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

Title	大脳皮質形成期における脳室下帯ニューロン移動の分子機構
Sub Title	Molecular mechanisms underlying neuronal migration during neocortical development
Author	廣田, ゆき(Hirota, Yuki)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
JaLC DOI	
Abstract	哺乳類大脳皮質発生において, 細胞外糖蛋白質リーリンは受容体ApoER2とVLDLRに結合してシグナルを伝達することによってニューロン移動を制御するが, その作用機構には不明な点が残されている。我々はApoER2ノックアウトマウスにおいて (1) 中間帯でのニューロン移動が障害されること, (2) ニューロンが辺縁帯直下で正常に停止せず辺縁帯内部へ侵入することを見出した。また下流分子を検討し, Rap1, integrin, Aktが辺縁帯下部でのニューロンの移動停止に, Aktが中間帯でのニューロン移動に関与することを明らかにした。これらの結果から, ニューロン移動におけるApoER2の作用機構が明らかになった。 The extracellular protein Reelin sends signals to various downstream molecules by binding to its receptors, ApoER2 and VLDLR and exerts essential roles in the formation of the mammalian layered neocortex. Here, we we found that the neurons ectopically invaded the MZ and that neuronal migration was disrupted in the intermediate zone in the Apoer2 KO mice. Expression of ApoER2 partially but significantly rescued Apoer2 KO phenotype, suggesting that ApoER2 control migratory behavior of neurons by both cell-autonomous and non-cell-autonomous manners. As for cell-autonomous functions, we found that Rap1/integrin α5 and Akt restored the failure of termination of migration beneath the MZ and neuronal migration in the IZ of Apoer2 KO mice. These data indicate that ApoER2 controls multiple processes in neuronal migration, including the early stage of radial migration and termination of migration beneath the MZ in the developing cerebral cortex.
Notes	研究種目：基盤研究(C)(一般) 研究期間：2013～2016 課題番号：25440114 研究分野：神経発生生物学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25440114seika

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

平成 ２９ 年　 ５ 月 ２９ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2016
課題番号：２５４４０１１４

研究課題名（和文）大脳皮質形成期における脳室下帯ニューロン移動の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms underlying neuronal migration 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）　　4,100,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類大脳皮質発生において、細胞外糖蛋白質リーリンは受容体ApoER2とVLDLRに結合してシグナルを伝達することによってニューロン移動を制御するが、その作用機構には不明な点が残されている。我々はApoER2ノックアウトマウスにおいて(1)中間帯でのニューロン移動が障害されること、(2)ニューロンが辺縁帯直下で正常に停止せず辺縁帯内部へ侵入することを見出した。また下流分子を検討し、Rap1、integrin、Aktが辺縁帯下部でのニューロンの移動停止に、Aktが中間帯でのニューロン移動に関与することを明らかにした。これらの結果から、ニューロン移動におけるApoER2の作用機構が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The extracellular protein Reelin sends signals to various downstream molecules by binding to its receptors, ApoER2 and VLDLR and exerts essential roles in the formation of the mammalian layered neocortex. Here, we we found that the neurons ectopically invaded the MZ and that neuronal migration was disrupted in the intermediate zone in the Apoer2 KO mice. Expression of ApoER2 partially but significantly rescued Apoer2 KO phenotype, suggesting that ApoER2 control migratory behavior of neurons by both cell-autonomous and non-cell-autonomous manners. As for cell-autonomous functions, we found that Rap1/integrin α5 and Akt restored the failure of termination of migration beneath the MZ and neuronal migration in the IZ of Apoer2 KO mice. These data indicate that ApoER2 controls multiple processes in neuronal migration, including the early stage of radial migration and termination of migration beneath the MZ in the developing cerebral cortex.

研究分野：神経発生生物学

キーワード：大脳皮質　層構造　ニューロン移動　リーリンシグナル

１．研究開始当初の背景

哺乳類大脳皮質は６層構造を持ち、各層を構成するニューロンはそれぞれ異なる領域に投射する。この層構造に異常が生じる病態は、てんかん・知的障害・精神疾患の原因になりうるとして注目されている。このように脳機能が正常に発揮されるためには、正しく神経回路網が形成されるための基盤として個々のニューロンが正確な位置に配置されることが重要である。大脳皮質のニューロンの70-80%は興奮性ニューロンに占められる。興奮性ニューロンの多くは胎生期に脳室壁に面した脳室帯または脳室下帯で誕生し、脳表面の辺縁帯直下まで放射状に移動して停止する。この際、より遅い時期に誕生したニューロンが表層へと移動することにより、inside-out 様式と呼ばれる整然とした層構造が形成される。

