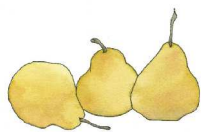


大脳皮質の形成と機能発現を担う分子・細胞基盤について ～神経細胞移動とその解明を支える技術～



医療と技術

佐藤 真*

Microscopic migration disorder due to mal-translocation
onto the radial glial processes

Key Words : radial migration, inside-out, neocortex, psychiatric disease

1. はじめに

ちょっとしたブームなのか、「脳」とか「脳科学」を冠したタイトルの書籍を目にすることが増えてきた。脳研究の成果をつまみ食いかつ拡大解釈し、「生き方」を指南するような本さえ出版されているようだ。

一方、我々脳を研究対象とする基礎医学者から見れば、その理解はまだまだ道半ばで、現状はとても声高に「脳がわかった」とか「研究の成果を他分野に応用できる」などと胸を張っていえる段階ではない。脳は神経細胞同士のネットワークからなる多層システムであって、どの階層で脳を理解しようとするかによりその内容が大きく異なることは事実だが、複雑な人間の思考や感情の解明、さらには精神神経疾患の成因や病態、いわゆる治療法の開発は、全くもってこれからの段階だ。その中にあって、我々は、分子・細胞のレベルで脳を理解するべく研究を進めている。分子・細胞のレベルでは関わる「役者」の働きが明確で、成果は創薬にもつながりうる。加えて、分子・細胞を単位とすれば、構成論的に脳を捉えることも可能と信じるからだ。脳は大変複雑で、それゆえに理解が困難だとされる。そうであれば脳の形成原理を解き明かし、その原理に基づき、脳を再構築し、そして機能に迫りたい。もっともこれこ

そ道半ばではあるが。

ヒトの脳は進化の極みの構造物だといわれる。確かに、学習や連想などの機能を、間違うことなく実現できることは素晴らしい。しかしながら、生物学的にみれば、この見方は必ずしも正しくない。我々の脳にも進化的に下等な生物と類似する部分があるし、実際本能行動と知性はかなり違う原理に基づく。つぎはぎを繰り返し、すなわち、進化的に古い脳に、新たな機能を実現する部分が加わり進化してきたというのが現実に近い。

さて、では高等動物にて新たに加わった部分は何か。粗略をお許しいただけるのであれば、それは、いわゆる大脳皮質であろう。いわゆる大脳（解剖学では終脳ともいう）の一部分であり、多くのしわ（この部分を回という）をもつ大脳皮質の写真を目にした方も多いであろう。念のため記すと大脳皮質と呼ばれる神経細胞が層をなし存在する部分は、大脳のなかの表面、厚さはわずか数ミリで、神経細胞が密に集合した部分のことを指す。大脳をリングに例えると、赤い皮の部分に相当するのが大脳皮質である。

最近のゲノム研究によれば、統合失調症などの精神疾患発症への脆弱性や発症そのものに関わる候補分子は想像よりはるかに多い。しかしながら、その病像は類似する。これは、多くの分子に関わる何らかの現象があり、関わる分子のいずれかが障害された場合、同じような変化が生じている可能性を示唆する。一方で、例えば統合失調症に関わる分子の多くが神経形成に関連するとの報告もある¹。では、多くの分子に関わり、しかもその障害により、疾病発症につながり得る同じような変化が生じることがあり得るか？あり得るとすれば、それはどのような出来事か？

我々は、その出来事の一つが神経細胞移動であろうと考え研究を進めてきた。実は大脳皮質の神経細胞



* Makoto SATO

1960年1月生
大阪大学大学院 医学研究科 修了
(1991年)

現在、大阪大学大学院 医学系研究科・
解剖学講座（神経機能形態学）／連合小
児発達学研究所・こころの発達神経科学
講座 教授 医学博士 発達神経科学、
神経解剖学

