慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	受容体複合体による皮質ニューロン移動制御機構
Sub Title	Control of neuronal migration by the receptor complex during neocortical development
Author	廣田, ゆき(Hirota, Yuki)
Publisher	
Publication year	2020
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	大脳皮質の興奮性ニューロンは発生過程において放射状に移動し、脳表層近くに到達すると細胞体は辺縁帯直下に留まる。野生型マウス胎生脳にリーリンを発現させると移動ニューロンは秩序立った凝集塊を形成し、その周縁部に細胞体が集まり、中心部には辺縁帯に類似した樹状突起が集まり細胞体が疎な部分が形成される。Apoer2 KOマウスでリーリンを発現させると二ューロンの凝集自体が起こらなかったのに対して、Vldlr KOマウスでは凝集は起こるが細胞体が中心部に進入したことから、2種類の受容体は辺縁帯への細胞進入阻止に関して異なる役割を担うと考えられる。 In the developing neocortex, radially migrating neurons stop migration and form layers beneath the marginal zone (MZ). Reelin plays essential roles in these processes via its receptors, ApoER2 and VLDLR. Although we recently reported that Reelin causes neuronal aggregation via ApoER2, which is thought to be important for the subsequent layer formation, it remains unknown what effect Reelin exerts via the VLDLR. Herein, we found that ectopic Reelin overexpression in the Vldlr-mutant cortex causes neuronal aggregation, but without a MZ-like cell-sparse central region that is formed when Reelin is overexpressed in the normal cortex. We also found that both the early-born and late-born Vldlr-deficient neurons invade the MZ and exhibit impaired dendrite outgrowth from before birth. These results suggest that VLDLR is not a prerequisite for Reelin-induced neuronal aggregation and that the major role of VLDLR is to suppress neuronal invasion into the MZ during neocortical development.
Notes	研究種目 : 基盤研究 (C) (一般) 研究期間 : 2017 ~ 2019 課題番号 : 17K07415 研究分野 : 発生生物学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K07415seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月　 ２ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ０７４１５

研究課題名（和文）受容体複合体による皮質ニューロン移動制御機構

研究課題名（英文）Control of neuronal migration by the receptor complex during neocortical development

研究代表者

廣田　ゆき（HIROTA, Yuki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：００４５３５４８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：大脳皮質の興奮性ニューロンは発生過程において放射状に移動し、脳表層近くに到達すると細胞体は辺縁帯直下に留まる。野生型マウス胎生脳にリーリンを発現させると移動ニューロンは秩序立った凝集塊を形成し、その周縁部に細胞体が集まり、中心部には辺縁帯に類似した樹状突起が集まり細胞体が疎な部分が形成される。Apoer2 KOマウスでリーリンを発現させるとニューロンの凝集自体が起こらなかったのに対して、Vldlr KOマウスでは凝集は起こるが細胞体が中心部に進入したことから、２種類の受容体は辺縁帯への細胞進入阻止に関して異なる役割を担うと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義
神経細胞の移動停止制御機構は、ヒト高次脳機能の獲得の仕組みの解明のため、さらに神経細胞移動の異常に起因する病態の解明のために重要な課題であるが、神経細胞移動の促進機構の研究に比較すると立ち後れているのが現状である。その理由として、一連の神経新生プロセスのうち、神経幹細胞の増殖・分化、放射状移動等の移動停止以前のステップにも機能を有する分子に着目すると、神経細胞移動停止が二次的に影響を受け解析が困難となることが挙げられる。本研究では移動停止のみが異常となるリーリン受容体VLDLRのKOマウスの解析により、大脳皮質の正常発生における神経細胞移動を制御する新規の細胞・分子メカニズムの一端を解明した。

研究成果の概要（英文）：In the developing neocortex, radially migrating neurons stop migration and form layers beneath the marginal zone (MZ). Reelin plays essential roles in these processes via its receptors, ApoER2 and VLDLR. Although we recently reported that Reelin causes neuronal aggregation via ApoER2, which is thought to be important for the subsequent layer formation, it remains unknown what effect Reelin exerts via the VLDLR. Herein, we found that ectopic Reelin overexpression in the Vldlr-mutant cortex causes neuronal aggregation, but without a MZ-like cell-sparse central region that is formed when Reelin is overexpressed in the normal cortex. We also found that both the early-born and late-born Vldlr-deficient neurons invade the MZ and exhibit impaired dendrite outgrowth from before birth. These results suggest that VLDLR is not a prerequisite for Reelin-induced neuronal aggregation and that the major role of VLDLR is to suppress neuronal invasion into the MZ during neocortical development.

