

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：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430036

研究課題名(和文) 錐体路形成における軸索誘導に係るシグナル分子基盤の解明

研究課題名(英文) Analysis of signaling for axon formation in corticospinal tract development

研究代表者

尾身 実(Omi, Minoru)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：00400416

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)：錐体路は脳からの出力路として大脳皮質から脊髄へと軸索を伸ばす。また脳内の神経核に側枝を伸ばすことで複雑な神経回路を形成する。本研究では錐体路の形成に関わるシグナル分子の探索と同定を試みた。錐体路を形成する大脳皮質神経細胞に発現する受容体の遺伝子を網羅的に探索し、shRNAを用いたノックダウンによって錐体路形成に関わると考えられる遺伝子のスクリーニングを行い、そこから得られた候補のうち特に2種類の遺伝子に着目して解析を行った。そのうちの1種類は大脳皮質に発現しており、且つ培養系での軸索分枝形成を促進することを見出したことから、錐体路形成における側枝形成に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pyramidal neurons in the cortex form corticospinal tract that project to the spinal cord, generating some collaterals projecting to some nuclei such as pontine nucleus. To identify signaling molecules that function during the corticospinal tract development, we performed screening of genes of receptor molecules that may be expressed in the pyramidal neurons by knockdown experiment with shRNA expressing vectors. We focused two of genes listed by the screening which showed loss or truncation of collaterals in the pons when each was knocked down. We confirmed that those were expressed in the fifth layer in the cortex of newborns. When cortical neurons were cultured in the media with ligand protein of the receptor, branching of the neurites was increased, suggesting that they may be involved in collateral formation of the pyramidal tract.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 神経細胞 細胞分化 神経回路

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質第5層の神経細胞から伸びる軸索は、大脳皮質からの主要な出力路である錐体路を形成する。この錐体路を形成する軸索は、大脳皮質第5層から起こり、皮質下に入った後、内包、脳幹を走行し、延髄を経て脊髄へと至る。また、その過程で、上丘や橋部に側枝を伸ばし、その結果、複雑な神経回路が形成される。錐体路は中枢神経系において最も長い軸索経路であり、体幹および四肢の運動を制御するために不可欠な神経回路であるが、その軸索がどのような分子機構によって大脳皮質から脊髄へと到達するか、また如何にして側枝を伸ばすのかといったことについては未知の部分が多い。

錐体路の軸索の伸長については、内包に至るまでに Semapholin/Neuropilin や Slit/Robo といったシグナルなどの反発性シグナルが関与することが明らかとなっている。しかし、内包を通過した後に関与する分子機構についての知見は極めて乏しく、どのような因子が関与しているのかは定かではない。一方、錐体路を形成する神経細胞に発現する転写因子である CTIP2 のノックアウトマウスでは、橋部より後方へ至る軸索の伸長は見られなくなることが報告されている。したがって、内包より後方の領域においても錐体路軸索の伸長や側枝形成に関わる何らかの細胞外シグナルが存在することが強く示唆される。これら錐体路形成に関わる分子機構を明らかにすることは、中枢神経系の神経回路の形成機構を理解する上で、極めて重要であると考えられる。

2. 研究の目的

上述したように、錐体路軸索の伸長や側枝形成にはさまざまな細胞外シグナルが関与していることが考えられるが、その実態については多くが未知のままである。本研究では、錐体路軸索の形成に関わるシグナルを明らかにすることを目的とした。

神経細胞が軸索を標的部位にまで正確に伸長させるためには、標的部位にいたるまでに存在するさまざまな細胞外シグナルを受け取る必要があり、そのための受容体分子が神経細胞に発現しているはずである。そこで我々はまず、公開されている発現データベース (Allen Brain Atlas, The GENSAT project, Arlotta et al., Neuron (2005)等) やその他論文 (Gesemann et al. Mol. Cell Neurosci. (2001); Numayama-Tsuruta et al. BMC Dev. Biol. (2010)等) および既に我々のグループが独自に得ていた microarray のデータを基に、大脳皮質第5層に発現する遺伝子群のうち、受容体分子や細胞接着に関わる遺伝子を網羅的に探索した。続いて、それらの遺伝子に対する

shRNA ライブラリーを用意し、それらをマウス胚の大脳皮質第5層を形成する細胞に子宮内エレクトロポレーション法によって導入し、ノックダウン実験を行うことで、錐体路の軸索形成に影響を及ぼし得る遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、ノックダウン実験によって軸索形成に関わることが示唆される遺伝子を複数見出した。この結果を端緒とし、錐体路の形成機構において機能する遺伝子の同定と機能解析を試みた。