TEL : 06-6879-3220

FAX : 06-6879-3229

E-mail : makosato@anat2.med.osaka-u.ac.jp

胞の多くは、大脳皮質外で生まれ皮質内へと移動後、整然と層を構築する。そして、層ごとに異なる機能を担い働く^{2,3}。我々は、この細胞移動には、多くの分子に関わる特定の段階があること、そして、その段階に関わるいずれかの分子の障害により、一見、できあがった脳の組織像からは見分けようのない、些細ともいえる構築異常（神経細胞配置異常）が生じることに気がついた。そして、その乱れが、大脳皮質の機能に影響し、さらには精神疾患発症の脆弱性や発症へとつながる可能性を見いだした。精神疾患との関連性に関する直接的な証明は、ヒトを対象とするため不可能ではあるが、どのように多くの分子に関わり、細胞構築がなされるのか、その現象を緻密に解き明かすべく研究を重ねてきた。

拙稿では、上述のステップに関する我々の研究と関連する研究の手立ての概略について紹介させていただく。特に本書の読者には「技術」に興味を持たれている方も多いであろうと推察し、現象を「見る」ための技術的工夫も最後にまとめた。なお、関わる分子についての詳細な説明は紙面の都合もあり、省略した。

2. Radial migration とインサイドアウト

大脳皮質の約7～8割を占めるグルタミン酸を神経伝達物質とする神経細胞は胎生期に大脳皮質下最深部の脳室帯で神経細胞に最終分化し（生まれ）、そこから法線方向に、すなわち表層（将来の大脳皮質の方向）に向かい移動し大脳皮質を構築する²。この移動を radial migration と呼ぶ。この移動には細胞体が脳室帯にあり、突起を脳表へと伸ばすラディアルグリアと呼ばれる細胞が重要な役割を担う³。脳室帯を離れた移動神経細胞は、しばらく移動後ラディアルグリアの突起に乗る形で、いわばその突起をレールがわりに使い、法線方向に移動することが知られている（図1）。この移動開始と移動は厳密に制御されており、6層構造をとる大脳皮質（図2）において、最浅層（I層）と最深層（厳密にはIVb層とよばれる）を除き、深層の神経細胞から先に生まれ、移動し皮質を構築することが知られている。故に、表層で機能するべく生まれた神経細胞は、先に移動した深層の神経細胞を追い越してより表層に位置する。この特徴的な皮質構築の様子はインサイドアウト（inside-out）様式と呼ばれ、移動神経細

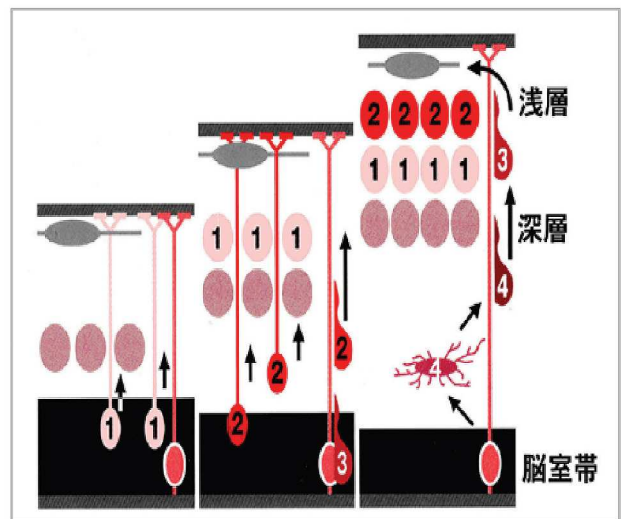


図1 radial migrationの様子

神経細胞はラディアルグリア（細胞体は脳室帯内の赤丸で示す）の突起をレールがわりに将来の大脳皮質の位置（図上側）に移動する。大脳皮質下最深部（脳室帯）で早く生まれた神経細胞（1）を後から生まれた神経細胞（2, 3の順に遅い）が追い抜きより表層に位置する（インサイドアウト）。4の細胞は最後に生まれたものだが、4で示す二つの細胞はちょうどラディアルグリアの突起に移乗する前後の状態に相当する。

