

マウス大脳皮質神経細胞層の構築に及ぼす細胞外液性因子の影響

福光秀文

Effect of Environmental Factor Influencing the Development of Mouse Cerebral Cortex

Hidefumi FUKUMITSU

Laboratory of Molecular Biology, Department of Biofunctional Analysis, Gifu Pharmaceutical University, 1-25-4 Daigakunishi, Gifu 501-1196, Japan

(Received June 5, 2011)

The cerebral cortex is organized into six cell layers, each of which contains neurons with similar morphology, functions, gene-expression profiles, and projection patterns. These layer-specific neuronal phenotypes are sequentially generated from common cortical progenitor cells in the ventricular zone of dorsal telencephalon. Although recent investigations have clarified important roles of intrinsic factors such as transcription factors and regulators of the cell cycle for the maturation of cortical progenitors, growth factors and neurotrophic factors environmentally supplied by the cerebral cortex are thought to regulate proliferation and neural development and determine neuronal differentiation in the cerebral cortex. In this review, I focus on the function of neurotrophin-family neurotrophic factor, including nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3) and neurotrophin-4 in the formation of the neuronal layer of the cerebral cortex. Especially, BDNF and NT-3 are expressed in the proliferating cortical progenitors and influence the biological properties of cortical progenitors prior to neurogenesis and play distinct roles in generation of cortical neuronal subtypes.

Key words—subtype specification; cerebral cortex; neurotrophin; neurotrophic factor; neurogenesis

1. はじめに

大脳皮質の多種多様な神経細胞は、胎生期に共通の前駆細胞から生成される。この神経細胞の多様性を生み出す機構には、転写因子や細胞周期調節因子などが関与している。しかし、これらの内因性分子の働きを制御し、最終的に前駆細胞の増殖、神経細胞の発生と分化の数とタイミングを制御しているのは大脳皮質内の増殖因子や神経栄養因子などの液性因子である。われわれの研究室では、大脳皮質発達過程における神経栄養因子の役割について研究を進めてきた。本総説では、その研究成果を国内外の知見と合わせて紹介する。

2. 大脳皮質の神経細胞層構築

哺乳類の大脳皮質は6層の神経細胞層 (Fig. 1) よりなる。マウスでは、第II–VI層の神経細胞層の

構築は、以下のように進行する。まず、脳室面に隣接する脳室帯 (ventricular zone: VZ) にて、大脳皮質前駆細胞が増殖を繰り返しつつ、神経細胞を生成する。preplate という一過性の神経細胞層が表層のCajal-Retzius 神経細胞 (CR 神経細胞) と subplate 神経細胞に分割され、ここに将来の皮質II–VI層の神経細胞が侵入する {この領域は皮質板と呼ばれる; 胎生12日齢 [embryonic day (E) 12] からE17頃まで}。このとき、神経細胞はその都度、脳表付近まで移動して定着するため、早期に生成された神経細胞ほど深層に、後期に発生した神経細胞はより上層に配置される。¹⁾ なお、CR 神経細胞も、subplate 神経細胞も大脳皮質構築過程における役割が終了すると、細胞死を経て消滅する。その結果、I層は細胞が少なく、II–VI層からの神経突起の多い層となる。

3. 大脳皮質神経細胞層構築過程におけるニューロトロフィンとその受容体の発現

現在までに、多くの神経栄養因子が同定されているが、最初に発見されたのは神経成長因子 (nerve

岐阜薬科大学生体機能解析学大講座分子生物学研究室 (〒501-1196 岐阜市大学西1-25-4)