3. 研究の方法

錐体路の観察は、大脳皮質に蛍光色素 DiI を注入して錐体路軸索を標識し、ピプラトームにより切片を作成して行った。

候補遺伝子の発現は in situ hybridization 法および免疫染色法により解析した。

候補遺伝子のノックアウトマウスが存在するものについては、ジャクソン研究所(米国)より購入した。

候補遺伝子の受容体に結合するリガンドの作用を調べるため、脳組織由来の神経細胞を培養し、培養液にリガンドタンパクを添加した。神経細胞軸索の様態は、大脳皮質第5層の神経細胞で蛍光タンパクが発現するトランスジェニックマウスを用いることで観察した。

生体マウス脳から得られる細胞には、種々の神経細胞および多くのグリア細胞が混在している。胚性幹細胞を SFEBq 法により培養すると、大脳神経細胞が優先的に分化する。そこで胚性幹細胞由来の神経細胞を用い、リガンドタンパクを作用させた際に発現が変動する遺伝子の探索を行った。発現の変動は RNA-Seq により解析した。

4. 研究成果

shRNA によって 101 遺伝子のスクリーニングを行った。錐体路は大脳皮質から脊髄に至るまでに幾つかの神経核に側枝を伸ばすが、側枝の有無は shRNA による表現型の中で判別が比較的容易であり、且つ皮質橋核路は運動制御に不可欠な小脳への情報伝達経路であることから、橋核への側枝に関する表現型に着目して調べた。その結果、Acvr2a および CXCR2 のノックダウンにおいて、橋核側枝の顕著な短縮もしくは消失を観察した。したがって、少なくともこの2種類の遺伝子が錐体路側枝形成に関与していることが示唆された。

そこで、次にこれらの脳における発現を in situ hybridization および免疫染色法によって調べたところ、どちらの遺伝子も生後2日目のマウスに脳において、大脳皮質第5層に発現していることを見出した(図1, Acvr2a; 図2, CXCR2)。このことから、両遺伝子は

皮質第5層の細胞で機能していることが示唆された。

図1

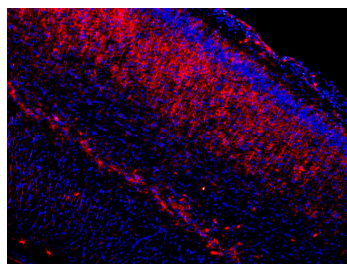
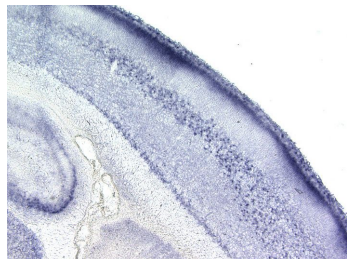


図2



ジャクソン研究所では *Acvr2a* ノックアウトマウスを保持しているの、研究所より同マウスを購入し、錐体路橋核側枝を *DiI* 標識で観察したところ、正常マウスと比べて顕著な差異が認められなかった。したがって *Acvr2a* は錐体路形成において、機能している可能性はあるものの単独で機能するシグナル経路ではない可能性が考えられる。

CXCR2 はサイトカイン受容体であり、リガンドは CXCL である。CXCR2 に結合する CXCL は 6 種類存在する。このうち 3 種類の CXCL(1, 2, 7) について、軸索側枝形成に及ぼす影響を、皮質細胞培養系を用いて調べた。マウスの皮質細胞を培養し、各 CXCL タンパクを添加したところ、CXCL2 が最も高い側枝形成効果を示した。

