

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830015

研究課題名(和文) 大脳皮質層形成機構の解析 移動神経細胞が辺縁帯直下で移動を停止するのは何故か？

研究課題名(英文) Mechanisms of cortical layer formation-why migrating neurons stop just beneath the marginal zone-

研究代表者

片山 圭一 (Katayama, Kei-ichi)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・講師

研究者番号：20391914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞の移動と大脳皮質層形成に必須の分子であるReelinの受容体(ApoER2とVldlr)について、それらの特異抗体を作製して、大脳皮質における局在についての詳細な解析を行った。ApoER2は大脳皮質の深層部の多極性細胞に、Vldlrは表層部の神経細胞の先端突起に局在する傾向がみられ、各々の受容体が特異的な機能を有している可能性が示唆された。

Reelinの下流で働くPafah1b1を移動神経細胞で過剰発現すると、通常は辺縁帯の直下で停止するはずの神経細胞が、辺縁帯内に侵入することを発見した。Pafah1b1を過剰発現された神経細胞の一部は本来配置すべき層よりも表層に位置していた。

研究成果の概要(英文)：Reelin plays essential roles in the neuronal migration and cortical layer formation. We generated monoclonal antibodies against Reelin receptors (ApoER2 and Vldlr) and examined their localization in the developing cerebral cortex. Vldlr is localized to the distal portion of leading processes in the marginal zone, whereas ApoER2 is mainly localized to neuronal processes and the cell membranes of multipolar cells in the multipolar cell accumulation zone. These different expression patterns may contribute to the distinct actions of Reelin on migrating neurons during both the early and late migratory stages in the developing cerebral cortex. Pafah1b1 is one of the downstream molecules of the Reelin signaling. We found that enhanced expression of Pafah1b1 in radially migrating neurons resulted in their over-migration into the marginal zone. Layer distribution of Pafah1b1-overexpressed neurons shifted more superficially than control neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳皮質層形成 神経細胞移動 滑脳症 知的障害

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質の神経細胞は脳表面に対して平行な6層構造を形成している。大脳皮質発生の最初期には、神経前駆細胞のみが脳室面に並んで脳室帯を構成しているが、発生が進むにつれて脳室帯で産生されたニューロンは次々に脳表面側の辺縁帯直下まで放射状に移動して停止するという過程を繰り返す。その結果、辺縁帯、すなわち最も早生まれの第1層の細胞を例外として、早生まれの神経細胞ほど深層に、遅生まれの神経細胞ほど浅層に局在するという“inside-out様式”で配置されることになる。

この大脳皮質の“inside-out様式”での層形成を実現する上で、必須の分子としてReelinが挙げられる。Reelinは大脳皮質辺縁帯のカハール・レチウス細胞から分泌される細胞外蛋白質で、層構造が逆転する突然変異マウスであるリーラーの原因遺伝子として1995年に報告された。以来、多くの研究者によって様々な研究がなされてきたが、「Reelinがどのようにして“inside-out様式”の層形成を達成させるのか(Reelinが欠損するとなぜ層構造が逆転するのか)」という根本的な疑問には未だ十分な答えを得られていない。

発生期の脳皮質には、移動を終えたばかりの未熟な神経細胞が皮質板最表層に密に配列した原皮質帯(Primitive Cortical Zone)と呼ばれる帯状の領域が存在する。放射状グリア線維を足場としてロコモーションと呼ばれる移動様式で移動してきた細胞は、先導突起の先端が辺縁帯に到達すると、放射状グリア線維から離脱し、突起の先端は辺縁帯に接着したまま突起を短縮し、細胞体が辺縁帯直下にまで一気に引き上げられて停止する。この最後のステップはターミナルトランスロケーションと呼ばれており、この過程で遅生まれの細胞が早生まれの細胞を追い抜くため、移動距離は非常に短いものの、“inside-out様式”の層形成に於いて非常に重要なステップであると考えられている。

Reelinは先導突起の辺縁帯内の基質への結合を促進し、ターミナルトランスロケーションを誘導する役割を担っている。その後、移動神経細胞は突起を短縮させて細胞体が引き上げられるが、このとき細胞体は必ず辺縁帯直下で停止し、辺縁帯に進入することは無い。これは先導突起に加えて細胞体までもが辺縁帯に進入してしまうと、遅生まれの細胞が入るスペースが無くなり、早生まれの細胞を追い抜くことが出来なくなるからではないかと予想される。言い替えれば、辺縁帯に細胞体が入らないことで遅生まれの細胞がその間に潜り込んで追い抜くための隙間を作っているのではないかと考えられる。しかしながら、移動神経細胞の細胞体が辺縁帯直下で移動を停止するメカニズムは未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では神経細胞の移動のそれぞれの過程でReelinがどのような下流分子を利用し、またどのようにしてそのシグナルを使い分けているのかを明らかにしたい。また、ターミナルトランスロケーションの際に、細胞体が辺縁帯直下で停止せずにその中まで進入することにより、その後の層形成がどのような影響を受けるのかを解明することで、神経細胞が“inside-out様式”で整然と配列するしくみを理解することを目指す。

