



プレスリリース

本リリースのカラー版をご希望の方は、
下記担当者までご連絡ください。

慶應義塾大学信濃町キャンパス総務課
広報担当 富田・吉野

Tel : 03-5363-3611 E-mail : med-koho@adst.keio.ac.jp



文部科学省「社会に貢献する脳科学」の実現を目指して
脳科学研究戦略推進プログラム
Strategic Research Program for Brain Sciences
Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology - Japan

2012年10月18日

報道関係者各位

慶應義塾大学医学部

大脳の神経細胞が正しく配置されるメカニズムを発見

- てんかんなど精神神経疾患の病態解明や将来の脳の再生医療の応用に前進 -

慶應義塾大学医学部の仲嶋一範教授らは、大脳皮質が形成される時に、神経細胞が正確に配置されるメカニズムを明らかにしました。ヒトをはじめとする哺乳類の大脳皮質は神経細胞が規則正しく配列した6層からなる層構造を持っています。この層構造の乱れが、統合失調症やてんかんなどの様々な精神神経疾患の発症に深くかかわっていることが知られています。発達過程において、大脳皮質の深い部位で誕生した神経細胞は、脳表面に向かって長い線維に沿って移動し最終目的地の層に到達すると、この線維から離れます。しかし、神経細胞がどのようにして正しく移動して目的の層に配置されるのかはよく分かっていませんでした。

今回の研究では、リーリン（注1）と呼ばれる、神経細胞が移動を終了する地点付近に存在する細胞外タンパク質に注目しました。リーリンの異常は滑脳症（脳のしわが少なく、正常よりも平滑になる疾患）の原因の1つであり、統合失調症や自閉症との関連も知られています。リーリン欠損マウス（自然発症の突然変異マウスであり、歩行障害やふるえを特徴とする）においては、大脳皮質の層構造がおおむね逆転してしまうことから、リーリンが神経細胞の移動に大切であることがわかっていましたが、そのしくみは不明でした。そこで、移動途中にある神経細胞における様々な分子の機能を子宮内電気穿孔法（注2）と呼ばれる手法で解析した結果、リーリンが移動神経細胞のインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ （注3）という接着分子を正しいタイミングで活性化することで、移動の最終段階を制御することを明らかにしました。つまり、リーリンのシグナルを受け取ると、神経細胞は伝わってきた線維から離れてインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を用いて自らの体を持ち上げ、移動の最後の仕上げ（ターミナルトランスロケーション）を行いつつ、移動を終了することが分かりました。脳の深部で生まれて次々に脳表面に向かって移動してくる神経細胞は、脳の表面近くでこのしくみを使って次々に目的地に到達できるため、最終的に正しい層に配置されると考えられます。実際に、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ の活性化が正しく行われないと、予想通り神経細胞の配置パターンが異常になることを見いだしました。

本研究成果は、2012年10月18日（米国東部時間）発行の米国神経科学雑誌「*Neuron*」に掲載されます。本研究は、文部科学省脳科学研究戦略推進プログラムの一環として、また科学研究費補助金などの助成によって行われました。

1. 研究背景

哺乳類の大脳皮質は、多くの神経細胞が整然と並んだ6層構造を作っています。この構造は、哺乳類が進化の過程で獲得した特別な形質と考えられています。この層構造の形成過程において、神経細胞は脳の深部にある脳室の周囲で誕生し、放射状に脳表面に向かって移動して、表層付近で正しく移動を終了します(図A)。この際、遅れて生まれた神経細胞は早く生まれた先輩神経細胞を全て乗り越えて、より表層側に到達して停止することから、最終的には先輩細胞が深層に、後輩細胞が表層に並ぶ“inside-out”型と呼ばれる様式で層構造を形成します。この層構造形成の異常が、発達障害や統合失調症、てんかんといった精神神経疾患の患者で多数報告されていることから、神経細胞を正しく配置させるメカニズムの重要性が示唆されます。