CXCL 添加による細胞への影響を調べるため、次世代シーケンスによる遺伝子発現解析を行った。皮質から得られる細胞群には神経細胞以外にもグリア細胞などさまざまな細胞種が含まれる。マウス胚性幹細胞を SFEBq 法で培養すると純度の高い皮質神経細胞を分化誘導できる。そこで胚性幹細胞由来の神経細胞に CXCL2 を作用させ、その際の遺伝子発現変化の解析を次世代シーケンスの RNA-Seq により試みた。その結果、発現量が 2 倍以上に上昇したものが 6 遺伝子 (*Ahcy*, *Egr1*, *Fam181b*, *Fos*, *Gm28551*, *Junb*)、発現量が 2 分の 1 以下に低下したものが 2 遺伝子 (*AW146154*, *Gm26533*) 見出された。遺伝子オントロジーでは *Ahcy* や *Fos* は神経突起の構成要素としての役割を持つとされており、これら含めて発現変動が認められた遺伝子について、脳内遺伝子発現および機能についての解析を行っていく。

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5件)

1. Yagi H., Takabayashi T., Xie M.J., Kuroda K., Sato M., Subcellular distribution of non-muscle myosin IIb is controlled by FILIP through Hsc70. *PLoS One* 12(2):e0172257 (2017), DOI: 10.1371/journal.pone.0172257 (査読有)
2. Harada H., Omi M., Sato T., Nakamura H. *Pea3* determines the isthmus region at the downstream of *Fgf8*-Ras-ERK signaling pathway. *Develop. Growth Differ.* 57(9), 657-666 (2015), DOI: 10.1111/dgd.12254 (査読有)
3. Omi M., Nakamura H., *Engrailed* and tectum development. *Develop. Growth Differ.* 57(2), 135-145 (2015), DOI: 10.1111/dgd.12197 (査読有)
4. Okamoto M., Iguchi T., Hattori T., Matsuzaki S., Koyama Y., Taniguchi M., Komada M., Xie M.J., 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. Neuroscience* 35(7), 2942-2958 (2015), DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5029-13.2015 (査読有)
5. Omi M., Harada H., Watanabe Y., Funahashi J., Nakamura H., Role of *En2* in the tectal laminar formation of chick embryos. *Development* 141(10), 2131-2138 (2014), DOI: 10.1242/dev.102905 (査読有)

[学会発表](計11件)

1. Iguchi T., Okamoto M., Hattori T., Matsuzaki S., Koyama Y., Taniguchi M., Komada M., Xie M.J., Yagi H., Shimizu S., Omi M., Katayama T., Ito A., Hirotsune S., Tohyama M., Sato M., *DISC1*-binding zinc finger protein (DBZ) regulates cortical cell positioning and neurite elongation through control of *Ndel1* dual-phosphorylation. *Neuroscience* 2015, SfN's 45th annual meeting, 2015年10月17日~21日, Chicago (U.S.A.)

2. 猪口 徳一、尾身 実、岡 雄一郎、佐藤 真、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、2015 年 8 月 28 日～29 日、下関市豊北生涯学習センター（山口県下関市）
3. 黒田 一樹、八木 秀司、謝 敏かく、尾身 実、深澤 有吾、岡 雄一郎、猪口 徳一、佐藤 真、海馬神経細胞における NMDA レセプタに結合する FILIP 関連分子の機能解析、第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日～31 日、神戸国際会議場・展示場（兵庫県神戸市）
4. 猪口 徳一、尾身 実、岡 雄一郎、佐藤 真、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 28 日～31 日、神戸国際会議場・展示場（兵庫県神戸市）
5. Iguchi T., Omi M., Oka Y., Sato M., Analysis 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 03 月 21 日～2015 年 03 月 23 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）
6. 猪口 徳一、尾身 実、岡 雄一郎、森 泰文、佐藤 真、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～2014 年 11 月 29 日、大阪大学医学部（大阪府豊中市）

〔図書〕(計 1 件)

Harada H., Omi M., Nakamura H. (Ed. Sheng G.), Humana Press, in ovo electroporation methods in chick embryos, in Avian and reptilian developmental biology (Methods in Molecular Biology, vol. 1650)、2017 年、総ページ数 390

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

佐藤 真 (Sato, Makoto)
 大阪大学・連合小児発達研究科・教授
 研究者番号：10222019

岡 雄一郎 (Oka, Yuichiro)
 大阪大学・連合小児発達研究科・講師
 研究者番号：30614432

猪口 徳一 (Iguchi, Tokuichi)
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：60509305

黒田 一樹 (Kuroda, Kazuki)
 福井大学・学術研究院医学系部門・助教
 研究者番号：60557966

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()