受容体 #13 が関与していることが示唆された。

本研究を通して、これまで不明であった側枝形成に關与する受容体及びそのリガンドを同定し、これら分子の発現パターンが側枝の投射領域の調節に關与する事を明らかに出来た。さらに、脳傷害時の代償機構を担う側枝形成に關しても共通の受容体が關与することを示した。以上の結果は、側枝形成現象の共通分子基盤の理解や、神経機能回復への応用などを考える上で、大変意義深い。

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)

Okamoto, M., Iguchi, T., Hattori, T., Matsuzaki, S., Koyama, Y., Taniguchi, M., Komada, M., Xie, MJ., Yagi, H., Shimizu, S., Konishi, Y., Omi, M., Yoshimi, T., Tachibana, T., Fujieda, S., Katayama, T., Ito, A., Hirotsune, S., Tohyama, M., Sato, M. DBZ regulates cortical cell positioning and neurite development by sustaining the anterograde transport of Lis1 and DISC1 through control of Ndel1 dual-phosphorylation. *J. Neurosci.* 35(7):2942-58. doi:10.1523/JNEUROSCI.5029-13.2015. (2015) (査読有). 猪口 (Iguchi, T)を含む3名は筆頭著者扱い

Yagi, H., Nagano, T., Xie, MJ., Ikeda, H., Kuroda, K., Komada, M., Iguchi, T., Tariqur, RM., Morikubo, S., Noguchi K., Murase, K., Okabe, M., Sato, M. Filamin A-interacting protein (FILIP) is a region-specific modulator of myosin 2b and controls spine morphology and NMDA receptor accumulation. *Sci. Rep.* 4:6353. doi: 10.1038/srep06353. (2014) (査読有).

[学会発表](計 23件)

猪口 徳一「DBZはNdel1のリン酸化修飾制御を通して軸索伸長および皮質神経細胞の配置に関与する」第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016年3月28日、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

Iguchi T. DISC1-binding zinc finger protein (DBZ) regulates cortical cell positioning and neurite elongation through control of Ndel1 dual-phosphorylation, Neuroscience 2015, SfN's 45<sup>th</sup> annual meeting, Oct. 19, 2015, Chicago (USA)

猪口 徳一「皮質脊髄路側枝形成を制御する受容体による皮質-橋-小脳路の形成機構」第16回 ORIGIN 神経科学研究会、2015年8月28日、下関市豊北生涯学習センター(山口県下関市)

猪口 徳一「受容体チロシンキナーゼとその反発性結合分子は脳内で相補的に発現することで軸索側枝の投射様式を制御し皮質 橋 小脳路の形成に関わ

る」第38回日本神経科学大会、2015年7月29日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Iguchi T. Analyses on the candidate receptors for the axon collateralization of the developing corticospinal tract, 第120回 日本解剖学会総会・全国学術集会、2015年3月23日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

猪口 徳一「皮質脊髄路側枝形成に関与する受容体分子の探索と解析」第90回日本解剖学会近畿支部学術集会、2014年11月29日、大阪大学医学部(大阪府吹田市)

[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・医学系研究科・助教  
研究者番号: 60509305

(2)研究分担者

佐藤 真 (SATO MAKOTO)  
大阪大学・連合小児発達学研究所・教授  
研究者番号: 10222019

森 泰丈 (MORI YASUTAKE)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号: 00343252

尾身 実 (OMI MINORU)  
藤田保健衛生大学・医学部・助教  
研究者番号: 00400416