研究分野：発生生物学

キーワード：大脳皮質発生　ニューロン移動　リーリンシグナル

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

１．研究開始当初の背景

哺乳類大脳皮質形成におけるニューロン移動過程で、脳室帯で誕生したニューロンの多くはまず脳室下帯で多極性細胞と呼ばれる多数の突起を周囲に伸長させた特徴的な形態となる。そして脳室下帯で約 24 時間滞留した後に、双極性細胞へ形態を変化させ、脳表面へ向かって移動を再開し、同時に神経線維の伸長を開始して複雑な神経回路を形成するようになる。皮質 6 層構造はげっ歯類以降の哺乳類で獲得された特異的な構造であるが、高等哺乳類においてニューロン産生が飛躍的に増加し、高次機能を担う場となったのが脳室下帯であると考えられていることから、脳室下帯におけるニューロン動態を解明することがヒトの高次脳機能の獲得の仕組みを明らかにするために重要な課題である。

２．研究の目的

形成中の大脳皮質では、ニューロンは長距離を移動して最終的に機能する場所へと到達する。脳室帯で誕生したニューロンは多極性細胞として一過性に脳室下帯に留まり、その過程は霊長類型の複雑な皮質層構造を実現するために重要なプロセスであるが、その分子機構には不明な点が多く残されている。リーリンシグナルはニューロン移動と層形成を制御する重要なシグナル経路であり、移動ニューロンに対して多様な作用を及ぼすことが知られているがその多機能性を説明する分子機構は明らかにされていない。本研究では脳室下帯に発現するリーリン受容体 ApoER2/VLDLR とネトリン受容体 Unc5D に着目し、これらが共受容体として機能する可能性を検証することによってニューロン移動制御機構の新しい局面を理解することを目標とする。

３．研究の方法

リーリン受容体 ApoER2/VLDLR とネトリン受容体 Unc5D が相互作用することを見出したことから、リガンド候補を探索した。その結果、分化後の大脳皮質ニューロンから分泌され、Unc5D に対するリガンドとして働く FLRT2 が VLDLR および ApoER2 と結合することが見いだされたことから、辺縁帯直下において Unc5D/ApoER2/VLDLR が FLRT2 に対する受容体として働く可能性が示唆された。私たちの研究グループでは過去に、野生型マウス胎生脳の大脳皮質に異所的にリーリンを発現させると移動中のニューロンが細胞凝集塊を形成することを報告している（Kubo et al., 2010）。この際、ニューロンは細胞凝集塊中に分泌されたリーリンに沿って移動を停止し、正常な発生過程と類似した誕生時期依存的な inside-out パターンをとった配置をする。またこの細胞塊には中央部分に細胞密度が低い領域があり、その周囲にニューロンの細胞体が高密度に配列しており、生体内で観察される辺縁帯と類似している。この系を用いて、移動中のニューロンがリーリンに反応して辺縁帯様構造を形成する過程に VLDLR が必要であるかを検討した。胎生 14 日目の VLDLR ノックアウトマウス胎仔脳に、子宮内エレクトロポレーション法によりリーリン発現ベクターおよび GFP 発現ベクターを導入し、6 日後に脳を固定して GFP で標識された細胞の分布を調べた。その結果、VLDLR ノックアウトマウスでは細胞凝集塊は形成されるが、野生型の細胞凝集塊の中央でみられる辺縁帯様の中空構造は観察されなかった（図１）。このは、ニューロンの凝集過程には VLDLR は寄与せず、細胞が凝集したあとの樹状突起と細胞体を分離させる過程に VLDLR が必要であることを示唆している。

