

論文内容の要旨

論文題目 大脳新皮質発生におけるニューロン移動を制御するメカニズムの解析

氏名 伊藤 靖浩

緒言

大脳は高次機能を担う複雑な組織である。特に哺乳類大脳新皮質は機能や形態の異なるニューロンからなる緻密な層構造を形成しており、その形成過程は非常に興味深い。発生期の哺乳類大脳新皮質において、ニューロンを産生する未分化な神経系前駆細胞は脳室帯と呼ばれる脳深部に局在し増殖を繰り返し、神経系前駆細胞がニューロンに分化すると脳表層に向かってニューロン移動を開始する。

ニューロン移動により細胞が目的部位まで到達することが大脳新皮質の層形成と機能に重要であるが、ニューロン移動を制御する分子機構に関する研究は未だ端緒についたばかりである。本研究では、新たに 1)PDK1-Akt 経路、2)CDK inhibitor (p27^{Kip1} & p57^{Kip2})、3)Scratch がニューロン移動に重要な役割を果たすことを明らかにし、その機能を検討した。

1) PDK1-Akt 経路

背景 セリンスレオニンキナーゼ Akt は、PDK1 によるリン酸化を受けて活性化することにより、細胞の

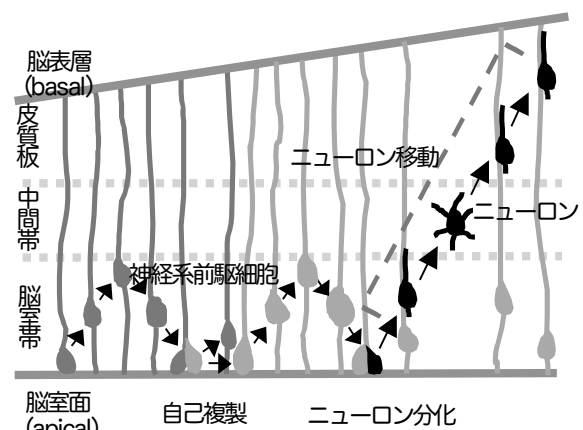


Fig. 1 大脳新皮質におけるニューロン移動

生存や増殖、運動に必須の役割を果たすことが知られている。しかし脳発生における PDK1-Akt 経路の機能は未解明であった。本研究では、中枢神経系特異的 PDK1 ノックアウト(cKO)マウスを作成し、解析を行った。

結果 i) PDK1 cKO マウスの解析 生後直後のマウス脳の組織切片を作成し組織構造を観察するため Nissl 染色を行ったところ、コントロールマウスでは形成されている明瞭な層構造が PDK1 cKO マウスでは見られなかった。層形成異常の一因としてニューロン移動の異常が考えられる。そこで、BrdU pulse chase 解析によりニューロン移動を調べたところ、コントロールマウスに比べ、PDK1 cKO マウス脳ではニューロン移動が遅れていた。従って、PDK1 はニューロン移動に必須であることが示唆された。

ニューロン移動にはニューロンが足場として用いる放射状突起が重要な役割を果たすことが知られている。放射状突起に存在するタンパク質 Nestin に対する抗体あるいはカルボシアニン蛍光色素 DilC₁₀(3)を用いて胎生 17 日目 (E17) の放射状突起を観察したところ、コントロールマウスでは放射状突起はまっすぐ伸びていたが、PDK1 cKO マウスでは曲った突起や途中で途切れた突起が観察された。従って PDK1 は放射状突起形成に重要であることが示唆された。

ii)ニューロン移動における Akt の機能解析 PDK1 の下流で活性化される Akt がニューロン移動に必要であるかを子宮内エレクトロポレーション法を用いて調べた。E14 に遺伝子導入後、4 日後に脳組織切片を作製すると、コントロールではほぼ全ての GFP 陽性細胞が脳表層に到達していた。それに対し、移動中のニューロンに Akt 優性抑制型変異体を導入し Akt の活性を阻害すると、まだ脳表層に到達せず移動途中の細胞が多く観察された。従って、ニューロン移動に Akt の活性が必要であることが示唆された。