この移動過程においてニューロンは移動様式を段階的に変化させる事が知られている。まず脳室帯から脳室下帯へと移動し、一過性に多数の神経突起を有する多極性ニューロンと呼ばれる細胞となる。多極性ニューロンは２４時間程度脳室下帯内をゆっくり移動しながら滞留したのちに、双極性ニューロンに変化し、高速度の移動様式で放射状に移動して皮質板に入り、最終目的地に達する。脳室下帯で多極性ニューロンを経る生理的意義は明らかにされていないが、多極性ニューロンはのちに高等哺乳類に特徴的な２層から４層を構成する細胞となること、その形態は複数の分子経路により厳密に制御されることが明らかにされており、大脳皮質の高次機能獲得の過程で樹立した精巧な多層構造形成メカニズムの一つのステップとして世界中から注目を集めている。

リーリン遺伝子は顕著な層構造異常を伴う自然発症突然変異マウスの原因遺伝子として同定され、巨大細胞外糖蛋白質をコードする。リーリン欠損マウスでは、ニューロンが移動途中で停止し、下部に次々に蓄積するために層構造がほぼ逆転する。リーラーマウスと同様の表現型を示す変異マウスの原因遺伝子産物 Dab1、及びリポ蛋白質受容体である ApoER2, VLDLR が同定されたのを皮切りに、リーリン発見から今日に至るまでの半世紀の間に世界中で研究が進みリーリンの下流で機能する多様な分子群が見いだされた。これらの分子群は最終的にアクチン・微小管の制御を介して細胞骨格を調節すると考えられている。

このようにリーリンシグナルの分子機構の詳細が解明されてきた一方で、実際にリーリン蛋白質がニューロン移動のどのステップでどのような細胞内イベントに関わるかは不明な点が多い。これまでの研究の殆どでは、リーリンは脳表層の辺縁帯に存在するカハールレチウス細胞から高濃度で分泌され、移動ニューロンに作用すると考えられてきたが、近年カハールレチウス細胞の大部分を除去しても、正常な層構造が形成されることが報告された(Yoshida et al., 2006)。また応募者が所属する研究グループは最近、リーリンを異所的に皮質内に発現させると、中間帯においてニューロンが凝集し、層構造と類似した構造を形成することを報告した(Kubo et al., 2010)。このことから、ニューロンは移動開始直後から、リーリン蛋白質に反応し層構造を形成するために必要な受容体などの分子群セットを有していると推測される。我々はこの知見に基づき、微弱なリーリン蛋白質に反応する抗体を探索し、脳室下帯で発現するリーリンを検出することに成功した。これらの独自の知見は、脳室下帯でのニューロン移動にリーリンシグナルが関与する可能性を示唆しているが、その作用メカニズムは未解明である。

２．研究の目的

本研究では、皮質形成過程において移動開始直後の多極性ニューロンの移動を制御する候補因子として、リーリンシグナルの作用機序を明らかにし、移動ニューロンが適確に層形成する能力を獲得する分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

３．研究の方法

（１）リーリンシグナルが移動ニューロンに作用するタイミングを調べるため、受容体 ApoER2とVLDLRの発現パターンを明らかにす

ることが重要である。そこで受容体に対するモノクローナル抗体を作成し、発生の各段階の胎生脳における発現パターンを各種マーカーとの共染色により調べた。

（２）ApoER2ノックアウトマウスを用いた解析：脳室下帯におけるリーリンと受容体ApoRE2の発現に着目し、ApoER2機能阻害によりこの領域でのリーリンシグナルの作用を解析した。ApoER2ノックアウト(KO)マウスでは皮質層構造が部分的に異常になることが報告されているが(Trommsdorff et al., 1999)、脳室下帯における影響は未だ報告がない。ApoER2 KOマウス（入手済）における脳室下帯内でのニューロン移動への影響を調べるために、子宮内電気穿孔法により、胎生14日の脳室帯で誕生したニューロンを標識し、経時的に細胞分布を解析した。

（３）ApoER2 KOマウスでの細胞移動の異常が生じるメカニズムを明らかにするために、ApoER2全長、下流シグナル因子を発現するベクターを子宮内電気穿孔法により導入し、細胞移動に与える影響を調べた。また、細胞外基質CSPGが細胞移動を阻害している可能性を調べるために、CSPG分解酵素の発現ベクターを導入し、細胞移動に与える影響を調べた。

