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

Title	発生期にリーリンにより誘導される神経細胞凝集は大脳新皮質層構造の起点となるか?
Sub Title	Are neuronal aggregates induced by Reelin the starting point of neocortical layers?
Author	林, 周宏(Hayashi, Kanehiro)
Publisher	
Publication year	2023
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2022.)
JaLC DOI	
Abstract	哺乳類の発生期大脳新皮質では、脳室面付近で誕生した神経細胞は脳表面下の辺縁帯直下まで移動し、その後に神経細胞同士が互いに集積する。本研究では、この細胞集積の分子メカニズムを解明することを目的に研究を行った。 分泌タンパク質Reelinの下流で機能する細胞接着関連分子を同定し、これらの分子が脂質ラフトに移行することで、N-カドヘリン依存的な細胞間接着力の増強が起こることを見出した。また、Pachygyria患者から見つかったReelin点変異体について、分泌機能、受容体との結合親和性および、Reelinにより誘導される細胞凝集塊形成への影響の観点から検証を行い、その機能不全の原因を明らかにした。 In the developing mammalian neocortex, neurons born in or near the ventricular zone migrate to just beneath the Marginal Zone below the brain surface, and then they subsequently accumulate with each other. In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanism of this neuronal accumulation. We identified cellular adhesion-related molecules that function downstream of the secreted protein Reelin, and found that their translocation into lipid rafts leads to N-cadherin-dependent cellular adhesion. We also examined a Reelin point mutant found in a pachygyria patient in terms of the extracellular secretory ability, receptor binding affinity, and effects on Reelin-induced neuronal aggregate formation, and clarified the cause of the dysfunction.
Notes	研究種目 : 基盤研究 (C) (一般) 研究期間 : 2018 ~ 2022 課題番号 : 18K06842 研究分野 : 神経発生学 PDFファイルは改訂版に差し替え (2025.3.10)
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18K06842seika

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　６ 年　 ４ 月 １９ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2022
課題番号：１８Ｋ０６８４２

研究課題名（和文）発生期にリーリンにより誘導される神経細胞凝集は大脳新皮質層構造の起点となるか？

研究課題名（英文）Are neuronal aggregates induced by Reelin the starting point of neocortical layers?

研究代表者
林　周宏（Hayashi, Kanehiro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：６０３７３３５４

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）：哺乳類の発生期大脳新皮質では、脳室面付近で誕生した神経細胞は脳表面下の辺縁帯直下まで移動し、その後に神経細胞同士が互いに集積する。本研究では、この細胞集積の分子メカニズムを解明することを目的に研究を行った。
分泌タンパク質Reelinの下流で機能する細胞接着関連分子を同定し、これらの分子が脂質ラフトに移行することで、N-カドヘリン依存的な細胞間接着力の増強が起こることを見出した。また、Pachygyria患者から見つかったReelin点変異体について、分泌機能、受容体との結合親和性および、Reelinにより誘導される細胞凝集塊形成への影響の観点から検証を行い、その機能不全の原因を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
哺乳類大脳新皮質の6層構造は脳の高次機能を担っており、その破綻は精神疾患の要因となりうるため、6層構造形成機構の解明は重要な課題であるが、いまだ明らかにされていない。本研究では、移動直後の神経細胞の挙動に着目して、Reelinを起点として神経細胞が互いに集合する分子メカニズムの一端を解明した。またReelinは複数の精神疾患の原因遺伝子として同定されており、その発症メカニズムを明らかにすることは医学的に急務である。本研究でPachygyria患者で見つかったReelin変異の機能不全のメカニズムを明らかにでき、この結果は、病因解明や他精神疾患の原因究明に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）： In the developing mammalian neocortex, neurons born in or near the ventricular zone migrate to just beneath the Marginal Zone below the brain surface, and then they subsequently accumulate with each other. In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanism of this neuronal accumulation.
We identified cellular adhesion-related molecules that function downstream of the secreted protein Reelin, and found that their translocation into lipid rafts leads to N-cadherin-dependent cellular adhesion. We also examined a Reelin point mutant found in a pachygyria patient in terms of the extracellular secretory ability, receptor binding affinity, and effects on Reelin-induced neuronal aggregate formation, and clarified the cause of the dysfunction.

