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

Title	大脳皮質層構造の形成を制御する分子機構の解明
Sub Title	Analysis of molecular mechanisms that regulate neocortical layer structure formation
Author	久保, 健一郎(Kubo, Kenichiro) 松永, 友貴(Matsunaga, Yuki) 井上, 聖華(Inoue, Seika) Shin, Minkyung
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	リーリンが大脳皮質の神経細胞間の接着力を高めて集合させる機能を持つことを, 分散した神経細胞を用いて直接証明した。また, リーリンによる接着力の増強は, 細胞接着分子のN-カドヘリンを介して行われることを発見した。N-カドヘリンの機能を阻害すると, リーリンを加えても神経細胞は集合しなくなることから, リーリンが N- カドヘリンを使って神経細胞同士を接着させることが明らかになった。さらに, 原子間力顕微鏡を使って, N-カドヘリンを介した神経細胞の接着力を直接測定した。その結果, リーリンによる神経細胞の接着力増強は持続的なものではなく, 一度強まった接着がその後弱まる一時的な現象であることが明らかになった。 Reelin is an essential glycoprotein for the establishment of the highly organized six-layered structure of neurons of the mammalian neocortex. Although the role of Reelin in the control of neuronal migration has been extensively studied at the molecular level, the mechanisms underlying Reelin-dependent neuronal layer organization are not yet fully understood. In this research, we directly showed that Reelin promotes adhesion among dissociated neocortical neurons in culture. The Reelin-mediated neuronal aggregation occurs in an N-cadherin-dependent manner, both in vivo and in vitro. We directly measured the adhesive force between neurons and N-cadherin by atomic force microscopy, and found that Reelin indeed enhanced the adhesiveness of neurons to N-cadherin ; this enhanced adhesiveness began to be observed at 30 min after Reelin stimulation, but declined by 3 h. These results suggest that Reelin transiently (and not persistently) promotes N-cadherin-mediated neuronal aggregation.
Notes	研究種目 : 基盤研究(C)(一般) 研究期間 : 2014 ~ 2017 課題番号 : 26430075 研究分野 : 神経発生
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26430075seika

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　３０　年　　６　月　　３　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　基盤研究(C)（一般）
研究期間：　2014～2017
課題番号：　２６４３００７５

研究課題名（和文）大脳皮質層構造の形成を制御する分子機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanisms that regulate neocortical layer structure formation

研究代表者

久保　健一郎（Kubo, Ken-ichiro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：２０３４８７９１

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）：リーリンが大脳皮質の神経細胞間の接着力を高めて集合させる機能を持つことを、分散した神経細胞を用いて直接証明した。また、リーリンによる接着力の増強は、細胞接着分子のN-カドヘリンを介して行われることを発見した。N-カドヘリンの機能を阻害すると、リーリンを加えても神経細胞は集合しなくなることから、リーリンが N-カドヘリンを使って神経細胞同士を接着させることが明らかになった。さらに、原子間力顕微鏡を使って、N-カドヘリンを介した神経細胞の接着力を直接測定した。その結果、リーリンによる神経細胞の接着力増強は持続的なものではなく、一度強まった接着がその後弱まる一時的な現象であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Reelin is an essential glycoprotein for the establishment of the highly organized six-layered structure of neurons of the mammalian neocortex. Although the role of Reelin in the control of neuronal migration has been extensively studied at the molecular level, the mechanisms underlying Reelin-dependent neuronal layer organization are not yet fully understood. In this research, we directly showed that Reelin promotes adhesion among dissociated neocortical neurons in culture. The Reelin-mediated neuronal aggregation occurs in an N-cadherin-dependent manner, both in vivo and in vitro. We directly measured the adhesive force between neurons and N-cadherin by atomic force microscopy, and found that Reelin indeed enhanced the adhesiveness of neurons to N-cadherin; this enhanced adhesiveness began to be observed at 30 min after Reelin stimulation, but declined by 3 h. These results suggest that Reelin transiently (and not persistently) promotes N-cadherin-mediated neuronal aggregation.