近年、神経細胞は複雑に移動様式を変化させながら動いていくことがわかってきました(図A)。大脳皮質神経細胞の7~8割を占める興奮性神経細胞(注4)の場合、すでに移動を終えた先輩細胞の集団の中を、脳を貫くように走る長い線維(放射状グリア)につかまりながら、後輩の神経細胞がよじ登っていく様子が報告されています。しかし、放射状グリアの線維は脳の表層まで伸びているにもかかわらず、神経細胞がその途中でどのようにして移動を終了するのかは不明でした。

私たちは、神経細胞の移動終了地点で発現し、大脳皮質の層構造形成に決定的な役割を持つリーリンと呼ばれる細胞外タンパク質に着目しました。リーリンの異常は滑脳症と呼ばれる脳構造異常の原因の一つであり、統合失調症や自閉症などの精神神経疾患との関連も示唆されています。リーリン欠損マウスにおいては、大脳皮質の層構造がおおまかに逆転してしまうことから、リーリンの層構造形成における重要性が示唆されてきました。リーリンは、移動神経細胞に発現し、リーリンの受け取り手であるApoER2/VLDLRと呼ばれるリーリン受容体に結合した後、細胞内タンパク質であるDab1をリン酸化(活性化の仕組みの1つで、チロシンと呼ばれるアミノ酸にリン酸基がつきます)することが知られています。しかし、実際の大脳皮質内において、いかにしてリーリンが神経細胞の“inside-out”型の配置を制御しているのかは、リーリン欠損マウスの発見から半世紀以上が経過しているにもかかわらず、依然として謎のままでした。

最近私たちは、発生期の大脳皮質において脳表面付近で一過性に観察される特徴的な領域を同定し、原皮質帯(primitive cortical zone: PCZ)と命名しました(注5)。そしてリーリンがこの原皮質帯への進入に関わる特殊な移動様式を制御していること、原皮質帯が“inside-out”型の最終配置が決定される場所であることを報告しました(Sekine, et al. *J. Neurosci.*, 31 (25), 9426-9439 (2011))。本研究においては、このリーリンと原皮質帯の関係に着目し、リーリンによる“inside-out”型の細胞配置のメカニズムを明らかにしたいと考えました。

2. 研究内容

本研究において、私たちは、当研究室で開発した簡便な遺伝子導入法である子宮内電気穿孔法と、遺伝子の機能を簡単に阻害することができるRNA干渉法(注6)を組み合わせることによって、原皮質帯への進入の分子機構を解析しました。まず、Dab1のリン酸化が原皮質帯への進入に必要であるかを検証しました。Dab1はリーリンによって複数のチロシン残基がリン酸化されることが知られています。Dab1をRNA干渉法でノックダウンする(発現量を減少させる)と原皮質帯への進入が阻害されますが、この表現型は野生型のDab1を同時に導入することで元に戻ります。一方で、リーリン刺激によってリン酸化されるすべてのチロシン残基を変異させリン酸化できなくしたDab1では元に戻らないことが観察されました。そこでさらに解析を進め、Dab1の220番目ないし232番目のチロシンのリン酸化が必要であることを見いだしました。この実験

により、Dab1 の下流分子（作用を細胞内に伝達する分子）の候補として、Crk/CrkL と呼ばれるタンパク質が挙がりました。そこで RNA 干渉法を用いて解析したところ、Crk/CrkL が確かに原皮質帯への進入を含む細胞移動を制御していることが分かりました。さらに、Crk/CrkL と結合しリーリンで活性化される C3G と呼ばれるタンパク質も、原皮質帯への進入に必要であることを見いだしました。C3G は、Rap1 と呼ばれる低分子量 G タンパク質の活性化因子であることが知られています。そこで次に、Rap1 の機能を解析するため、Spa1 という Rap1 の阻害因子を子宮内電気穿孔法で移動神経細胞に導入しました。その結果、Rap1 を阻害した場合には原皮質帯への進入に異常が出るのが分かりました。この結果から、リーリンによる C3G を介した Rap1 の活性化が、原皮質帯への進入を制御していることが分かりました。