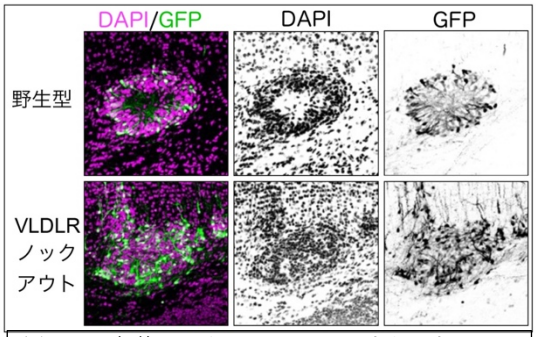

図１：野生型および VLDLR ノックアウトマウスにおける異所的リーリンに引き起こされる細胞凝集。野生型（上段）ではリーリン発現細胞（緑色）により中央に細胞が疎な中空構造を持った凝集塊が形成されるが、VLDLR ノックアウトマウスでは中空構造が認められない。

次に通常のニューロン移動過程における VLDLR の機能を調べるために、胎生 14.5 日の脳室帯で標識したニューロンの分布を 3，4 日後に経時的に観察した。その結果、3 日後ではコントロールと VLDLR ノックアウトマウスの間に差は見られなかったが、4 日後では、VLDLR ノックアウトマウスにおいて皮質板上部に到達したニューロンの分布がコントロールに比べてより表層寄りへとシフトしていた。さらに、辺縁帯について観察すると、コントロールではほぼ全ての細胞が辺縁帯より下に留まっているのに対して、VLDLR ノックアウトマウスでは辺縁帯内部に進入している細胞が認められた（図２）。また、ニューロンの過剰な移動と辺縁帯への進入が、胎生 14.5 日に標識されたニューロンに特異的に見られるのかを調べるために、胎生 12.5 日において標識した場合にも、同様の表現型が認められた（図２）。これらの結果は、リーリンシグナルが

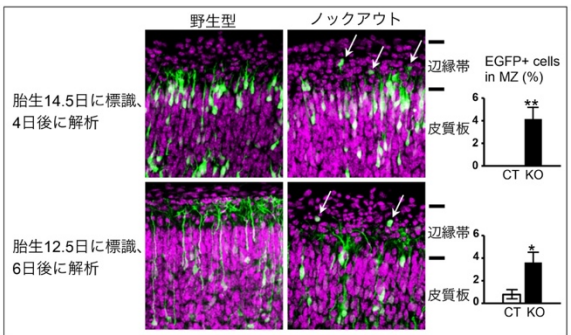

図２：VLDLR ノックアウトマウスにおける辺縁帯へのニューロンの進入。VLDLR ノックアウトマウスでは、胎生 14.5 日および 12.5 日において標識したニューロンの一部（矢印）は辺縁帯内部に進入する。

VLDLR を介してニューロンの過剰な移動を抑制し、辺縁帯への進入を阻止していることを示している。リーリンシグナルは大脳皮質、海馬の形成において神経突起の伸長を促進することが報告されている。VLDLR ノックアウトマウスにおいて辺縁帯直下に到達し、辺縁帯内部に樹状突起を伸長させているニューロンについて樹状突起の形態を調べたところ、突起の分岐の数と突起の全長がコントロールに比べて有意に減少していた（図３）。

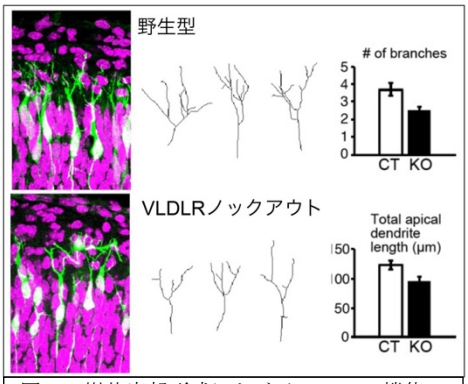

図３：樹状突起形成における VLDLR の機能。VLDLR ノックアウトマウスでは樹状突起の分岐の数（右上）、樹状突起の全長（右下）がコントロール比べて有意に減少する。