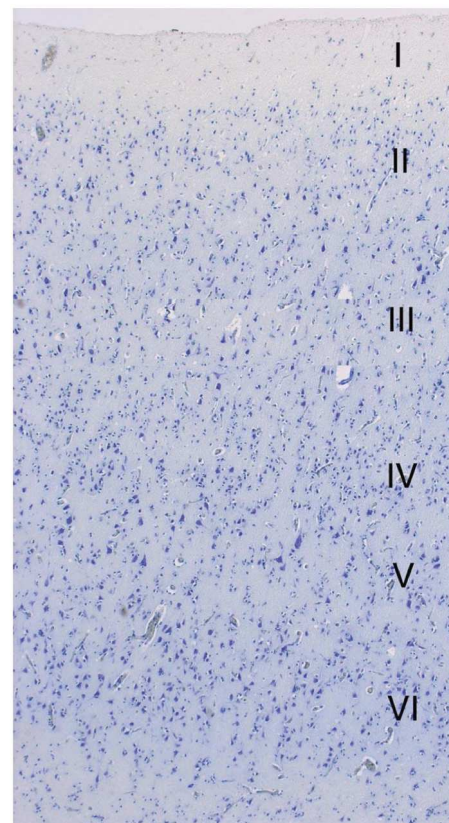


図2 ヒト大脳皮質での細胞配置（ニッスル染色）
細胞体が染色されている。ローマ数字は大脳皮質の層（I～VI）を示す。

胞による大脳皮質の形成を考える基本原則として広く信じられている (図1)³。ちなみに、ヒトでは大脳皮質のII層、III層の神経細胞が他の動物種に比べ増加していることが大きな特徴であり、げっ歯類では大脳最深部にのみ存在するラディアルグリアであるが、ヒトでは細胞移動途中にあたる領域にもラディアルグリア (特に outer radial glia と呼ばれる) が存在し、特に大脳皮質形成の後期に、この領域で神経細胞が生まれ、outer radial glia の突起をレールとした神経細胞が加わり、大脳皮質の特にII～III層の神経細胞として機能することが報告されている⁴。

3. ラディアルグリアへの移乗障害による大脳皮質構築異常

上述のように、移動に際し神経細胞はラディアルグリアの突起に‘移乗’する。すなわち、細胞間隙

を移動していた細胞が、ラディアルグリアの突起の上に乗り移る (図1)。実際にこの現象を‘見て’みると (図3)、意外にもこの現象に関わる分子が多く、かつそれら分子がうまく働かないと、ラディアルグリアへの移乗がうまくいかず、後から来た神経細胞に先を越される場合があること、すなわちインサイドアウトの破綻が生じることがわかった (図4、5)⁵。移乗に際しては、移動神経細胞からのびる神経突起 (将来の樹状突起) の先端に、掌と指を持つ手のような小さな構造物 (これを成長円錐という) ができ、その指の部分 (これを糸状突起という) が周囲を探索し、ラディアルグリアの突起を、あたかも掴むが如く動き、その後移乗していた (図3)。専門的になるが、radial migration では、ラディアルグリアの突起上を移動するため、特別な細胞移動様式で、転移を含むがん細胞などの細胞移動で主要な役割を果たすアクチンとよばれる分子はほとんど