e-mail: hfukumi@gifu-pu.ac.jp

本総説は、平成22年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

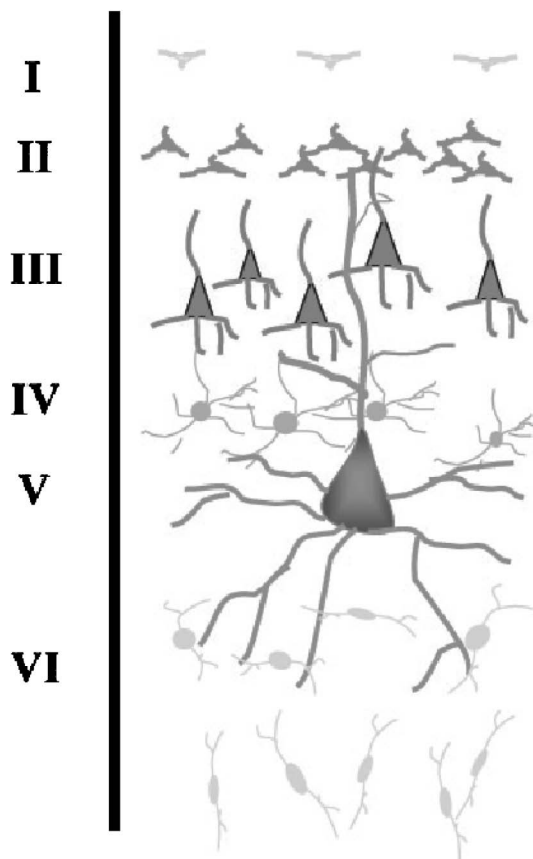


Fig. 1. Cytoarchitecture of the Cerebral Cortex

The cerebral cortex is organized into six cell layers, each of which contains neurons with similar morphology, functions, gene-expression profiles, and projection patterns.

growth factor: NGF) である。²⁾その後、NGF とのアミノ酸相同性から、同定された脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF)、ニューロトロフィン-3、-4 (neurotrophin-3, -4: NT-3, -4) を総じてニューロトロフィン (NTs) ファミリー神経栄養因子と呼んでいる。NTs ファミリーは、チロシンキナーゼ受容体ファミリーに属する高親和性受容体/Trk ファミリー受容体を介して作用する (NGF は TrkA, BDNF, NT-4 は TrkB, NT-3 は TrkC と高い親和性を持つ)。³⁾

NTs とその受容体は、末梢神経だけでなく、脳にも発生過程から広く発現しており、大脳皮質神経細胞層の構築過程においては、BDNF/TrkB 及び NT-3/TrkC が脳室帯の大脳皮質前駆細胞で発現している。⁴⁻⁶⁾また、培養下の大脳皮質前駆細胞、神経細胞を用いた結果からは、内因性の NTs が生存や分化を促進することが多数報告されていた。ところが、同時期に始まった NTs 及びその受容体のノ

ックアウトマウスの一連の研究は、総じて予想に反し、様々な末梢神経系で観察された神経細胞数の減少や組織構築における異状が脳を含む中枢神経系では観察されないという一致した見解を示していた。⁷⁾

4. 大脳皮質神経細胞層構築過程における BDNF の作用

この頃から、ノックアウトマウスの中枢神経系ではなんらかの代償機構が働いており、*in vivo* における NTs の生物学的役割を明らかにするには、その事象が起こっている場で解析する必要があるという仮説が提案されるようになった。