研究分野：　神経発生

キーワード：　リーリン　　N-カドヘリン　　接着　　大脳皮質　　発生　　層構造

１．研究開始当初の背景

哺乳類の脳には、神経細胞が整然と配置する層構造が存在する。この層構造が逆転した変異マウス、リーラー(*reeler*)は 50 年以上前に発見され、その原因遺伝子・分子リーリン(Reelin)は発見から 20 年近くが経過した。また、リーリンシグナルの下流に位置する様々な分子が報告された。それにもかかわらず、リーリン分子が発生中の神経細胞に対してどのような役割を持っているのか、また最終的にどのような分子を制御して脳の層構造形成を担うのか、依然として不明な点が多い。要因の一つに、試験管内では実際の生体（*in vivo*）の脳内における環境を再現することが困難で、神経細胞を試験管内に移すと形質が異なったものになることが考えられた。

このため、発生中の生体マウス脳内に、子宮内胎児電気穿孔法によるリーリン発現プラスミドの導入およびリーリン発現細胞の移植を行い、その影響を解析したところ、特徴的な神経細胞の凝集構造がリーリンによって形成されることを見いだした（Kubo K *et al., J. Neurosci.,* 2010）。さらに、実際の生体内で発生中の大脳新皮質において、リーリンが発現する辺縁帯（MZ）の直下に、細胞密度が高く、細胞凝集が起きていることが示唆される原皮質帯（Primitive Cortical Zone; PCZ)が形成されることを見いだした（Sekine K et al., J. Neurosci., 2011）。

このように、生体内において、リーリンは神経細胞同士の接着／凝集に関与している可能性が生じているが、それがどのような分子によって制御され、またそれが大脳皮質形成においてどのような役割を持っているのかについては、依然として不明のままであった。そこで、リーリンがどのような分子を制御して神経細胞の凝集を生じるのかを明らかにしたいと考えた。

２．研究の目的

本研究ではリーリンが神経細胞の凝集を生じる際に、最終的に制御する分子を明らかにすることを目的とした。

（１）リーリンによって制御されて凝集に関わる接着分子の同定

リーリンによって制御されて凝集に関わる分子を明らかにするため、細胞間の接着に関わる分子に注目して解析を行った。

（２）リーリンによるＮカドヘリン制御メカニズムの解析

細胞間の接着に関わる分子のうち、Ｎ カドヘリンに着目して、リーリンがＮカドヘリンを制御するメカニズムを明らかにするための解析を行った。

３．研究の方法

（１）リーリンによって制御されて凝集に関わる接着分子の同定

リーリンによってどのように接着分子が制御されて細胞凝集を生じるのかを明らかにするため、子宮内胎児電気穿孔法によってリーリン発現プラスミドを導入する際に、ワイルトダイプやドミナントネガティブ体の接着分子の発現ベクターや、接着分子をノックダウンするための siRNA ベクターをリーリン発現プラスミドとともに導入して、リーリンによって誘導される神経細胞の凝集構造への影響を解析した。また、この現象の特異性を検証するために、ノックダウン抵抗性の接着分子を発現するベクターを作成し、これを用いたレスキュー実験を行った。

（２）リーリンによるＮカドヘリン制御メカニズムの解析

神経細胞上のＮカドヘリンがリーリン刺激の前後でどのような制御を受けるのかを確認するため、リーリン刺激の前後で活性や分布の変化が起こるかどうか、分散培養をおこなった上で、培養細胞表面のＮカドヘリン分布やＮ カドヘリン発現量を、免疫染色法やWestern ブロット法を用いて解析した。さらに、Ｎ カドヘリンへの結合力を一細胞ごとに解析できる、原子間力顕微鏡を用いた解析を行った。

４．研究成果

（１）リーリンによって制御されて凝集に関わる接着分子の同定

リーリンが制御する分子の候補として、まず、細胞間の接着に関わる分子に注目して解析を行った。

当初は、リーリンシグナルの下流に位置することが知られる、α１β５インゲグリンとＮ カドヘリンの両方に注目して解析を行った。発生中マウス脳内に、子宮内胎児電気穿孔法を用いて、ワイルトダイプやドミナントネガティブ体の接着分子の発現ベクターや、これらの接着分子をノックダウンするための siRNA ベクターをリーリン発現プラスミドとともに導入した。その結果、α１β５インゲグリンとＮカドヘリンのいずれも、機能阻害を行った際に、リーリンによる神経細胞の凝集構造の形成に影響を及ぼすが、Ｎ カドヘリンの方がその影響が大きいことが明らかになった。この解釈としては、Ｎ カドヘリンの方がより持続的に細胞同士の接着に関わる可能性が考えられた。