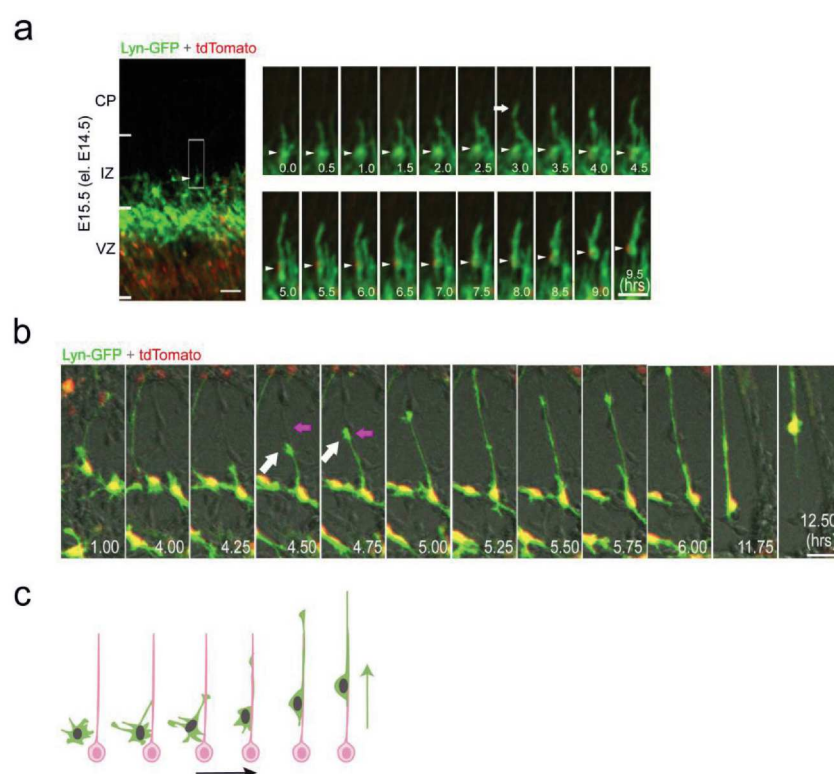


図3 神経細胞のラディアルグリアへの移乗の様子⁵

- a: 細胞全体の形態の可視化のため、細胞膜局在シグナルを付与した緑色蛍光タンパク (Lyn-GFP) 遺伝子を神経細胞に発現させ、大脳皮質内で神経細胞が移動する様子を時間を追って観察した (本文5 (2) も参照されたい)。細胞体 (矢頭、赤色蛍光蛋白 tdTomato 発現遺伝子を導入し標識) から先端突起 (矢印) が延びている。緑と赤が重なった部分は黄色にみえる。図の上が脳表方向に相当する。胎生期 14.5 日に遺伝子を導入し、1日後に脳を取り出し、スライスした脳組織を顕微鏡下で培養し観察した。
- b: 細胞体から延びる突起、特に先端の成長円錐 (白矢印) がラディアルグリアの突起 (ピンク矢印) を認識し、細胞が移乗する (本文5 (3) も参照されたい)。
- c: 移乗の様子を時系列で表記した模式図。神経細胞を緑で、ラディアルグリアをピンクで示す。黒矢印は時間経過を、上方向の緑矢印は神経細胞の移動方向を示す。

