

75. 成体脳内を高速移動するニューロンのブレーキング機構

澤本 和延

Key words : 脳, ニューロン, ブレーキ, 細胞移動,
Gmip

名古屋市立大学 大学院医学研究科
再生医学分野

緒言

脳内で幹細胞から作られる新生ニューロンは、目的地まで移動した後で分化し、神経回路に組み込まれる。このようなニューロンの移動が起こるのは、胎生期の発生過程だけではない。様々な動物の成体脳において、側脳室の外側壁に沿って存在する脳室下帯に神経幹細胞のニッチが存在し、継続的にニューロンが産生されている。これらの新生ニューロンは、前方へ向かって長距離を高速度で移動し、嗅球内で神経回路に組み込まれる。

これまで我々は、このような成体幹細胞から生まれた細胞が、目的地へ移動・分化する過程を研究してきた。その結果、1) 脳室壁の繊毛運動による細胞の移動方向の決定、2) 移動するニューロンがアストロサイトにトンネル状の移動経路を形成させる機構、3) 感覚入力依存的な最終停止位置の決定機構などのメカニズムが明らかになった。

さらに我々は、脳梗塞や外傷によって脳細胞が失われると、脳室下帯で生まれる細胞の一部が血管などの足場に沿って傷害部位へ移動し、ニューロンに分化することを明らかにした。しかしながら、このような内在性の幹細胞によるニューロンの再生は効率が低く、失われた細胞のごく僅かのみしか再生しないため、機能回復には至らない。再生過程において傷害部位へ到達するニューロンの数が不足する原因の一つとして、移動速度が遅いことが考えられる。ニューロンを効率良く適切に移動させるためには、移動経路を通過中には適切な移動速度を維持し、目的地に到達後は速やかに停止することが重要であると考えられる。これまでに、ニューロンの移動を促進する「アクセル」については活発に研究されているが、「ブレーキング」のメカニズムには不明な点が多い。ニューロンが移動する際には、1本の長い先導突起を移動方向に向かって伸長し、その後、細胞体が先導突起を追いかける「跳躍運動」と呼ばれる運動を繰り返す。従って、細胞の移動速度は、跳躍する際の、「歩幅」、「歩数」、「休憩時間」の長さなどによって決まると考えられるが、その詳細は不明である。ニューロンの移動において Rho シグナルがアクチン動態を制御し、移動をコントロールしていることが明らかになっている¹⁾。しかし、ニューロンの移動過程における Rho シグナルの制御機構は不明である。

我々は、細胞移動に必要なアクチン結合蛋白質 Girdin²⁾と相互作用する分子の網羅的探索を行い、RhoA を負に制御する GAP 活性を有する蛋白質 GMIP を同定した³⁾。本研究では、GMIP がニューロンの移動においてブレーキ分子として機能しているという仮説を立てて、以下の3点を解明するための実験を行った。

- 1) GMIP は RhoA に対してどのように作用するのか？
- 2) GMIP によるブレーキングのメカニズムは？
- 3) GMIP を用いて脳内におけるニューロンの移動速度をコントロールすることは可能か？

方法および結果

上述の目的 1 - 3) を達成するため、以下の実験を行った。

1. GMIP の RhoA 活性に対する作用

移動するニューロン内の RhoA 活性を FRET イメージング法によって可視化した。先導突起の基部などにおいて活性化が起こることが明らかになった。そこで、培養した新生ニューロンを用いて、Gmip 遺伝子をノックダウン (KD)

して発現を抑制した場合に、これらの部位における RhoA 活性がどのように変化するかを測定した。Gmip KD によって RhoA の過剰な活性化が起こった (図 1)。

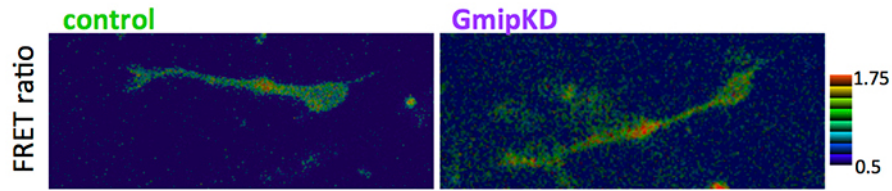


図 1. Gmip による RhoA 活性の制御。

FRET イメージングにより培養した新生ニューロンの細胞内における RhoA 活性を可視化した。先端突起の膨大部 (swelling) において比較的高い活性 (赤色) が観察される。control (左) に比べて、Gmip KD (右) の方が、RhoA 活性が上昇していることがわかる。

このような Gmip KD の効果は、Gmip 遺伝子を同時に発現させることによって、レスキューされた。一方、GAP 活性を持たない変異型 Gmip を同時に発現させた場合には、レスキューされなかった。

