

1. 研究課題名 : 大脳皮質における機能的領野のパターン形成機構

2. 研究者氏名 : 田辺 康人

グループメンバー : 長谷川 潤 (研究期間 H13.2.1. ~ H15.9.30.)

高松 昌子 (研究期間 H12.11.14. ~ H15.9.30.)

3. 研究の狙い :

中枢神経系を構成する多種多様な神経細胞群は、その構成様式の根本である。中枢神経系においては、個々のシステム特有な内因的・外因的パターン形成機構によりシステムを構成する多種多様な構成要素の個々の特異性、並びに、他の構成要素との関係性が確立されていく。本研究は、中枢神経系のうち、ヒトにおいて特に発達している大脳皮質を系として取り扱い、大脳皮質の発生から成熟に到るまでの過程において、大脳皮質の皮質構築の為に、どのような層形成・領野形成といったパターン形成機構が働いているのか、包括的・システムの理解を目指すものである。

大脳皮質が構築されていく過程で、解析の対象となる構成要素には、少なくとも三種が存在する。それらは、興奮性の皮質投射ニューロン、抑制性の皮質介在ニューロン、そして他の皮質細胞に先駆けて発生してくる Cajal-Retzius 細胞である。それら個々の構成要素には、どのような多様性があり、どのような性質をもつのか、また、更には、これら三者が、発生・成熟過程において、どのような順序、関係性で作用しあい、大脳皮質を構成する個々の機能的領野の形成に結びつくのか、解析の対象となる。

このように、構成要素が多種多様であり、また個々の構成要素がお互いに特異的な関係性を構築しているようなシステムを対象とした場合の一つの解析手段として、それら一つ一つの構成要素に焦点を当て、個々の要素にどのような遺伝子情報が発現されているのか、ポストゲノム時代を踏まえて網羅的に解析するアプローチ (遺伝子プロファイリング) をとることが、その生命現象を正確に理解していくための確固とした基盤を与えると考えた。また、個々の細胞がどのような関係性でお互いを規定し、システム全体として統合されているのか、その細胞がシステム全体の中で示す役割を明らかにする (細胞プロファイリング) ことが、対象とした生命現象の細胞レベルでの包括的理解に結びつくと考えた。この為、本研究においては、単一細胞種レベルでの発現遺伝子プロファイリング、細胞プロファイリングに基づいて、大脳皮質の組織形成・機能的構築の制御・維持機構を明らかにすることを目指した。

4. 研究結果 :

皮質投射ニューロンの発生・発達機構の上での問題点として、まず、皮質投射ニューロンがどのように層特異性を獲得するのかを取り扱い、その層形成機構が FGF signalling により調節されている事を明らかにした (J. Neurosci 投稿中)。次に、単一細胞レベルでの遺伝子発現プロファイリング法を適用することにより、大脳皮質 6 層構造のうち、第 6 層を構成する皮質投射ニューロンの軸索投射パターンを調節するホメオドメイン転写因子の単離・同定に成功した。一方、皮質介在ニューロンは大脳皮質の腹側に位置する線条体原基において発生し、皮質内に細胞移動してくることが知られているが、皮質介在ニューロンを、個々の発生機構に従って標識し、選択的に単一細胞種レベルでの解析を可能にするマウス遺伝学を用いた解析系を構築した。また、

Cajal-Retzius 細胞の発生 発達機構の解析系として、Cajal-Retzius 細胞が特異的に GFP 蛍光色素により遺伝学的に標識されたトランスジェニックマウスを用いた。この GFP 標識された Cajal-Retzius 細胞に対する電氣的穿孔法を用いた解析から、今まで考えられていた様式とは異なる、新たな Cajal-Retzius 細胞の発生様式を明らかにした (J. Neurosci 投稿中)。更に、発現遺伝子プロファイリングの観点から、GFP 蛍光を指標に Cajal-Retzius 細胞を選択的に FACS を用いて単離し、皮質投射ニューロンとの比較で遺伝子発現プロファイリングをおこない、新たな生理的役割を説明しうる分子の同定を推し進めた。

5. 自己評価 :