そこで、われわれは大脳皮質構築過程のマウスの脳室内にタンパク質あるいはその機能を中和する抗体を直接注入する方法を用いて、機能解析を行うことにした。具体的には、胎生 13.5 日の胎仔側脳室に BDNF をガラスキャピラリーにて注入し、その 3 時間後に親マウスの腹腔内に 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を投与した。そして、その 2 日後に胎仔大脳皮質を摘出し、大脳皮質内における BrdU 標識細胞の分布を調べた。ここで、BrdU は大脳皮質前駆細胞の細胞周期 S 期にチミジンの代わりに染色体に取り込まれ、その後神経細胞となった細胞では BrdU の標識が強く残るが、増殖を続ける前駆細胞では細胞分裂のたびに標識が薄れていく (Fig. 2)。この原理により、BrdU 標識後、多くの細胞分裂を経ずに神経細胞となった細胞を追跡できる (この場合、BrdU 標識細胞の多くは E13.5 に生成された神経細胞ということになる)。対照群、BDNF 投与群ともに皮質板に多くの BrdU 標識細胞が認められ、VZ から神経細胞となった細胞が皮質板内へ移動したことを意味している。BDNF 投与群の大脳皮質では、皮質板に分布する BrdU 標識細胞の数が対照群と比較して 2 倍程度に増加していた。また、同様の処置を行い、自然分娩も含めて生後 6 日齢 (postnatal 6 day: P6) まで通常飼育したマウスの大脳皮質では、対照群では多くの標識細胞 (70%) が上層の II-IV 層に分布していたのに対して、BDNF 投与群では逆に深層の V-VI 層に多くの標識細胞 (70%) が分布していた。

ここで、BDNF の作用として 2 つの可能性が示唆される。1 つは生成した上層神経細胞の細胞移動が早められ、皮質板に早く到達したため、深層に定

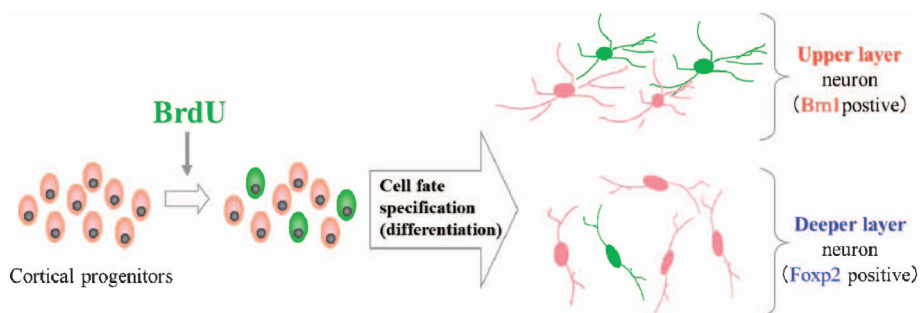


Fig. 2. Analysis of Subtype Specification of Cortical Neurons

Cortical progenitors cycling in S phase incorporated 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) had gained gene-expression properties specific to neurons of upper/deeper layers after differentiation.

着するようになった。もう1つは、BDNFの作用によって大脳皮質前駆細胞から上層の神経細胞ではなく、深層の神経細胞が生成されたという可能性である。そこで、まず、各層の神経細胞に特異的に発現する転写因子 (II-IV層: brain specific homeobox POU domain protein 1, Brn1, VI層 forkhead family gene type 2, Foxp2) の特異抗体を用いて免疫染色を行った。Brn1及びFoxp2陽性細胞の大脳皮質内における分布と数は2群間で有意な差がなく、大脳皮質の全体的な組織構築には影響しないことが明らかになった。一方、BrdU標識細胞に着目すると、対照群では約30%がBrn1を、8%がFoxp2を発現していたが、BDNF投与群では約13%がBrn1を、17%がFoxp2を発現していた。さらに、より深層に定着したBrdU標識細胞は、その層に固有の投射先である下位中枢に投射していることを確認した。これらのことから、BDNFの作用を受けて深層に定着するように変化したBrdU標識細胞は配置だけでなく、遺伝子発現、軸索投射パターンも深層神経細胞に変化していることがわかった。つまり、大脳皮質前駆細胞はBDNFの作用により、上層神経細胞の代わりに深層神経細胞を生成したと考えられる。

5. 新生神経細胞のサブタイプを変えるBDNFの作用タイミング

先行研究から、①発生初期の深層神経細胞を生成する大脳皮質前駆細胞を、上層神経細胞を生成中の発生後期の脳皮質に移植すると、上層神経細胞が生成されるが、②S+G2期を越えてから移植すると、予定されていた深層神経細胞を生成すること⁸⁾が示唆されていた。つまり、深層細胞のサブタイプは前駆細胞が細胞周期S期周辺で皮質環境