2. GMIP の培養ニューロンの移動速度に対する影響

Gmip のニューロンの移動速度に対する影響を調べるため、蛍光レポーターとして GFP を含む Gmip KD ベクターを電気穿孔法によって脳室壁に導入した。3 日後に脳のスライスを作製して培養し、嗅球へ向かって移動する蛍光標識されたニューロンの形態変化と速度を記録した。Gmip KD によって、ニューロンの移動速度が有意に上昇した (図 2)。

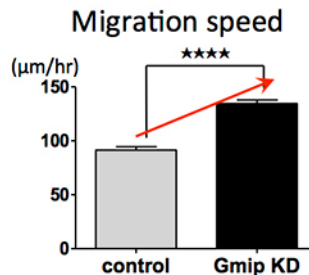


図 2. Gmip による移動速度の制御。

培養スライスを用いた実験により、control (左) に比べ、Gmip KD (右) ベクターを導入されたニューロンの移動速度は有意に速いことが明らかになった。**** $P < 0.0001$, t-test.

タイムラプス解析によって、ニューロンの跳躍運動に与える影響を調べた。移動速度に影響を及ぼすと考えられる移動の歩幅、歩数、休憩時間の長さなどに着目して定量的に解析した。その結果、ニューロンの休憩時間が短くなることが判明した。また、RhoA の活性化が起こる先端突起内の膨大部 (swelling) の出現頻度や持続時間が増加し、細胞体と swelling の距離が長くなることが明らかになった。

3. GMIP による脳内のニューロン移動に対する影響

Gmip による移動速度の変化が、脳内におけるニューロンの移動にどのような影響を及ぼすのかを解析するため、蛍光レポーターとして GFP を含む GMIP KD ベクターをエレクトロポレーション法によってマウスの脳室壁に導入し、1 週間経過した後で、脳のスライスを作製して培養した。嗅球内を移動する蛍光標識されたニューロンを解析した。コントロールベクターを導入された細胞は、嗅球に達すると急速に速度を低下させて停止した。一方、Gmip KD ベクターを導入された細胞はブレーキング効率が低下しており、高速のまま嗅球組織を移動し続けることが明らかになった。

移動速度が変化した結果、新生ニューロンの停止位置や分化にどのような変化が生じるかを調べるため、4週間飼育した後で脳を固定し、嗅球内における分布と形態を詳細に解析した。その結果、Gmip KD ベクターを導入された細胞は、コントロールと比べてより長距離を移動し、嗅球の表層で停止・成熟することが明らかになった。

考 察

本研究によって、移動するニューロンの swelling 部において RhoA が活性化し、これを Gmip が負に制御していることが明らかになった。Gmip は、swelling の形成に影響を及ぼし、移動の休憩時間を調節して、速度をコントロールしていると考えられる。移動速度の変化が、嗅球内におけるニューロンの停止位置にも影響を与えたことから、ニューロンの移動速度の制御は、神経回路の構築にも関わる重要なプロセスであることが明らかになった。RhoA はニューロンの移動以外にも、例えば発生過程の細胞移動やがん細胞の浸潤など、様々な細胞現象に関わっている。GMIP が、これらのメカニズムにも関与しているのかどうかは不明である。

今後、疾患モデルを用いた検討によって、同様のメカニズムが傷害組織への移動にも関わっているのかどうかを明らかにすることも重要である。脳室下帯からの傷害部位への細胞移動を促進することができれば、内在性神経幹細胞による脳疾患の治療法に応用できる可能性がある。さらに、この方法は、iPS 細胞等を用いた再生医療の研究において、脳内に移植された細胞の移動を促進する方法としても役立つ可能性がある。

共同研究者

本研究の共同研究者は、名古屋市立大学大学院医学研究科の祖父江和哉と、名古屋大学大学院医学研究科の貝淵弘三および高橋雅英である。

文 献

- 1) Shinohara, R., Thumkeo, D., Kamijo, H., Kaneko, N., Sawamoto, K., Watanabe, K., Takebayashi, H., Kiyonari, H., Ishizaki, T., Furuyashiki, T. & Narumia, S. : A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in tangential migration of interneuron precursors. *Nat. Neurosci.*, **15** : 373-380, 2012.
- 2) Wang, Y., Kaneko, N., Asai, N., Enomoto, A., Isotani-Sakakibara, M., Kato, T., Asai, M., Murakumo, Y., Ota, H., Hikita, T., Namba, T., Kuroda, K., Kaibuchi, K., Ming, G. L., Song, H., Sawamoto, K. & Takahashi, M. : Girdin is an intrinsic regulator of neuroblast chain migration in the rostral migratory stream of the postnatal brain. *J. Neurosci.*, **31** : 8109-8122, 2011.
- 3) Ota, H., Hikita, T., Sawada, M., Nishioka, T., Matsumoto, M., Komura, M., Ohno, A., Kamiya, Y., Miyamoto, T., Asai, N., Enomoto, A., Takahashi, M., Kaibuchi, K., Sobue, K. & Sawamoto, K. : Speed control for neuronal migration in the postnatal brain by Gmip-mediated local inactivation of RhoA. *Nat. Commun.*, **5** : 4532, 2014.