この現象の特異性を検証するために、ノックダウン抵抗性のＮカドヘリンを作成し、これを用いたレスキュー実験を行ったところ、RNAi を用いたＮカドヘリンのノックダウンにノックダウン抵抗性のＮカドヘリンを共発現することで、リーリンによる神経細胞の凝集

構造形成がレスキューされた。これによって、N カドヘリンがリーリンによる神経細胞の凝集構造の形成に必要であることが明らかになった。

（2）リーリンによるNカドヘリン制御メカニズムの解析

次に、細胞膜表面上のNカドヘリンがリーリン刺激の前後でどのような制御を受けるのかを明らかにするため、リーリン刺激の前後でNカドヘリンの活性や分布の変化が起こるかどうか、培養細胞膜表面のNカドヘリン分布やNカドヘリン発現量を、免疫染色法やWestern ブロット法を用いて解析を行った。しかし、繰り返し条件検討を行ったにも関わらず、リーリン刺激によって、N カドヘリンが細胞膜表面にわずかに増加する傾向は観察されたものの、リーリン刺激の前後で明瞭な差は得られなかった。また、N カドヘリンの活性を反映すると考えらえる、N カドヘリンのリン酸化状態や、βカテニンへの結合量についても、リーリン刺激の前後で有意差が得られなかった。

予期した通りの結果が得られない要因として、大脳皮質全体の細胞の分散培養を用いた実験では、大脳皮質の異なる分化状態にある神経細胞が入り混じっているため、特定の分化状態にある細胞でのリーリンによる制御がマスクされてしまうことが想定された。そこで、子宮内胎児電気穿孔法によって、リーリンによる制御を受けるステージにある神経細胞をラベルした上で、N カドヘリンへの結合力を一細胞ごとに解析できる新規の解析系である、原子間力顕微鏡（AFM）を用いた解析を行った。すると、特定の分化状態にある細胞をラベルした上で、それらの細胞を一細胞ごとに解析した場合は、細胞膜表面のNカドヘリン結合力がリーリン刺激によって有意に強まるとともに、細胞膜表面のNカドヘリン量も有意に増加することが明らかになった。

そこでさらに、リーリン刺激によってNカドヘリン結合力が強まる分子メカニズムを明らかにするための解析をおこなった。発生中マウス脳内に、子宮内胎児電気穿孔法によるリーリン発現プラスミドを導入してリーリンの強制発現を行った際に、特異的にリン酸化されるタンパク質の中から、リン酸化量の変化をもとにして得られた候補分子について、生化学的な解析を行った。その結果、この候補分子が、培養細胞にリーリンを加えた際に特異的にリン酸化されることが明らかになった。また、発生中マウス脳内において、子宮内胎児電気穿孔法を使用したこの候補分子の機能阻害を行ったところ、細胞移動の遅れが認められた。