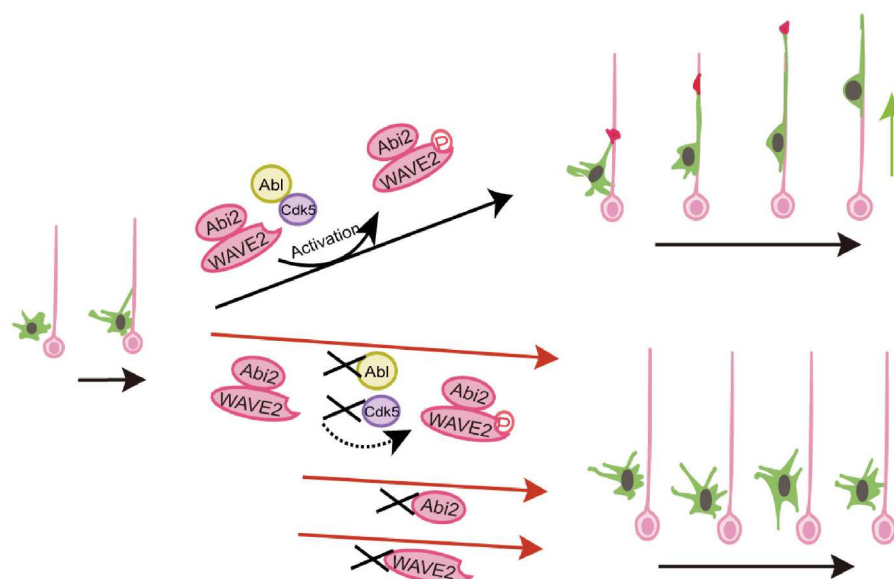


図4 ラディアルグリアへの移乗に係る分子機構の模式図⁵

移動する神経細胞を緑で、その先端突起先端の成長円錐を赤で示す。ピンクはラディアルグリア。アクチン線維の制御にかかわる分子 WAVE2 がリン酸化酵素 Cdk5 (この過程には Abl も関わる) によりリン酸化 (P で示す) を受け、Abi2 と共同し、この移乗を制御する (右上)。いずれかが障害されると移乗過程は成立しない (右下)。移乗の図の黒矢印は時間軸を示す。分子に関する詳細は文献5を参照されたい。

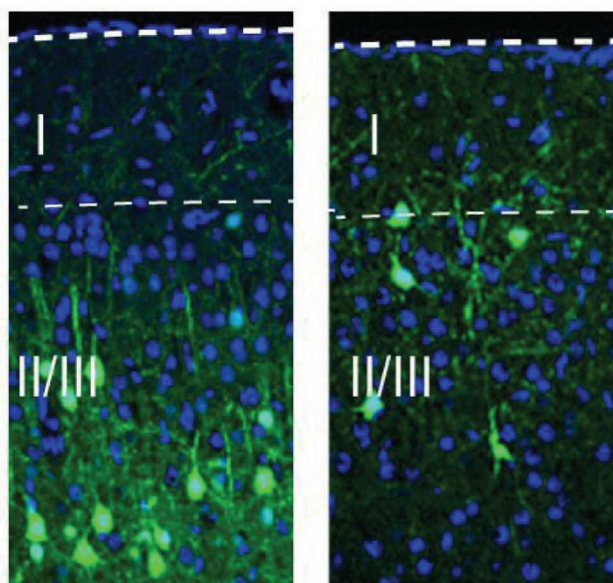


図5 Abi2 の遺伝子ノックダウンによる神経細胞のマウス大脳皮質内配置異常の例⁵

右はラディアルグリア突起への移乗にかかわる Abi2 分子の機能を落とした細胞の例 (左は対照例)。右では、左に比べ同時期に生まれた神経細胞 (緑色) がより表層に位置している (神経細胞は胎生期 14.5 日に GFP 発現遺伝子を導入して標識し、生後 21 日目に観察した)。ローマ数字は大脳皮質の層を、上の破線は脳表を、下の破線は I 層の境界を示す。細胞の核を Hoechst 色素で青く染めている。

無関係と考えられてきた。しかしながら、我々は、実は移乗時には成長円錐の活動が重要で、さらにはその活動を支えるアクチンが重要な役割を果たすことを見出した。そして、その分子制御系の一端を解明し報告した (図4)⁵。成長円錐の活動には、一般に多くの分子が関わるため、機能不全の結果、同様の表現形を示す分子は多いものとも想像された。

4. 神経細胞配置異常のその他の例と脳機能

上述の移乗現象に加え、我々は、神経細胞移動に関わる幾つかの分子を同定し、その機能解明も行ってきた。FILIP (filamin A interacting protein) は我々が初めて同定、命名し報告した分子⁶であるが、いわゆる radial migration の制御に関わり⁷、そのノックアウトマウスでは表層の神経細胞配置に乱れが生じた (未発表)。このマウス脳における神経情報伝播の様子を電位感受性色素を用い観察したところ、そのノックアウトマウスでは、明らかに大脳皮質内の興奮伝播の様子が変化していた (図6)⁸。ちなみに、昨年 FILIP (ヒトでは FILIP1) は統合失調症に関わることが報告された⁹。FILIP は、神経情報伝達にも関わりうることから、神経細胞配置の異常のみがこの原因であると断言はできないが、神経細胞配置