さらに我々は、原皮質帯への進入が放射状グリアに依存しない特殊な移動様式（ターミナルトランスロケーション terminal translocation）で起こることから、神経細胞が周囲の細胞外環境を足場にして動き、移動を終了するのではないかという仮説を立てました。原皮質帯を含む脳表面で特異的に発現する分子があることを以前我々は報告しましたが、その中で、フィブロネクチンと呼ばれる、細胞の移動に重要な足場となる細胞外マトリックス（注7）が多く発現していることに着目しました。フィブロネクチンは、移動細胞のインテグリン $\alpha5\beta1$ と呼ばれる接着分子と結合することが知られています。移動神経細胞は、先導突起と呼ばれる突起を伸ばし、その後核を含む細胞体を持ち上げ、さらにまた先導突起が伸び、という過程を繰り返して移動していますが、我々は、原皮質帯付近のフィブロネクチン発現部位において、インテグリン $\beta1$ が移動神経細胞の先導突起で活性化されていることを見出しました。興味深いことに、リーリン欠損マウスにおいてはこのインテグリン $\beta1$ の活性化が観察されないことから、リーリンによるインテグリン $\alpha5\beta1$ の活性化が原皮質帯への進入に重要なのではないかと考えました。そこでさらに解析を進めた結果、実際にリーリンがインテグリン $\alpha5\beta1$ を活性化することを見出し、リーリンによって神経細胞とフィブロネクチンとの接着が亢進することも明らかになりました（図 A）。そして、インテグリン $\alpha5\beta1$ の作用を RNA 干渉法で阻害すると、原皮質帯への進入に異常が見られたことから、インテグリン $\alpha5\beta1$ が原皮質帯への進入に必要であることが分かりました。さらに、リーリン受容体を RNA 干渉法で阻害して原皮質帯への進入が阻害された表現型が、インテグリン $\alpha5\beta1$ の恒常的活性化型（および別の下流分子である Akt）を導入することで正常化することから、インテグリン $\alpha5\beta1$ の活性化がリーリンの下流で起こり原皮質帯への進入を制御していることが分かりました（図 B）。

最後に、インテグリン $\alpha5\beta1$ の阻害がリーリンの阻害と同様に細胞の最終的な配置である“inside-out”型に影響を与えるかを、子宮内電気穿孔法を連続して二回行うことで先輩細胞と後輩細胞を別々に標識して解析し、確かに最終配置に乱れが生じることを確認しました。

以上の実験から、放射状グリアを伝って大脳皮質内をよじ登ってきた神経細胞は、原皮質帯の直下に到達してその先導突起先端でリーリンを受け取ると、細胞内の経路を介して先導突起のインテグリン $\alpha5\beta1$ を細胞の中から活性化させることがわかりました（図 A）。その結果、あたかもロッククライマーが切り立った崖の頂上で自らの手をかけて体を持ち上げるように、力強く細胞体を持ち上げる（ターミナルトランスロケーション terminal translocation）ことで原皮質帯への進入が起こり、最終配置部位、すなわち原皮質帯の最表層部分に正しく定着することが明らかになりました。脳の深部で生まれて次々に脳表面に向かって移動してくる神経細胞は、原皮質帯のところでこのしくみで先輩細胞を乗り越えて次々に最表層に到達するため、“inside-out”型の層構造形成が実現されるということがわかりました。

3. 今後の展開

本研究では、リーリンという細胞外のシグナルが細胞内の情報伝達経路を介してインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を細胞内から活性化する経路を明らかにしましたが、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ そのものも細胞外からの情報を受け取って細胞内へとシグナルを伝えていきます。このインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を介した細胞外からのシグナル伝達経路がどのようにして原皮質帯内での細胞の運動を制御しているのかは、未解明のままであり、今後の研究の発展が必要となります。

一方、リーリンは神経細胞の情報入力部位である樹状突起の形態も制御していますが、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ は樹状突起形成には大きくは影響を与えていない可能性が示唆されました。このことから、リーリンはインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ 非依存的に樹状突起形成を制御している可能性があり、リーリンの大脳皮質形成における多様な分子経路の存在が示唆されました。このように、リーリンを鍵とした様々な分子経路を明らかにすることによって、将来の発達障害やてんかんなどの病態解明や新しい治療法の開発へとつなげていきたいと考えています。