今後、この候補分子が、リーリンを加えた際の細胞膜表面のNカドヘリン量や結合力の変化を制御するメカニズムについて解析を進めていきたいと考えている。

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 7 件）

1. Yuki Hirota, Ken-ichiro Kubo, (7 名省略、2 番目). ApoER2 controls not only neuronal migration in the intermediate zone, but also termination of migration in the developing cerebral cortex. ***Cereb. Cortex***, 査読有, 1;28(1):223-235 (2018). doi: 10.1093/cercor/bhw369.
2. Yuki Matsunaga, (7 名省略、9 番目), Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima. Reelin transiently promotes N-cadherin-dependent neuronal adhesion during mouse cortical development. ***Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***, 査読有, 114 (8), 2048-2053 (2017). DOI10.1073/pnas.1615215114.
3. Shigeaki Kanatani, Takao Honda, Michihiko Aramaki, Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, (10 名省略、5 番目). The COUP-TFII/Neuropilin-2 is a molecular switch steering diencephalon-derived GABAergic neurons in the developing mouse brain., ***Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***, 112 (36), 査読有, E4985-94 (2015). doi: 10.1073/pnas.1420701112.
4. Mai Yamakawa, Daisuke Ito, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, (3 名省略、4 番目). Characterization of the dipeptide repeat protein in the molecular pathogenesis of c9FTD/ALS. ***Hum. Mol. Genet.***, 査読有, 24(6):1630-45 (2015). doi: 10.1093/hmg/ddu576.
5. Takao Kohno#, Takao Honda#, Ken-ichiro Kubo #, (6 名省略、3 番目) (T. Kohno#, T. Honda#, and K. Kubo# are co-first authors). Importance of Reelin C-terminal region in the development and maintenance of the postnatal cerebral cortex and its regulation by specific proteolysis. ***J. Neurosci.***, 査読有, 35 (11) , 4776-4787 (2015). doi: 10.1523/JNEUROSCI.4119-14.2015.
6. Yuki Hirota, Ken-ichiro Kubo, Kei-ichi Katayama, Takao Honda, Takahiro, Fujino, Tokuo T. Yamamoto, and Kazunori Nakajima. Reelin receptors ApoER2 and VLDLR are expressed in distinct spatio-temporal patterns in developing mouse cerebral cortex. ***J. Comp. Neurol.***, 査読有, 523 (3), 463-478 (2015). doi: 10.1002/cne.23691.
7. Katsutoshi Sekine, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima. How does Reelin control neuronal migration and layer formation in the developing mammalian neocortex? ***Neurosci. Res.***, 査読有, 86 (September), 50-58 (2014).

doi: 10.1016/j.neures.2014.06.004.

〔学会発表〕（計 29 件）

1. 林周宏、井上聖香、久保健一郎、仲嶋一範、マウス大脳新皮質形成における reelin-Nck2 シグナルの役割、2017 年度生命科学系学会合同年次大会（第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会、2017 年
2. Seika Inoue, Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima、Molecular mechanisms of neuronal aggregation caused by Reelin in the developing mouse neocortex、第 60 回日本神経化学会大会、2017 年
3. Kanehiro Hayashi, Seika Inoue, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima、The Role of Nck as a downstream effector of the Reelin signaling、第 60 回日本神経化学会大会、2017 年
4. Seika Inoue, Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima、Molecular mechanisms of Reelin-induced neuronal aggregation in the developing mouse neocortex、18th International Congress of Developmental Biology (ISDB)、2017 年
5. Yuki Hirota, Ken-ichiro Kubo, Takahiro Fujino, Tokuo T. Yamamoto, and Kazunori Nakajima 、 ApoER2 controls not only neuronal migration but also termination of migration in the developing cerebral cortex、Cortical Development Conference 2017、2017 年
6. 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
7. Minkyung Shin, Ayako Kitazawa, Yuki Matsunaga, Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima、Molecular and morphological analyses of radial glial fibers during mouse neocortical development、第 10 回神経発生討論会、2017 年
8. Seika Inoue, Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima、Investigation of the molecular mechanisms underlying Reelin-induced neuronal aggregation in the mouse neocortex 、 2016 The American Society for Cell Biology (ASCB) Annual Meeting、2016 年
9. Yuki Hirota, Ken-ichiro Kubo, Takahiro Fujino, Tokuo T. Yamamoto,and Kazunori Nakajima 、 ApoER2 controls neuronal migration in the intermediate zone and termination of migration in the developing cerebral cortex、The 28th CDB Meeting “Cilia and Centrosomes, Current Advances and Future Directions”、2016 年
10. Minkyung Shin, Ayako Kitazawa, Yuki Matsunaga, Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima 、 Morphological analyses of radial glial cells in the developing mouse neocortex、Society for Neuroscience, Neuroscience 2016 meeting、2016 年
11. 林周宏、井上聖香、久保健一郎、仲嶋一範、Analysis of Reelin-Nck signaling in mouse neocortex、第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学会大会、2016 年
12. 井上聖香、林周宏、久保健一郎、仲嶋一範、大脳新皮質においてリーリン分子により誘導される神経細胞凝集を担うシグナル伝達経路、第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学会大会、2016 年
13. Seika Inoue, Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima、Investigation of the molecular mechanisms that regulate Reelin-induced neuronal aggregation in the mouse neocortex、第 39 回日本神経科学大会、2016 年
14. Yuki Matsunaga, Mariko Noda, Hideki Murakawa, Takashi Miura, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima、Experiment and modeling of the Reelin-dependent modification of intercellular adhesion among cells from the developing cerebral cortex、第 39 回日本神経科学大会、2016 年
15. Kanehiro Hayashi, Seika Inoue, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima、Function of the Reelin-Nck signaling pathway during mouse neocortical development、第 39 回日本神経科学大会、2016 年
16. Yuki Hirota, Ken-ichiro Kubo, Takahiro Fujino, Tokuo T. Yamamoto, and Kazunori Nakajima、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
17. Seika Inoue, Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima、Analysis of the molecular mechanisms that underlie Reelin-induced neuronal aggregation in the mouse neocortex、第９回神経発生討論会・難治疾患共同研究拠点共同開催学術集会、2016 年
18. Takao Kohno, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Yoshimi Nakano, Ayaka Tsuchiya, Tatsuro Murakami, Hideyuki Banno, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori、C-terminal region of Reelin is required for development and maintenance of the postnatal cerebral cortex and its functions are regulated by specific proteolysis、新学術領域研究「神経細胞の多様性と大脳新皮質の構築」第 3 回国際シンポジウム「Neocortical Organization 3」、2016 年
19. Yuki Matsunaga, Mariko Noda, Hideki Murakawa, Takashi Miura, Ken-ichiro Kubo,