研究分野：神経発生学

キーワード：大脳新皮質　層構造　Reelin　N-カドヘリン

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

哺乳類大脳新皮質の神経細胞は、発生期に脳室付近で誕生し、皮質内を脳表面に向かって放線上に移動する。この時、各神経細胞は個別に移動して、細胞同士の協調は見られない。しかしながら、移動神経細胞が脳辺縁帯下まで達し移動を終えると、誕生時期の同じ細胞同士が互いに凝集するのが観察される。その後、これらの神経細胞は後から誕生した神経細胞に追い越され皮質深部に位置するが、凝集した神経細胞同士は一群のまま層を形成し、最終的に 6 層構造となる。同層内の神経細胞は誕生時期が同じで、入力元および投射先が一様であり、複雑な情報処理等の高次機能を発揮するのに必須な役割を果たしている。しかしながら、層構造形成メカニズムは未だほとんど分かっていない。

Reelin は、主に発生期大脳皮質辺縁帯に局在するカハール・レチウス細胞から分泌される糖タンパク質である。Reelin 欠損マウスでは辺縁帯直下での移動細胞による細胞凝集が見られない。また、筆者の所属する研究室では、以前に発生期マウスの大脳新皮質中に Reelin を異所的に発現させると神経細胞凝集が誘導されることを見出している。これらのことより、辺縁帯直下で起こる神経細胞凝集は、Reelin によって誘発される可能性が示唆された。さらに筆者らは、Reelin により神経細胞表面の N-カドヘリン依存的な接着力が増強すること、および、N-カドヘリンを発現抑制すると、Reelin により誘導される細胞凝集形成に異常を生じさせることを発見し報告している(Matsunaga *et al.*, 2017, PNAS)。

２．研究の目的

上記の結果より、辺縁帯直下で移動神経細胞が Reelin を感受することにより、細胞膜表面の N-カドヘリン依存性接着力が亢進され、神経細胞凝集が誘導されると示唆された。また、Reelin 欠損マウスでは大脳新皮質の層構造も形成されないことから、この細胞凝集が層構造形成の礎となると仮説を立てた。

本研究では、（１）哺乳類大脳新皮質の辺縁帯直下で移動を終えたばかりの神経細胞が凝集する現象に着目し、Reelin 分子を起点にした分子メカニズムを理解することを目的とする。（２）また、Pachygyria 患者で見つかった Reelin 点変異体を発生期大脳新皮質中に異所的に発現させると、誘導される神経細胞凝集塊が異形成になることを見つけた。この変異 Reelin の機能障害メカニズムを探求することにより、Reelin による細胞凝集メカニズムの解明を目指す。

３．研究の方法

（１） Reelin による神経細胞凝集メカニズムの解明

Reelin を受容した神経細胞で、Reelin シグナルのハブタンパク質として働く Dab1 分子が脂質ラフトに集積することを示唆するデータが得られた。そこで、Dab1 cDNA に脂質ラフト移行シグナルを付加した発現プラスミドを作製して神経細胞に導入したところ、これらの神経細胞で N-カドヘリンタンパク質に対する接着力の増強が認められた。この結果から、Reelin による細胞接着力の増強カスケードは、脂質ラフトがシグナル伝達の場となることが示唆された。続いて、Reelin 刺激後に神経細胞上の脂質ラフトに局在するタンパク質の同定を行った。分散神経細胞に Reelin 添加後に細胞を溶解し、脂質ラフト画分を分画して局在する分子の網羅的解析を行い、Reelin 刺激の有無で脂質ラフト局在に差の生じる分子を同定した。さらに同定分子の中から、細胞接着に関連のある分子を選択した。また、既知の Reelin 下流分子で細胞接着に関連のある分子が Reelin 刺激により脂質ラフトに局在するか否かも検討した。その結果、PI3-Kinase、Girdin、Rabep1 等の分子が候補として残った。続いて、各候補分子に対するノックダウンベクターを作製し、Reelin により誘導される神経細胞凝集への影響を調べた。その結果、PI3-Kinase をノックダウンした時に Reelin により誘導される神経細胞凝集塊が異形態になることが分かり、PI3-Kinase が Reelin の下流で N-カドヘリン制御に働くことがわかった。

（２） Pachygyria 患者から得られた Reelin 点変異による機能異常メカニズムの解析

Pachygyria 患者で同定された Reelin の点変異による機能異常について解析を行った。初めに、Reelin によって形成される神経細胞凝集塊への影響について検証した。前述のように、野生型 Reelin を発生期マウス大脳新皮質に異所性発現させると凝集塊を形成する。その内部構造は指向性があり、構成する各神経細胞の細胞体が辺縁部に位置し、先導突起が凝集塊の中心部に伸びている。一方、変異型 Reelin を発生期マウス大脳新皮質に異所性発現させると、凝集塊自体は形成されるが細胞体が中央部まで侵入して、突起の伸長方向がランダムである異形態になることを見つけた。続いて、変異 Reelin の細胞外への分泌能を解析するため、変異 Reelin もしくは野生型 Reelin を HEK293T 培養細胞に導入し、培養液中に分泌される Reelin タンパク質量を比較したところ、野生型 Reelin と比較して変異型 Reelin では有意に細胞外分泌量が減少しており、逆に細胞内残存量が増加していることを観察した。最後に、変異 Reelin の Reelin 受容体との結合力を検証した。Reelin 受容体は ApoER2、VLDLR、NRP1 の 3 種類報告されている。各受容体を培養細胞に発現させ、その後に野生型 Reelin もしくは変異型 Reelin を培養液中に添加し、Reelin の細胞への接着レベルを比較検討した。その結果、VLDLR に対する結合力は、野生型 Reelin