3. 研究の方法

(1) Reelin受容体の局在の詳細な解析

Reelinがどのようにして神経細胞の移動と大脳皮質層形成を制御しているかを知るために、先ずReelinの受容体として知られているApoER2(apolipoprotein E receptor 2)とVldlr(very low density lipoprotein receptor)の特異抗体を作製し、免疫組織化学的解析を行い、それらの発生期大脳皮質における詳細な局在を明らかにする。

(2) Lis1(Pafah1b1)の過剰発現により辺縁帯内に侵入した神経細胞の動態の解析

Reelinシグナルの下流で働くとされるLis1(Pafah1b1)を移動神経細胞で過剰発現すると、移動神経細胞の細胞体は辺縁帯直下で移動を停止することなく、辺縁帯内にまで侵入する。そこで、子宮内胎児脳電気穿孔法を用いてLis1の過剰発現を行い、神経細胞の挙動の経時的観察を行う。さらに、早生まれと遅生まれの神経細胞の位置関係に関する解析や、Lis1を過剰発現された神経細胞の運命に関する検索も行う。

(3) 移動神経細胞に於ける先導突起と細胞体の分画化の解析

移動神経細胞はターミナルトランスロケーションの際に先導突起は辺縁帯に進入し、そこにある基質と結合するが、細胞体は辺縁帯に進入することなく、その直下で移動を停止する。従って、細胞の先導突起と細胞体では細胞表面タンパク質などの分布に関して、明確な分画化がなされていると考えられる。ターミナルトランスロケーションを司るReelinによって先導突起と細胞体の分画化が引き起こされるかどうかを検討するため、神経細胞の初代培養を用いたin vitro実験を行う。

(4) ターミナルトランスロケーション時に遺伝子の発現を調節するシステムの開発

神経細胞の移動に関係のある遺伝子を強制発現させたり、ノックダウンさせたりすると早い時期に細胞の移動が障害され、ターミナルトランスロケーションに与える影響を観察することが出来ないことも多い。また、タモキシフェンやドキシサイクリンを使用して遺伝子発現を調節することもできるが、

この場合は胎仔の発育そのものに影響を与えてしまう懸念もある。そこでターミナルトランスロケーションの際に特異的に発現の上昇する遺伝子のプロモーター領域を同定し、それを利用することでこの問題を解決することを試みる。

4. 研究成果

(1) Reelin 受容体の局在の詳細な解析

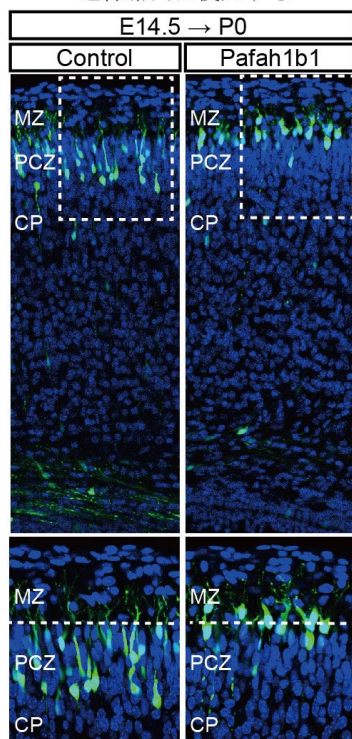
まず、ターミナルトランスロケーションと“inside-out 様式”の層形成に必須の分子として知られている Reelin の受容体 (ApoER2 と Vldlr) について、それらの特異抗体を製作して、発生期のマウス大脳皮質における局在についての詳細な解析を行った。ApoER2 は大脳皮質の深層部にある多極性細胞の突起に、Vldlr は表層部に存在する神経細胞の先端突起に多く局在する傾向がみられ、それぞれの受容体の特異的な役割を有し、神経細胞の移動の各段階で固有の機能を発揮している可能性が示唆された。

(2) Lis1(Pafah1b1)の過剰発現により辺縁帯内に侵入した神経細胞の動態の解析

Lis1 (Pafah1b1)は Reelin の下流で神経細胞の移動、特に核・細胞体の移動を制御していると考えられている。また、その機能喪失型変異はヒトの滑脳症の原因となることも知られている。ターミナルトランスロケーションの際に神経細胞の細胞体は辺縁帯の直下で停止するが、Lis1 を移動神経細胞で過剰

図 1.