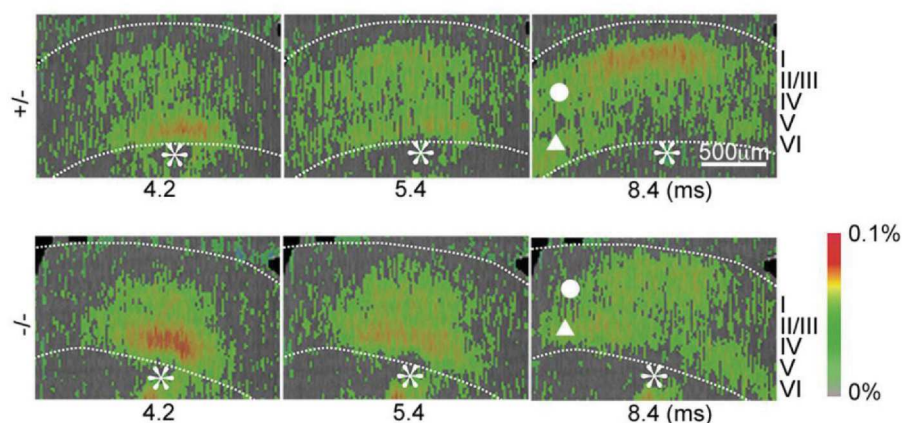


図6 大脳皮質（第一次視覚野）での神経興奮伝播の様子⁸

電位感受性色素を用い、皮質への入力線維を刺激し（刺激部位を*で示す）生じる皮質内神経興奮伝播の様子を脳スライスで観察した。赤色が高い興奮度を示す。上段はコントロール（FILIPノックアウトヘテロマウス）、下段はFILIPノックアウトマウス脳を示す。FILIPノックアウトにより、特にII/III層での興奮神経伝播が変化している様子が分かる（刺激後、8.4ms、右端パネル）。破線は大脳皮質の境界を示す。

異常一大脳皮質の機能不全—精神疾患発症の脆弱性をつなぐ可能性を示す例として興味深いと考えている。

5. 実験を支える技術について

上述の実験は、以下の工夫があり実施できた。特徴的な技術について簡単に説明させていただく。

（1）胎児大脳皮質の遺伝子発現を自在に操作する。

遺伝子はプロモーターとよばれる領域により、その発現が制御されている。一方、今や、プロモーターを介さず、人工的に特定の遺伝子の発現をON/OFFすることは容易である。すなわち、ONの場合は、遺伝子を発現させるベクターを細胞に導入し、OFFの場合はいわゆるRNAi技術を用い、特定の配列を発現させるベクターを導入すれば、狙った遺伝子発現の抑制（ノックダウン）ができる。そこで、これらを胎児脳に電気的に導入し、そのまま子宮内に胎児を戻し、成長させることで、脳形成・発達におけるそれぞれの遺伝子の意義が解明できるようになった（図5）。今では、脳内の細胞に導入するベクターに染色体組み込み部位を付し、さらに薬剤反応性のプロモーターを用いることにより、生後も含め任意の時点で遺伝子発現を制御することができる¹⁰。

（2）移動細胞の挙動を高解像度で可視化し、時間を追って観察する。

生きたままの脳内深部を観察できる多光子顕微鏡、もしくは擬似的ではあるが、大脳皮質の組織片を作

成し、そのまま顕微鏡下で培養し、観察することで、実際の脳組織内での移動細胞の挙動が観察できる。多くの細胞があるため、狙った細胞のみを観察することが必要だが、そのためには、GFP（green fluorescent protein）などの蛍光蛋白をコードする遺伝子を、上述（1）の方法にて細胞に導入し、観察すればよい。ただし、細胞の形態を観察する場合、この蛍光色素に細胞膜局在シグナルを付すことで、いわゆる細胞の形が可視化される。さらに、多くの細胞が標識されると個々の神経細胞の観察が困難になるため、遺伝子組み換え因子の存在下でのみ、GFP遺伝子が遺伝子組み換えの結果できるようなベクターを神経細胞に導入し、さらに組み換えを起こす遺伝子を別途、十分薄め遺伝子導入させる。このことで、ごく少ない数の神経細胞で、かつそこでは観察に耐えうる十分な量のGFPを発現させることができる（図3a）。