因子の作用を受けて決定される。

われわれが発見したBDNFの作用も大脳皮質前駆細胞の細胞周期に依存する可能性がある。そこで、BrdUを母体に投与する時間を胎生日齢13日の14:00に固定し、その6, 3, 1時間前、あるいは6時間後にBDNFを胎仔脳室内に注入し、生後6日齢の大脳皮質におけるBrdU標識細胞の分布を観察した。BDNF及びBrdUの有効濃度の持続時間がそれぞれ~3, ⁹⁾~5¹⁰⁾時間であることを考慮すると、BDNFを6時間前、3時間前、あるいは6時間後に注入した場合、BrdU標識細胞はそれぞれG1期、S期、G2+M期に強い作用を受けることになる。解析の結果、BDNFを3あるいは1時間前に作用させた (late G1からS期) 時のみ、BrdU標識細胞の定着位置が深層にシフトすることが明らかになった。⁹⁾

6. 大脳皮質神経細胞層構築における内因性BDNFやその他のBDNF関連タンパク質の作用

これまで、BDNFとその受容体TrkBのノックアウトマウスの大脳皮質では、組織構築過程で生じたと考えられる顕著な異常が発見されていなかったこと⁷⁾から、この過程におけるBDNFの重要性については見過ごされてきた。機能中和抗体を用いると、大脳皮質前駆細胞は予定されていたよりも上層の神経細胞を発生するようになるため、内因性のBDNFが大脳皮質神経細胞のサブタイプ決定に寄与していると考えられる。BDNFのシグナルを細胞内に伝達するTrkBのShc/PLC- γ の結合部位を変異させ、恒常的不活性化状態にしたノックインマウスではBDNF抗体を投与した場合と同様、同時期に発生した神経細胞がより上層に配置されること¹¹⁾やRNA干渉法を用いて大脳皮質前駆細胞の

TrkB 発現を抑制すると、細胞増殖、神経分化が抑制されること¹²⁾などが報告されており、BDNF/TrkB 経路が脳皮質神経前駆細胞の細胞生物学的に重要な役割を果たしていることが裏付けられた。われわれは同様の手法を用いて、その他の神経栄養因子についても評価を行っている。BDNF と同じニューロトロフィンファミリーに属する NT-3 は BDNF と同じタイミングで作用させても、神経細胞のサブタイプを変化させることはなく、生成される神経細胞の数を増大させた。この NT-3 の作用は mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK) 阻害剤である PD98059 を投与すると完全にキャンセルされることから、MAPK カスケードの活性化を介して作用していると考えられる。¹³⁾ また、神経細胞では BDNF の発現誘導あるいは TrkB の活性化を誘導して、神経栄養因子活性を示す生理ペプチド、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: PACAP) は BDNF 同様に上層神経細胞を生成過程にある脳皮質前駆細胞に作用し、深層神経細胞の生成を促す作用があることを見出した。PACAP を作用させた脳皮質前駆細胞では cAMP response element binding protein (CREB) のリン酸化が促進されるが、この作用は protein kinase A (PKA) 阻害剤 H89 の作用によってキャンセルされ、同時に深層神経細胞の生成増加作用もなくなるため、PACAP は PKA/CREB 経路を介して作用していると考えられた。さらに、このとき、PACAP を作用させても BDNF の mRNA レベルでの発現は変化がなかったことから、BDNF とは独立したメカニズムで作用していると考えられた。¹⁴⁾

Table 1. Effect of Neurotrophic Factors on the Proliferation of Cortical Neuronal Progenitors and Subtype Specification of Cortical Neurons

	Action timing	Cell fate specification	Proliferation of cortical progenitors	Cell signaling
BDNF	G1	→	→	unknown
	late G1-S	↓↓↓	→	unknown
NT3	G1	↑↑↑	→	MAPK
	late G1-S	→	promote	MAPK
PACAP	G1	↓↓↓	→	PKA/CREB
	late G1-S	→	suppress	PKA/CREB

↑↑↑ upper layer neurons, ↓↓↓ deeper layer neurons, → unchange.