Pafah1b1 を過剰発現すると、神経細胞の細胞体は辺縁帯直下で移動を停止することなく、辺縁帯内に侵入する



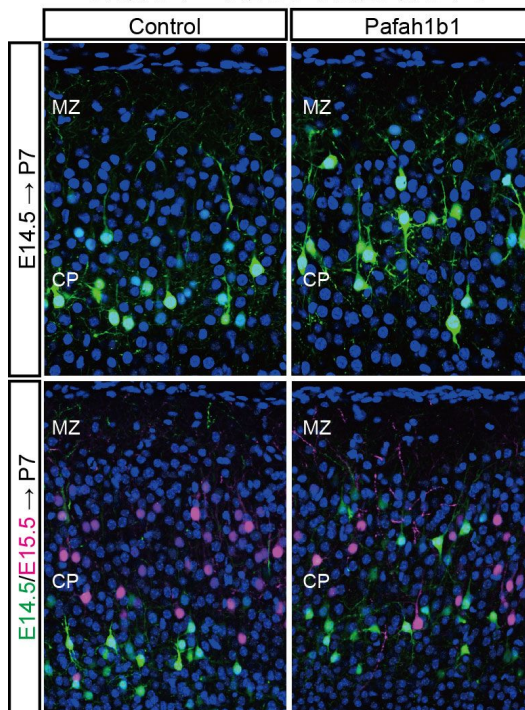
CP: 皮質板、MZ: 辺縁帯、PCZ: 原皮質帯

発現すると、神経細胞の細胞体は辺縁帯直下で停止することなく、辺縁帯内にまで侵入した (図 1)。

Lis1 を過剰発現された神経細胞は、その後も辺縁帯内～大脳皮質表層部に位置し続け、その多くは最終的に本来配置すべき層よりも表層に位置することが分かった。実際に、1 日遅く産まれた神経細胞と位置を比較してみても、それらと同程度の位置に配置する細胞も多数認められた (図 2)。

図 2.

Pafah1b1 を過剰発現された神経細胞は本来分布すべき層よりも表層に分布する



Pafah1b1 を過剰発現された神経細胞 (緑) は一日後に産まれた神経細胞 (赤) と混在している。

CP: 皮質板、MZ: 辺縁帯

また、Lis1 を第 4 層の神経細胞が誕生する時期に合わせて過剰発現したところ、一部の神経細胞は第 4 層よりも表層の第 2, 3 層に分布していた。さらに、第 2, 3 層に分布した神経細胞は第 4 層の神経細胞に特異的なマーカー (Rorb) ではなく、第 2, 3 層の神経細胞に特有のマーカー (Tbr1 および Lhx2) を発現するようになっていた。以上のことから、Lis1 の過剰発現により、本来の分布すべき層よりも表層に分布するようになった神経細胞は、分布した層に合わせてその性質を変化させる可能性が示唆された。Lis1 を過剰コピーもつヒトは知的障害などの神経・精神系の異常を呈することが知られており、Lis1 が過剰になることで神経細胞の移動と層形成に異常を生じることが、生後の大脳皮質の機能に大きな影響を与えるものと考えられた。

(3) 移動神経細胞に於ける先端突起と細胞体の分画化の解析

大脳皮質神経細胞の初代培養を行い、培養液中に Reelin を加えることで、その受容体

(ApoER2 および Vldlr) の細胞内局在がどのように変化するかについて検索を行った。Reelin を添加することにより、特に Vldlr の局在が細胞体から細胞突起へと偏在した。以上の結果より、Reelin の刺激によって細胞体と細胞突起の分画化が促進される可能性が示唆された。

(4) ターミナルトランスロケーション時に遺伝子の発現を調節するシステムの開発

ターミナルトランスロケーションの際に特異的に活性化するプロモーターの候補として、Dcx, Ta1, Neurod1 および Syn1 のプロモーター領域をクローニングし、これらのプロモーター依存的に Cre recombinase 遺伝子を発現するベクターを作製した。各ベクターは Cre/loxP recombination 依存的に EYFP を発現するレポーターマウス (R26R-EYFP マウス) に子宮内胎児脳電気穿孔法を用いて胎児神経細胞に導入した。Dcx, Ta1 および Syn1 プロモーターで Cre recombinase 遺伝子を発現させた場合は、脳室帯の神経前駆細胞より EYFP が発現しており、これらのプロモーターでは遺伝子の発現時期をコントロールすることは難しいと考えられた。Neurod1 プロモーターを用いて Cre recombinase 遺伝子を発現させた場合は、EYFP は最終分裂を終えた神経細胞から発現しており、脳室帯の神経前駆細胞では発現していなかった。従って、Neurod1 プロモーターを用いることで、脳室帯の神経前駆細胞で目的の遺伝子を発現させずに、最終分裂を終えた神経細胞から発現させることが可能になると考えられた。

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1件)

Hirota Y., Kubo K., Katayama K., Honda T., Fujino T., Yamamoto T.T. and Nakajima K. (2015) Reelin receptors ApoER2 and VLDLR are expressed in distinct spatio-temporal patterns in developing mouse cerebral cortex. J. Comp. Neurol. 523: 463-478. 査読有 DOI: 10.1002/cne.23691

[学会発表](計1件)

片山圭一、林周宏、坂口和成、仲嶋一範
大脳皮質の移動神経細胞に Pafah1b1 を過剰発現すると辺縁帯直下で移動を停止することなく辺縁帯内へと侵入する。
第 39 回日本分子生物学会 2016 年 11 月 30 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

片山 圭一 (KATAYAMA, Kei-ichi)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・講師

研究者番号 : 20391914