と変異型 Reelin の間に有意な差は認められなかったが、NRP1 に対しては野生型 Reelin と比較して変異型 Reelin では結合が低下することを発見した。

４．研究成果

50 年以上前に自然発症 Reelin 欠損マウスが発見されて以来、多くの研究者により Reelin の研究が為されており、Reelin 受容体や Dab1 などの下流分子が発見されてきた。その機能も様々報告されており、誘因因子としての機能の報告がある一方、放射状グリア細胞からの遊離シグナルや terminal translocation と呼ばれる細胞移動モードへのスイッチングとしての役割も報告されている。しかしながら、既存の報告を組み合わせても Reelin 欠損マウスで見られた大脳新皮質層構造の逆位を説明できない。今回、筆者は Reelin の新たな機能である細胞凝集誘導に着目した。Reelin は発生期大脳新皮質の辺縁帯に局在しており、神経細胞が移動の最終段階で Reelin を受容することができる。今回の研究で、神経細胞が Reelin を受容することにより Dab1 が脂質ラフトに移動し、N-カドヘリン依存性の細胞間接着力が増強することを見出した。脂質ラフトはコレステロールが豊富なマイクロドメインで、外部からの刺激に反応して種々のタンパク質が脂質ラフトに集合し、シグナル伝達が効率よくなされる。Reelin シグナルも、このメカニズムを用いて迅速に N-カドヘリン依存的な細胞間接着力を増強させていると考えられる。実際に、本研究で神経細胞が Reelin を感受することにより、Dab1 以外にも複数の分子が脂質ラフトに移行することを見出した。このメカニズムにより、移動神経細胞が Reelin に即座に反応して、辺縁帯の直下で移動を停止し、神経細胞同士が互いに凝集する仕組みになっている可能性が考えられる。この現象が実際に大脳新皮質の層構造形成に繋がるかどうか、今後検証していきたい。

今回、Pachygyria 患者から得られた Reelin の点変異により、Reelin による細胞凝集誘導機能、分泌能、受容体との親和性と Reelin の複数の機能が障害されることを見つけた。Reelin 受容体の機能解析は、VLDLR と ApoER2 を通したカスケードの研究が主であるが、NRP1 を介したシグナル伝達は全く分かっていない。今回の結果は、Reelin の NRP1 を介した機能活性が生体の発達に重要な役割を果たすことを示した。今後、Reelin の NRP1 を介した活性機構の詳細を解明していく予定である。また、複数の研究者から、Reelin 遺伝子の変異による精神疾患の発症報告がなされているが、その発症メカニズムは全く分かっていない。Pachygyria は神経細胞の移動障害が原因と考えられている。今回の研究結果が Reelin 遺伝子の異常を起因とする精神疾患の病因解明に繋がる可能性もありうる。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計4件（うち査読付論文　4件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Kanadome Takashi, Hayashi Kanehiro, Seto Yusuke, Eiraku Mototsugu, Nakajima Kazunori, Nagai Takeharu, Matsuda Tomoki	４．巻 7
２．論文標題 Development of intensiometric indicators for visualizing N-cadherin interaction across cells.	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Communications biology	６．最初と最後の頁 1065
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-04023-2	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 －

１．著者名 Minkyung Shin, Ayako Kitazawa, Satoshi Yoshinaga, Kanehiro Hayashi, Yukio Hirata, Colette Dehay, Ken‐ichiro Kubo, Kazunori Nakajima	４．巻 527
２．論文標題 Both excitatory and inhibitory neurons transiently form clusters at the outermost region of the developing mammalian cerebral neocortex.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 The Journal of Comparative Neurology	６．最初と最後の頁 1577-1597
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.24634	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 該当する

１．著者名 Inoue Seika、Hayashi Kanehiro、Fujita Kyota、Tagawa Kazuhiko、Okazawa Hitoshi、Kubo Ken-ichiro、Nakajima Kazunori	４．巻 39
２．論文標題 Drebrin-like (Dbnl) Controls Neuronal Migration via Regulating N-Cadherin Expression in the Developing Cerebral Cortex	５．発行年 2018年
３．雑誌名 The Journal of Neuroscience	６．最初と最後の頁 678～691
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.1634-18.2018	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 Shin Minkyung、Kitazawa Ayako、Yoshinaga Satoshi、Hayashi Kanehiro、Hirata Yukio、Dehay Colette、Kubo Ken‐ichiro、Nakajima Kazunori	４．巻 527
２．論文標題 Both excitatory and inhibitory neurons transiently form clusters at the outermost region of the developing mammalian cerebral neocortex	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Journal of Comparative Neurology	６．最初と最後の頁 1577～1597
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.24634	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 －