次に、VLDLR によるニューロンの移動制御が細胞自律的に行なわれているかを調べるために、VLDLR の全長を発現するベクターを導入し表現型が回復するかを検討した。その結果、VLDLR 発現によって辺縁帯内部に進入する細胞の数は有意に減少し、VLDLR が細胞自律的に機能すると考えられた。VLDLR の下流で機能する因子として、細胞接着因子、細胞骨格関連因子が想定される。リーリンシグナルの下流因子として知られる分子から VLDLR ノックアウトマウスの表現型を回復させるものを探索したところ、細胞接着分子 integrin α5 とセリンスレオニンリン酸化酵素 Akt および恒常的活性型 Rap1 による回復効果を認めた。これらの結果から、リーリンシグナルは移動を終了しつつある神経細胞において、樹状突起伸長および辺縁帯内部への進入の阻止を制御すると考えられる。

４．研究成果

大脳皮質形成過程において放射状に移動する興奮性ニューロンが辺縁帯直下で停止するステップは、精密な層構造を形成する上で必要不可欠な前提条件である。これまでにリーリンシグナルの主要な構成因子の変異マウス（リーリン、Dab1, ApoER2 と VLDLR の二重変異マウス）において辺縁帯へのニューロンの進入が報告されており、リーリンの受容体への結合とそれに続く細胞内経路の活性化が辺縁帯の形成に重要であることが示唆されていた。また私たちの過去の報告により ApoER2 と VLDLR は辺縁帯に豊富に存在することが示されたことからも、辺縁帯へのニューロンの進入の阻止にリーリン受容体が寄与することが想定されていた。しかしながら二種類の受容体の機能の違いについてはこれまでに明らかにされていなかった。本研究ではリーリンの異所的発現により細胞凝集塊を形成する系を用いて、ApoER2 がニューロンの凝集に必要であるのに対して、VLDLR はニューロンの凝集には関与せず、凝集塊内部で細胞体と樹状突起を分離させ、正常なニューロンの配向を形成するステップに必要であることを明らかにした。この結果は二種類のリーリン受容体がニューロン移動の最終過程において異なる機能を果たすことを示している。VLDLR が辺縁帯の直下でニューロンの移動を停止さるメカニズムについても検討した。近年、ニューロン移動後の配置と神経突起の形成の関連が複数の系で示されている。今回の研究では VLDLR がニューロンの辺縁帯直下での移動停止とともに、樹状突起の形成に重要であることが示された。これらのことから VLDLR が受容突起形成を介してニューロンの移動を停止させている可能性が考えられる。また VLDLR の下流で働く因子として integrin α5、Akt、Rap1 の関与が示された。ニューロンが terminal translocation を行う際に、リーリン刺激に応答して Rap1 を介して integrin α5 が活性化され、細胞外マトリクスであるフィブロネクチンへの接着が増強されることが知られている。また、Akt はリーリンの下流で mTor の活性化を介して神経突起形成を促進することが海馬ニューロンで示されている。これらのことから、樹状突起形成と接着を介して辺縁帯直下でのニューロンの移動が制御されている可能性が考えられる。今後、樹状突起形成とニューロン移動の関連をより詳細に調べることにより、大脳皮質層形成におけるリーリンシグナルの作用機序を解明できると期待できる。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Yuki Hirota, Kazunori Nakajima	４．巻 ―
２．論文標題 VLDLR is not essential for Reelin-induced neuronal aggregation but suppresses neuronal invasion into the marginal zone	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Development	６．最初と最後の頁 ―
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 ―

１．著者名 Hirota, Y., Kubo, K., Fujino, T., Yamamoto,T., Nakajima, K.	４．巻 28
２．論文標題 ApoER2 controls not only neuronal migration in the intermediate zone, but also termination of migration in the developing cerebral cortex.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Cerebral Cortex	６．最初と最後の頁 223-235
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cercor/bhw369	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 ―