and Kazunori Nakajima、Experiment and modeling of the Reelin-dependent modification of intercellular adhesion among cerebral cortical cells 、 2015 American Society for Cell Biology Annual Meeting、2015 年

20. 北澤彩子、シン ミンギョン、林周宏、久保健一郎、仲嶋一範、発生期のマウス海馬及び大脳新皮質における特異的な細胞移動様式についての解析、日本解剖学会関東支部　第 103 回学術集会、2015 年
21. 松永友貴、野田万理子、村川秀樹、三浦岳、久保健一郎、仲嶋一範、大脳皮質神経細胞接着の制御とその数理モデル、日本解剖学会関東支部　第 103 回学術集会、2015 年
22. Takao Kohno, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Yoshimi Nakano, Ayaka Tsuchiya, Tatsuro Murakami, Hideyuki Banno, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori、Importance of Reelin C-terminal region in the development and maintenance of the postnatal cerebral cortex and its regulation by specific proteolysis 、 Society for Neuroscience, Neuroscience 2015 meeting、2015 年
23. Yuki Matsunaga, Mariko Noda, Hideki Murakawa, Takashi Miura, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima 、 Modeling and analysis and of intercellular adhesion between cells from the developing cerebral cortex、第 58 回日本神経化学会大会、2015 年
24. 河野孝夫、本田岳夫、久保健一郎、中野良美、土屋綾香、村上達郎、阪野英幸、仲嶋一範、服部光治、巨大分泌蛋白質リーリンの C 末端領域を介した大脳皮質形成機構、第 61 回日本薬学会東海支部総会・大会、2015 年
25. Takao Kohno, Takao Honda, Ken-ichiro Kubo, Yoshimi Nakano, Ayaka Tsuchiya, Tatsuro Murakami, Hideyuki Banno, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori、The novel function of Reelin in the dendrite development and layer formation in the postnatal brain、Society for Neuroscience, Neuroscience 2014 Meeting、2014 年
26. 井上聖香、林周宏、久保健一郎、仲嶋一範、大脳新皮質においてリーリン分子により誘導される神経細胞凝集を担うシグナル伝達経路の探索、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、2014 年
27. 林周宏、井上聖香、久保健一郎、仲嶋一範、マウス発生期大脳新皮質における Nck2 の役割、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、2014 年
28. 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、2014 年
29. 松 永友貴、野田万理子、村川秀樹、三浦岳、久保健一郎、仲嶋一範、数理モデルと再凝集培養系を用いた大脳皮質神経細胞の接着様式の解析、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、2014 年

〔その他〕
プレスリリース
脳の形成過程で神経細胞同士が集合するメカニズムを発見－精神・神経疾患の病態解明や治療の進展につながる成果－
https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/files/2017/2/7/170207-1.pdf

６．研究組織

(1)研究代表者
久保　健一郎（KUBO, Ken-ichiro）
慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授
研究者番号：20348791

(2)研究分担者
無し

(3)連携研究者
無し

(4)研究協力者
松永　友貴（MATSUNAGA, Yuki）
井上　聖華（INOUE, Seika）
シン　ミンギョン（SHIN, Minkyung）