〔学会発表〕　計13件（うち招待講演　1件／うち国際学会　2件）

1．発表者名
林周宏、井上聖香、久保健一郎、中尾信彦、安達泰治、仲嶋一範

2．発表標題
分泌性糖タンパク質リーリンによるN-カドヘリン輸送制御

3．学会等名
第45回日本神経科学大会・第64回日本神経化学会大会・第32回日本神経回路学会大会合同大会（Neuro2022）

4．発表年
2022年

1．発表者名
林光太郎、林周宏、本田岳夫、Nadia Bahi-Buisson、Alessandra Pierani、仲嶋一範

2．発表標題
哺乳類発生期大脳新皮質で移動神経細胞が辺縁帯直下で移動を停止するメカニズム

3．学会等名
第45回日本神経科学大会・第64回日本神経化学会大会・第32回日本神経回路学会大会合同大会（Neuro2022）

4．発表年
2022年

1．発表者名
Kotaro Hayashi, Kanehiro Hayashi, Takao Honda, Nadia Bahi-Buisson, Alessandra Pierani, and Kazunori Nakajima

2．発表標題
How do neurons stop migration just beneath the marginal zone in the developing neocortex?

3．学会等名
International Symposium: Development and Plasticity of the Brain（国際学会）

4．発表年
2022年

1．発表者名
林周宏、久保健一郎、仲嶋一範

2．発表標題
分泌性糖タンパク質ReelinによるN-cadherin動態制御

3．学会等名
第94回日本生化学会大会

4．発表年
2021年

１．発表者名
北澤彩子、吉永怜史、シン ミンギョン、林周宏、佐野ひとみ、大石康二、久保健一郎、仲嶋一範

２．発表標題
移植と新規開発した細胞減少培養系を用いた海馬CA1および大脳新皮質錐体細胞の移動様式を決定する要因の探索

３．学会等名
第44回日本分子生物学会年会（招待講演）

４．発表年
2021年

１．発表者名
林 周宏 、井上聖香、仲尾信彦、久保健一郎、安達泰治、仲嶋一範

２．発表標題
分泌性糖タンパク質ReelinによるN-cadherin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（Neuro2019）

４．発表年
2019年

１．発表者名
北澤彩子、シン ミンギョン、林周宏、久保健一郎、仲嶋一範

２．発表標題
マウス海馬CA1と大脳新皮質錐体細胞の放射状グリア線維依存的な移動様式の違いについての解析

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（Neuro2019）

４．発表年
2019年

１．発表者名
久保健一郎、シン ミンギョン、北澤彩子、吉永怜史、林周宏、仲嶋一範

２．発表標題
発生中の大脳新皮質において辺縁帯直下に認める比較的未成熟な神経細胞の凝集構造についての知見

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
北澤彩子、シン ミンギョン、林周宏、久保健一郎、仲嶋一範

２．発表標題
異所移植による発生期のマウス海馬CA1及び大脳新皮質の移動についての解析

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
Seika Inoue, Kanehiro Hayashi, Kyota Fujita, Kazuhiko Tagawa, Hitoshi Okazawa, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima

２．発表標題
Drebrin-like (Dbnl) controls neuronal migration via regulating N-cadherin expression in the developing mouse cerebral neocortex

３．学会等名
2018 The American Society for Cell Biology (ASCB) Annual Meeting（国際学会）

４．発表年
2018年

１．発表者名
Kanehiro Hayashi, Nobuhiko Nakao, Seika Inoue, Taiji Adachi, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima

２．発表標題
Reelin controls N-cadherin-dependent neuronal adhesion by a couple of mechanisms in the developing mouse cortex

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
Seika Inoue, Kanehiro Hayashi, Kyota Fujita, Kazuhiko Tagawa, Hitoshi Okazawa, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima

２．発表標題
Reelin-DBNL signaling regulates neuronal migration via N-cadherin/α-N-catenin complex in the intermediate zone and multipolar cell accumulation zone of the developing mouse cerebral neocortex

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 林周宏、井上聖香、久保健一郎、仲嶋一範
２．発表標題 発生期哺乳類大脳皮質における神経細胞移動は癌細胞の間葉上皮転換と同じ仕組みを持つか？
３．学会等名 第37回分子病理学研究会はがくれシンポジウム
４．発表年 2018年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

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

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	パリ大学			