これらの成果を Table 1 にまとめた。

7. 脳皮質神経細胞層構築に係わるその他の液性因子の作用

その他の脳皮質に存在する液性因子の作用として、サイトカインシグナルや Wnt/ β -catenin pathway が脳皮質前駆細胞の増殖や神経細胞への分化に重要な働きをしていることが明らかにされつつある。

白血球抑制因子、毛様体神経栄養因子、cardiotrophin-1 などの gp130 受容体を介して作用するサイトカインファミリーは Notch や塩基性線維芽細胞増殖因子などの神経幹細胞の増殖維持に係わる因子とともに脳皮質前駆細胞の増殖を促進しつつ、神経細胞の生成を抑制する。また、これらの因子は脳皮質前駆細胞からアストロサイトの発生、分化にも関与していることが知られている。しかしながら、脳皮質の神経細胞のサブタイプ決定に及ぼすこれらのサイトカインの機能については不明である。¹⁵⁾

脳皮質前駆細胞は厳密には 2 つの様式で神経細胞を発生する。1 つは分裂時に直接神経細胞を生成する様式、もう 1 つは、1-3 回の分裂能をもち、神経細胞のみを生成する神経前駆細胞を介して神経細胞を発生する間接様式である。¹⁶⁾ 特に進化に伴う神経細胞数の増加には後者の様式の寄与が大きいと考えられている。Wnt/ β -catenin シグナルの活性化は、脳皮質前駆細胞の増殖を促進し、神経発生を促進する。^{17,18)} 近年、この経路は N-myc の発現を誘導することで間接様式での神経発生を促進し、最終的に生成される神経細胞数が増加すること、N-myc のコンディショナルノックアウトマウスでは脳皮質では神経細胞 (特に上層神経細胞) の数が減少することが報告された。¹⁹⁾

8. おわりに

哺乳類の脳皮質は、認知、記憶・学習などの高次脳機能を営み、随意運動や情動を制御している。脳皮質では、脳室面から髄膜へと垂直に並ぶ神経細胞がネットワークを形成して、1 つの機能単位となり、構成神経細胞が異なる領域の神経細胞と連絡することで無数の機能単位を階層的に結び付ける。この神経解剖学的特徴が膨大な情報の分散並列・統合処理の基盤となるため、脳皮質の組織構築過程に異常が生じ、機能的な神経ネットワーク形成にひ

ずみが生じると、脳の生理機能に重大な影響を与える。したがって、大脳皮質構築の液性因子による調節メカニズムの解明は単に発生学上の問題としてだけでなく、精神疾患の原因究明のカギを握る重要な課題であると言える。

近年、妊娠期の感染症が子の精神病発症リスクを増大されるという疫学調査結果が報告されている。実際に、免疫賦活剤を妊娠マウスに投与すると、胎仔でのサイトカインバランスがくずれ、仔が成熟後に精神疾患様の行動異常を示すことが知られている。上記のような観点から、われわれの研究室では、同モデルの大脳皮質神経細胞の細胞生物学的な変化を調べている。現在のところ、病態モデル大脳皮質神経細胞において、①発生タイミングの遅れ、②転写因子発現プロファイルの変化、③シナプスの発達不全などの現象を見出し、^{20,21)} 精神疾患の病態解明の糸口を掴めるのではと期待しつつ、現在そのメカニズムを解析中である。