近年、試験管内での神経組織の再生研究が進み、移植による脊髄損傷等の治療も研究されていますが、将来的には、脳血管障害や神経変性疾患などで障害を受けた大脳皮質も、再生医療の対象になりうるものと期待されます。リーリンは大脳皮質を含めて脳内の多くの部位で神経細胞の正しい配置を制御しているため、本研究は、将来の脳の再生医療において神経細胞を正しく配置させる手法を確立するための基盤になることが期待されます。

4. 論文名

Reelin controls neuronal positioning by promoting cell-matrix adhesion via inside-out activation of integrin $\alpha 5 \beta 1$

[リーリンはインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を細胞の中から活性化し、細胞と細胞外マトリックスの接着を亢進することで神経細胞の配置を制御している]

Katsutoshi Sekine, Takeshi Kawauchi, Ken-ichiro Kubo, Takao Honda, Joachim Herz, Mitsuharu Hattori, Tatsuo Kinashi, and Kazunori Nakajima

Neuron, in press

【参考図】

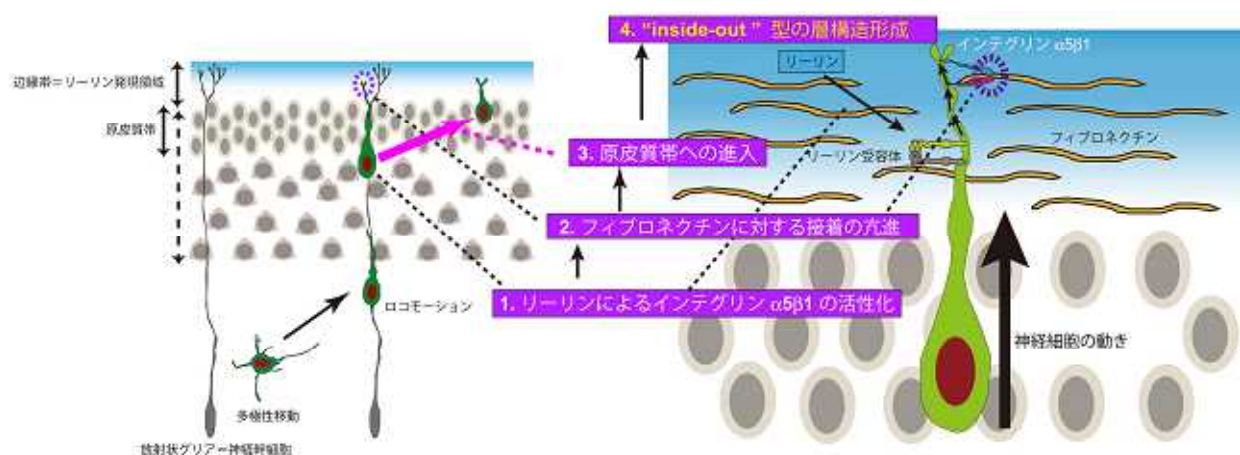
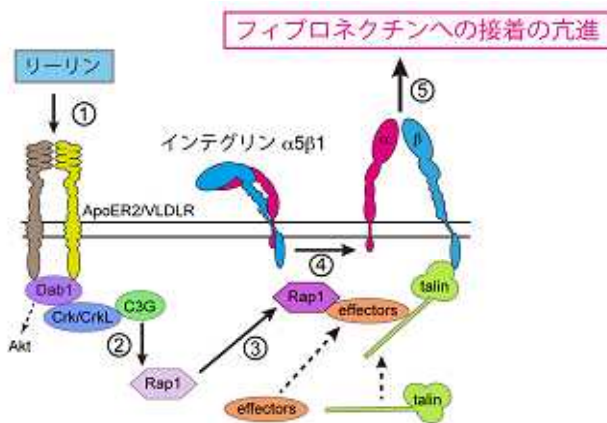