４．研究成果

（１）ApoER2とVLDLRの発現パターンを調べた結果、辺縁帯に両者が発現し、中間帯下部に ApoER2が発現することを見出した。

（２）ApoER2 KOマウスにおいて(1)中間帯でのニューロン移動が障害されること、(2)ニューロンが辺縁帯直下で正常に停止せず辺縁帯内部へ侵入することを見出した。

（３）ApoER2 KOマウスのニューロン移動異常の出現するメカニズムを調べるため、まず**ApoER2全長の発現の効果を調べたところ、**中間帯でのニューロン移動と辺縁帯内部へのニューロンの侵入がともに部分的に回復した。このことから、ApoER2は細胞自律的に必要であると示唆された。また、中間帯ではMAP2/CSPG陽性の帯状構造の下部でニューロン移動が障害されていることに着目した。CSPGはニューロン反発作用を示すことが知られているので、CSPG分解酵素Chondroitinase ABCの発現ベクターを導入し、ApoER2欠損ニューロンの移動が回復するかを検討したところ、回復効果は見られなかった。次にリーリンシグナル下流で働くことが知られているRap1、integrin、N-Cadherinの関与を検討するために恒常的活性型Rap1およびintegrin α5、N-Cadherin、Aktを発現させ影響を調べた。その結果、Rap1、integrin、Aktは辺縁帯内へのニューロンの侵入を、Aktは中間帯でのニューロン移動障害を回復させた。これらの結果から、ニューロン移動におけるApoER2の下流シグナルが明らかになり、ApoER2を介した大脳皮質ニューロン移動の制御機構が明らかになった。

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　3　件）

① Hirota, Y., Kubo, K., Fujino, T., Yamamoto,T., Nakajima, K. (2016) ApoER2 controls not only neuronal migration in the intermediate zone, but also termination of migration in the developing cerebral cortex. Cerebral Cortex. In press. **査読あり、**DOI: 10.1093/cercor/bhw36

② *Ishii, K., *Nagai, T., *Hirota, Y., Noda, M., Nabeshima, T., Yamada, K., Kubo, K., Nakajima, K. Reelin has a preventive effect on phencyclidine-induced cognitive and sensory-motor gating deficits. *Neurosci. Res.*, 96, 30–36 (2015). *equal contribution. **査読あり、**DOI: 10.1016/j.neures.2014.12.013

③ Hirota, Y., Kubo, K., Katayama, K., Honda, T., Fujino, T., Yamamoto,T., 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. **査読あり、**DOI: 10.1002/cne.23691

〔学会発表〕（計　14 件）

① **廣田ゆき、久保健一郎、藤野貴広、山本徳男、仲嶋一範.** “**リーリン受容体**ApoER2 **による大脳皮質ニューロン移動と停止の制御機構**” **第** 122 **回日本解剖学会総会・全国学術集会、**2017 **年** 3

月 28 日. 長崎大学坂本キャンパス(長崎県・長崎市)

② Hirota, Y., Kubo, K., Fujino, T., Yamamoto, T., Nakajima, K. ApoER2 controls neuronal migration in the intermediate zone andtermination of migration in the developing cerebral cortex" The 28th CDB Meeting "Cilia and Centrosomes: Current Advances and Future Directions" 2016 年 11 月 29 日. RIKEN CDB (兵庫県・神戸市)

③ Hirota, Y., Kubo, K., Fujino, T., Yamamoto, T., Nakajima, K. "Roles of ApoER2 in neuronal migration and termination of migration in the developing cerebral cortex" 第 39 回日本神経科学大会, 2016 年 7 月 21 日. パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）,

④ 廣田ゆき、久保健一郎、藤野貴広、山本徳男、仲嶋一範. "ApoER2 controls not only neuronal migration but also termination of migration in the developing cerebral cortex" 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2016 年 3 月 29 日. ビッグパレットふくしま（福島県・郡山市）

⑤ 廣田ゆき, 久保健一郎, 本田岳夫, 藤野貴広, 山本徳男, 仲嶋一範. "リーリン受容体 ApoER2 と VLDLR の大脳皮質形成過程における発現と機能" 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学会大会合同年会, 2014 年 9 月 30 日. 奈良県文化会館・奈良県新公会堂（奈良県・奈良市）

⑥ Hirota, Y., Kubo, K., Nakajima, K. "Regulation of migratory behavior of excitatory neurons by the Reelin signaling via its receptors" 24th Biennial International Society for Neurochemistry (ISN) Meeting, 2013 年 4 月 22 日. カンクン（メキシコ）

〔その他〕
ホームページ等
http://plaza.umin.ac.jp/~Nakajima/

６．研究組織
(1)研究代表者
廣田　ゆき（HIROTA YUKI）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：00453548