考察 本研究より、PDK1-Akt 経路が脳新皮質の層形成に重要であることが明らかになった。脳新皮質層形成において放射状突起形成とニューロンの移動自体の制御の両方に関わる分子はこれまで知られていない。この 2 つの現象を PDK1-Akt 経路が同時に制御することが示された点は非常に興味深い。今後、Akt によるリン酸化標的の探索を行う予定である。

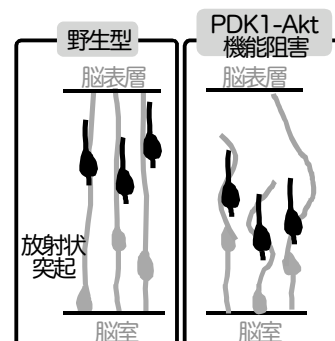


Fig. 2 PDK1-Akt経路によるニューロン移動制御

2) CDK inhibitor (p27^{Kip1} 及び p57^{Kip2})

背景 発生期の脳新皮質において、未分化な神経系前駆細胞は脳室帯で増殖し、ニューロンに分化するとニューロン移動を開始するとともに細胞周期の停止が起こることが知られている。しかしながら、ニューロン分化とニューロン移動、細胞周期停止をカップルさせるメカニズムは不明であった。CDK inhibitor は細胞周期を負に制御する働きを持つ重要な分子であるとともに、近年、細胞運動に関わる可能性が報告されている。そこで、本研究では、ニューロン分化、ニューロン移動と細胞周期停止を結ぶ分子の候補として CDK inhibitor に注目した。

結果 i)CDK inhibitor の発現 CDK inhibitor CIP/KIP family に属す分子として p21、p27、p57 が存在する。神経系初代培養細胞における mRNA の発現量を定量 PCR により測定したところ、p27、p57

がニューロン分化に伴い発現が上昇していた。また、大脳新皮質において CDK inhibitor の発現を抗体染色で調べたところ、p27 と p57 が分化したニューロンが存在する中間帯と皮質板で発現していた。そこで、ニューロン移動における p27 と p57 の役割を検討した。

ii)p27 によるニューロン移動制御 子宮内エレクトロポレーション法を用いて E14 マウス胎児の大脳新皮質に遺伝子導入し、4 日後に脳組織切片を解析した。すると、コントロール shRNA 導入細胞は殆ど脳表層に到達しているのに対し、p27 shRNA 導入細胞は中間帯と皮質板下部に集積している細胞が多く観察され、ニューロン移動に p27 が必須であることが示唆された。

iii)p57 によるニューロン移動制御 子宮内エレクトロポレーション法を用いて E14 マウス胎児大脳新皮質に遺伝子導入したところ、control shRNA 導入細胞の殆どが脳表層に到達しているのに対し、p57 shRNA 導入細胞の多くが皮質板中部あるいは下部に観察された。従って p57 が大脳新皮質のニューロン移動を制御することが明らかになった。

考察 発生期の大脳新皮質において未分化な神経系前駆細胞がニューロンに分化するとニューロン移動を開始するとともに細胞周期を停止するが、これらの現象を協調的に結ぶメカニズムはわかっていなかった。本研究より、細胞周期停止に重要な役割を果たす CDK inhibitor p27 と p57 がニューロン分化に伴って発現が上昇し、かつニューロン移動に必要であることが示唆された。