図 A: 興奮性神経細胞は側脳室周囲にある放射状グリアと呼ばれる神経幹細胞から誕生する。その後、多極性移動、ロコモーションと呼ばれる移動様式に順次変化し、脳表面へと向かって移動する。

先導突起がリーリン発現部位である辺縁帯に到達すると インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ が活性化し、辺縁帯に分布するフィブロネクチンとの接着が亢進することで 原皮質帯を通過することができるようになり、最終的な “ inside-out ” 型の細胞の配置が起こるようになる。



リーリンによるインテグリンの細胞内からの活性化

図 B：リーリンは 神経細胞に発現する ApoER2/VLDLR と呼ばれるリーリン受容体に結合し、 Dab1 のリン酸化による Crk/CrkL-C3G の活性化を介して Rap1 を活性化する。 活性化された Rap1 は、結合する下流の分子を連れてきて活性化することで インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ の構造変化による活性化を引き起こし、 細胞外マトリクスであるフィブロネクチンへの接着が亢進する。

【補足説明】

注 1：リーリン

脳の神経細胞の配置や移動を制御している分泌性糖タンパク質の 1 つであり、その他にもシナプスにおける機能なども報告されています。欠損すると、大脳皮質層構造が逆転したり、脳のしわが少なくなったり、脳幹や脊髄の神経細胞の配置が異常になったりなど、中枢神経系全体の大きな形成障害が起こります。

注 2：子宮内電気穿孔法

当研究室において開発した、簡便な *in vivo* 遺伝子導入技術です (Tabata and Nakajima, *Neuroscience*, 103, 865-872 (2001)) (特許第 4536233 号)。妊娠マウスを麻酔した後に、子宮の壁越しに胎児の脳に任意の遺伝子を任意の場所と時期に導入することができます。

注 3：インテグリン $\alpha 5 \beta 1$

インテグリンファミリーと呼ばれる、 α サブユニットと β サブユニットの 2 量体からなる細胞接着分子の 1 つです。特にフィブロネクチンとの親和性が高く、様々な細胞種で細胞の接着や細胞の移動に重要であると言われています。

注 4：興奮性神経細胞

脳内の神経細胞はお互いに結びついてネットワークを作っていますが、結びついた相手先の神経細胞の活動を活発にする物質を分泌する神経細胞を興奮性神経細胞と言い、相手の活動を抑制する物質を分泌する神経細胞を抑制性神経細胞と言います。

注5：原皮質帯

当研究室において関根等が 2011 年に報告した、周産期の脳皮質表層付近に一過性に認められる、未成熟な神経細胞が密集した領域です (Sekine, et al. *J. Neurosci.*, 31 (25), 9426-9439 (2011))。

注6：RNA 干渉法

mRNA とよばれる、タンパク質の鋳型になる RNA の特定の塩基配列に対し相補的な RNA を導入することで、mRNA の分解を促進し遺伝子の機能を簡便に抑制する（ノックダウンと言います）手法です。

注7：細胞外マトリックス

細胞の周囲にある構造物で、細胞を支えたり移動の際の足場になったりする分子群の総称。

ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

本リリースは文部科学記者会、文部科学省科学記者会、厚生労働記者会、厚生日比谷クラブ、各社科学部等に送信させていただいております。

【本発表資料のお問い合わせ先】

慶應義塾大学医学部 解剖学教室 教授
仲嶋一範（なかじま かずのり）
TEL：03-5363-3743 FAX：03-5379-1977
Email：kazunori@z6.keio.jp

【本リリースの発信元】

慶應義塾大学信濃町キャンパス総務課 富田
〒160-8582 東京都新宿区信濃町3-5
TEL 03-5363-3611 FAX 03-5363-3612
E-mail:med-koho@adst.keio.ac.jp
<http://www.keio.ac.jp/>

【「文部科学省 脳科学研究戦略推進プログラム」に関するお問い合わせ】

脳科学研究戦略推進プログラム 事務局（担当：大塩）
TEL：03-5282-5145 FAX：03-5282-5146
E-mail：srpbs@nips.ac.jp