（3）神経細胞移動、特にラディアルグリア突起への移乗を *in vitro* で観察する。

ラディアルグリア突起と個々の神経細胞の一部の形態（特に神経突起先端の成長円錐）の可視化、タイムラプス観察が必要である。神経細胞とラディアルグリア細胞を一旦バラバラにし、その中にデキストラン硫酸などを加えると、細胞の一部が凝集し、凝集塊同士がラディアルグリア等の突起で結ばれる。この系ではラディアルグリアと神経細胞の相互作用を明瞭に観察できる（図3b）。我々は、この突起が生じる条件を最適化し、解析に用いた⁵。

おわりに

本稿では、脳科学（神経科学）を専門とされない方々を念頭に、我々の研究の一端とそれを支える技術を紹介させていただいた。神経科学を支える技術は急速に進歩している。神経活動を光で操作する光遺伝学や大変短時間（実験操作自体は最短で1週間）でノックアウトマウスが作製できる CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術など脳研究を支える周辺技術の進展には目を見張るものがある。ヒトへの応用も、BMI (brain machine interface) など、少し前には SF 小説の中の話でしかありえなかった技術も実用化が図られている。このようななかで、高次機能や心の動きの仕組みの解明、さらには精神疾患などへの効果的な創薬は、今後着実に進展していくものと期待される。実は「脳が分かった」と言える時代は案外近いのかもしれない。我々も、微力ではあるが、この進歩に貢献できればと願い、日々実験を重ねている。

参考文献

- Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, Addington AM, Pierce SB, Cooper GM, et al., Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science*. 2008, 320(5875):539-543.
- Parnavelas JG. The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci*. 2000, 23(3):126-131.
- Rakic P. A century of progress in corticoneurogenesis: from silver impregnation to genetic engineering. *Cereb Cortex*. 2006, 16 Suppl 1:i3-17.
- Hansen DV, Lui JH, Parker PR, Kriegstein AR. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature*. 2010, 464(7288):554-561.
- Xie MJ, Yagi H, Kuroda K, Wang CC, Komada M, Zhao H, Sakakibara A, Miyata T, Nagata K, Oka Y, Iguchi T, Sato M. WAVE2-Abi2 complex controls growth cone activity and regulates the multipolar-bipolar transition as well as the initiation of glia-guided migration. *Cereb Cortex*. 2013, 23(6):1410-1423.
- Nagano T, Yoneda T, Hatanaka Y, Kubota C, Murakami F, Sato M. Filamin A-interacting protein (FILIP) regulates cortical cell migration out of the ventricular zone. *Nat Cell Biol*. 2002, 4(7):495-501.
- Nagano T, Morikubo S, Sato M. Filamin A and FILIP (Filamin A-Interacting Protein) regulate cell polarity and motility in neocortical subventricular and intermediate zones during radial migration. *J Neurosci*. 2004, 24(43):9648-9657.
- Yagi H, Nagano T, Xie MJ, Ikeda H, Kuroda K, Komada M, Iguchi T, Tariqur RM, Morikubo S, Noguchi K, Murase K, Okabe M, Sato M. Filamin A-interacting protein (FILIP) is a region-specific modulator of myosin 2b and controls spine morphology and NMDA receptor accumulation. *Sci Rep*. 2014, 4:6353. doi: 10.1038/srep06353.
- Gulsuner S, Walsh T, Watts AC, Lee MK, Thornton AM, Casadei S, Rippey C, Shahin H; Consortium on the Genetics of Schizophrenia (COGS); PAARTNERS Study Group, Nimgaonkar VL, Go RC, Savage RM, Swerdlow NR, Gur RE, Braff DL, King MC, McClellan JM. Spatial and temporal mapping of de novo mutations in schizophrenia to a fetal prefrontal cortical network. *Cell*. 2013, 154(3): 518-529.
- Iguchi T, Yagi H, Wang CC, Sato M. A tightly controlled conditional knockdown system using the Tol2 transposon-mediated technique. *PLoS One*. 2012;7(3):e33380. doi:10.1371/journal.pone.0033380.