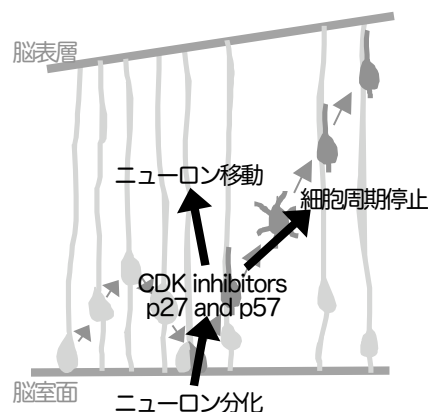


Fig. 3 CDK inhibitorによるニューロン移動制御

3) Scratch

背景 発生期の大脳新皮質において、ニューロンを産生する未分化な神経系前駆細胞は脳室帯と呼ばれる脳深部に局在し、apical 側の突起を脳室表面に接着させ apical-basal 極性を形成している。神経系前駆細胞がニューロンに分化すると apical 側の突起を消失して明瞭な極性が無くなり、脳表層に向かってニューロン移動を開始する。しかしながら、何故分化したニューロンが移動を開始するかという疑問は全く解明されていない。本研究では、ニューロン移動の開始を制御する分子の候補 Scratch について解析を行った。

結果 i)Scratch の発現 In vitro 初代培養系において定量的 PCR 法を用いて Scratch mRNA 発現量を調べると、未分化条件に比べニューロン分化条件で著しく Scratch の発現が上昇していた。また、発生期大脳新皮質における Scratch mRNA の発現部位を In situ hybridization 法を用いて調べたところ、ニューロン分化直後の細胞が存在する領域に局限した発現が観察された。従って、Scratch はニューロン分化に伴い発現することが明らかになった。

ii)in vivo における Scratch の機能 大脳新皮質発生における Scratch の機能を調べるため、Scratch に対する shRNA 発現ウイルスを作製し、E11 マウス胎児脳に遺伝子導入して 3 日後に脳組織切片を解析したところ、Control (Scramble) shRNA 発現細胞に比べ、Scratch shRNA 発現細胞では脳室帯に存在する細胞の割合が増加していた。従って、Scratch は大脳新皮質の脳室帯に存在する細胞が脳室帯を離れる

現象に関与することが示唆された。

iii) Scratch によるニューロン移動開始制御メカニズム Scratch は Snail family に属し、転写抑制因子として働くことが知られている。Snail は E-cadherin などの細胞接着に関わる分子の発現を抑制することにより、上皮系細胞の間葉系細胞への転換を誘導することが報告されている。そこで、Scratch が細胞接着を制御することによりニューロン移動の開始を制御するのではないかと考え、細胞接着分子の発現に対する Scratch の影響を検討した。神経系初代培養細胞に Scratch を過剰発現すると、E-cadherin の発現が顕著に減少していた。また、ZO-1 の発現も有意に減少していたが、N-cadherin の発現量に大きな変化は観察されなかった。従って、Scratch は細胞接着を制御することが示唆された。

考察 本研究より、ニューロン移動の開始を制御する分子の候補として Scratch が得られた。これまで、ニューロン分化に伴い apical 側との接着が消失する機構は不明であったが、Scratch が apical 側との接着を消失させ、ニューロン移動を開始させる可能性が示唆された。

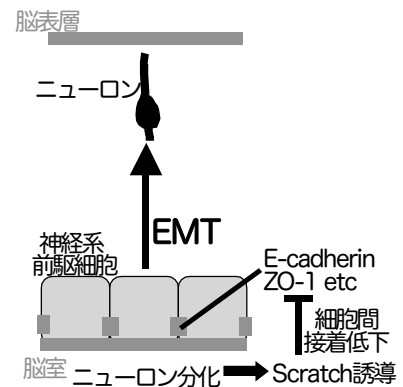


Fig. 4 Scratchによるニューロン移動制御

結言 これまでのニューロン移動に関する研究の多くはヒト脳疾患患者の変異遺伝子の同定により進んできたが、非常に複雑なニューロン移動のメカニズムにはまだまだ未解明な部分が多く残っている。本研究では、1) PDK1-Akt 経路、2) CDK inhibitor、3) Scratch が新たにニューロン移動を制御することを明らかにした点で重要な意義を持つ。また、これらの分子の解析によってこれまでに知られていないニューロン移動制御の新しいメカニズムの存在がそれぞれ明らかになり、本研究が大脳新皮質発生の精巧な形態形成過程の理解に貢献できたと考えている。