謝辞 このような執筆の機会を与えて頂きました日本薬学会薬学雑誌編集長太田 茂先生を始め諸先生方に心より御礼申し上げます。また、ここで紹介した研究は、現所属の岐阜薬科大学生体機能解析学大講座分子生物学研究室にて行われたものであり、ご指導頂きました分子生物学研究室教授古川昭栄先生に厚く御礼申し上げます。多くの研究は、同助教宗宮仁美先生、元大学院生大塚正成先生（現：基礎生物学研究所博士研究員）と共同で行われたものであり、逆行性トレーサーを用いた投射パターンの解析は岐阜大学医学部高次神経形態学元教授伊藤和夫先生、同准教授中村浩幸先生との共同研究にて行われました。厚く御礼申し上げます。現在、分子生物学研究室所属の大学院生、学部学生の協力の下、新たなる成果を求めて継続して研究を行っております。この場を借りて、感謝申し上げるとともに、今後ともよろしくお願い申し上げます。

REFERENCES

- 1) Angevine J., Sidman R., *Nature*, **192**, 766–768 (1961).
- 2) Levi-Montalcini R., Hamburger V., *J. Exp. Zool.*, **116**, 321–361 (1951).
- 3) Teng K. K., Hempstead B. L., *Cell. Mol. Life*

- Sci.*, **61**, 35–48 (2004).
- 4) Ernfors P., Merlio J. P., Persson H., *Eur. J. Neurosci.*, **4**, 1140–1158 (1992).
- 5) Fryer R. H., Kaplan D. R., Feinstein S. C., Radeke M. J., Grayson D. R., Kromer L. F., *J. Comp. Neurol.*, **374**, 21–40 (1996).
- 6) Fukumitsu H., Furukawa Y., Tsusaka M., Kinukawa H., Nitta A., Nomoto H., Mima T., Furukawa S., *Neuroscience*, **84**, 115–127 (1998).
- 7) Johnson J., Oppenheim R., *Curr. Biol.*, **4**, 662–665 (1994).
- 8) McConnell S. K., Kaznowski C. E., *Science*, **254**, 282–285 (1991).
- 9) Fukumitsu H., Ohtsuka M., Murai R., Nakamura H., Itoh K., Furukawa S., *J. Neurosci.*, **26**, 13218–13230 (2006).
- 10) Takahashi T., Nowakowski R. S., Caviness V. S. Jr., *J. Neurosci.*, **15**, 6046–6057 (1995).
- 11) Medina D. L., Sciarretta C., Calella A. M., Von Bohlen Und Halbach O., Unsicker K., Minichiello L., *EMBO J.*, **23**, 3803–3814 (2004).
- 12) Bartkowska K., Paquin A., Gauthier A. S., Kaplan D. R., Miller F. D., *Development*, **134**, 4369–4380 (2007).
- 13) Ohtsuka M., Fukumitsu H., Furukawa S., *J. Neurosci. Res.*, **87**, 301–306 (2009).
- 14) Ohtsuka M., Fukumitsu H., Furukawa S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **369**, 1144–1149 (2008).
- 15) Deverman B. E., Patterson P. H., *Neuron*, **64**, 61–78 (2009).
- 16) Noctor S. C., Martínez-Cerdeño V., Ivic L., Kriegstein A. R., *Nat. Neurosci.*, **7**, 136–144 (2004).
- 17) Chenn A., Walsh C. A., *Science*, **297**, 365–369 (2002).
- 18) Hirabayashi Y., Itoh Y., Tabata H., Nakajima K., Akiyama T., Masuyama N., Gotoh Y., *Development*, **131**, 2791–2801 (2004).
- 19) Kuwahara A., Hirabayashi Y., Knoepfler P. S., Taketo M. M., Sakai J., Kodama T., Gotoh Y., *Development*, **137**, 1035–1044 (2010).
- 20) Soumiya H., Fukumitsu H., Furukawa S., *J. Neurosci. Res.*, **89**, 1342–1350 (2011).
- 21) Soumiya H., Fukumitsu H., Furukawa S., *J. Neurosci. Res.* (in press)