研究の 3 本柱として打ち立てたもののうち、興奮性の皮質投射ニューロン、Cajal-Retzius 細胞に関して研究の一応の成果を得ることができたと考えている。単一細胞レベルで皮質投射ニューロンを解析していくために、GFP による電氣的穿孔法を用いた層特異的な in vivo 細胞標識系の導入 確立を図ったが、これに時間がかかり、当初の研究計画より大幅な遅れをとった。しかしながら、研究の後半に入り、実験系が動き始めると、深層投射ニューロンの軸索投射パターン獲得に働いている転写因子の同定に成功し、一応の成果を得たことを評価している。また、系の確立に努めている間に、副次的な仕事として展開していた FGF signalling に関する仕事においても一定の成果を得たことは評価できるのではないかと考えている。Cajal-Retzius 細胞は、従来、皮質層形成においてのみ重要な働きを示す事が知られていたが、我々が Cajal-Retzius 細胞に関して得た発見は、皮質領野形成にも Cajal-Retzius 細胞が重要な働きを示すことを示唆し、従来より謎の多かった大脳皮質のような大きな組織の包括的な領野形成機構の理解を進める大変重要なものであると考えている。以上の幾つかの仕事を論文としてまとめる段階に到っている。皮質構築といった問題に対して、このように、一つ一つの細胞に焦点を当てていくアプローチにおいては、木を見て森を見ず」といった個々の細胞種個別の問題に陥りやすい。そういった問題の可能性をいち早く予見し、細胞プロファイリングとして、個々の単一細胞種を生まれの機構に従って標識し、細胞欠失させ、全体の育ちの過程の中での機能を問う為のマウス遺伝学を用いた系の確立を研究計画の早い段階から計画した。皮質介在ニューロンが皮質構築の中でどのような機能的役割を演じているのかを解析していくことに焦点を当て、マウス実験系を構築 確立してきたが、ノックアウトマウスおよび 10 系統以上のトランスジェニックマウスの構築には多大な労力を必要とした。個々の単一細胞種に焦点を当てる遺伝子プロファイリング 細胞プロファイリングを用いた皮質構築発達機構の解析は、壮大な試みである。終わりは始まり。3つの柱として打ち立てたものをものから得られた発見は、いずれもこれからの大きな研究展開の萌芽となるものであり これらを確認とした基盤として、総和」としての皮質構築のための研究展開を進めていきたい。「人であるということは、とりもなおさず責任を負うということである。」一緒に研究を進めてくれた研究員 (長谷川潤博士)、研究技術員 (高松昌子さん) に心から感謝したい。

6. 研究総括の見解 :

一個の細胞のもつ遺伝情報を増幅し、実験の俎上に持ち込むシングルセル PCR 技術を持っている。その技術を駆使して、脳組織の形成およびそれが発現する高次機能とその異常を解析しようという野心的挑戦を行ってきた。本 PCR 技術を有する研究者はまだ数少なく、研究は漸く佳境期に入りつつある。今後の展開が注目される。

7. 主な論文等 :

1. Hiroshi Hasegawa, Sizuko Ashigaki, Masako Takamatsu, and Yasuto Tanabe
2. Laminar Patterning of the Developing Neocortex by Temporally-Coordinated FGF Signalling Pathway. Submitted to J. Neurosci.
3. Keiko Takiguchi-Hayashi, Mariko Sekiguchi, Shizuko Ashigaki, Masako Takamatsu, Hiroshi Hasegawa, Rika Suzuki-Migishima, Minesuke Yokoyama, Shigetada Nakanishi, and Yasuto Tanabe
4. Generation of Reelin-positive Marginal Zine Cells from the Caudal-Medial Wall of Telencephalic Vesicles. J. Neurosci., in revision.

発表

1. Yasuto Tanabe , Hiroshi Hasegawa, Shinichi Narita, Masako Takamatsu, The Application of single cell-based PCR approach for the analysis of CNS diversification. The 24th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and the Second Joint-Meeting of the Japan Neuroscience Society and the Japanese Society for Neurochemistry, Kyoto, Japan, 2001 年 9 月 26 日