１．著者名 Hirota, Y., Nakajima, K.	４．巻 5
２．論文標題 Control of Neuronal Migration and Aggregation by Reelin Signaling in the Developing Cerebral Cortex.	５．発行年 2017年
３．雑誌名 Front. Cell Dev. Biol.	６．最初と最後の頁 ―
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2017.00040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 ―

〔学会発表〕　計14件（うち招待講演　4件／うち国際学会　2件）

１．発表者名 廣田ゆき，仲嶋一範
２．発表標題 リーリンシグナルによるニューロン移動停止制御機構
３．学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
４．発表年 2018年

１．発表者名
廣田ゆき，仲嶋一範

２．発表標題
大脳皮質発生におけるリーリンシグナルの機能

３．学会等名
2018年度生理学研究所研究会「神経発達・再生研究会」（招待講演）

４．発表年
2018年

１．発表者名
廣田ゆき，仲嶋一範

２．発表標題
リーリンシグナルによるニューロン移動停止制御機構

３．学会等名
第124回日本解剖学会総会全国学術集会

４．発表年
2019年

１．発表者名
Yuki Hirota, Kazunori Nakajima

２．発表標題
How does Reelin signaling control the termination of neuronal migration?

３．学会等名
第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会合同年会

４．発表年
2018年

１．発表者名
Yuki Hirota, Ken-ichiro Kubo, Takahiro Fujino, Tokuo T. Yamamoto, and Kazunori Nakajima

２．発表標題
ApoER2 controls not only neuronal migration but also termination of migration in the developing cerebral cortex

３．学会等名
22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience（国際学会）

４．発表年
2018年

１．発表者名
Yuki Hirota, Chikako Kudo-Tsurushige, Itsuki Ajioka, and Kazunori Nakajima

２．発表標題
Encl controls migration and differentiation of excitatory neurons in the developing neocortex.

３．学会等名
第40回日本神経科学大会

４．発表年
2017年

１．発表者名
Yuki Hirota, Chikako Kudo-Tsurushige, Itsuki Ajioka, and Kazunori Nakajima

２．発表標題
Encl controls neuronal migration and differentiation of excitatory neurons in the developing neocortex.

３．学会等名
第60回日本神経化学会大会

４．発表年
2017年

１．発表者名
Yuki Hirota, Ken-ichiro Kubo, Takahiro Fujino, Tokuo T. Yamamoto, and Kazunori Nakajima

２．発表標題
ApoER2 controls not only neuronal migration but also termination of migration in the developing cerebral cortex.

３．学会等名
Cortical Development Conference 2017（国際学会）

４．発表年
2017年

１．発表者名
廣田 ゆき、鶴重 千加子、味岡 逸樹、仲嶋 一範

２．発表標題
Kelchリピート蛋白質Encl1の大脳新皮質発生における発現と機能

３．学会等名
第123回日本解剖学会総会・全国学術集会

４．発表年
2018年

１．発表者名
廣田ゆき

２．発表標題
リーリン受容体によるニューロン移動停止制御機構

３．学会等名
次世代脳プロジェクト2019年度冬のシンポジウム（招待講演）

４．発表年
2019年

１．発表者名
廣田ゆき

２．発表標題
大脳皮質形成メカニズムの研究と解剖学

３．学会等名
第125回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）

４．発表年
2020年

１．発表者名
廣田ゆき、仲嶋一範

２．発表標題
リーリン受容体VLDLRは発生中の大脳皮質において辺縁帯内へのニューロンの進入を阻止する

３．学会等名
第125回日本解剖学会総会・全国学術集会

４．発表年
2020年

１．発表者名
Hirota, Y., Nakajima, K.

２．発表標題
How does Reelin signaling control the termination of neuronal migration?

３．学会等名
20th TMIMS International Symposium “The principle of neocortical development and evolution”

４．発表年
2019年

１．発表者名
廣田ゆき、仲嶋一範

２．発表標題
大脳皮質発生におけるニューロン移動停止の制御機構

３．学会等名
第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会合同大会

４．発表年
2019年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕
慶應義塾大学医学部解剖学教室仲嶋研究室
https://www.nakajimalab.com/

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考