

細胞培養技術開発チーム

Laboratory for Cell Culture Development

チームリーダー 小川 正晴

OGAWA, Masaharu

当研究チームは、神経組織の細胞培養系を開発し、このモデル実験系を使って主に脳の皮質構築の細胞分子過程を明らかにすること、その開発された技術を他の研究機関へ提供していくことを目的とする。

哺乳類の脳では、時空間的に制御された神経細胞の細胞増殖、細胞移動、細胞分化を経過して、特徴的な皮質層が形成される。脳の高次な機能の発現には、皮質ニューロンが正しい層に配列される必要がある。当研究チームは、脳皮質において、異なったタイプのニューロンが発生する機構、ならびにそれらが移動して正しい位置に配置される機構を解析していく。種々の細胞および組織培養法を開発駆使して、これらの機構に関係する細胞間相互作用、細胞間シグナル、ならびに遺伝子発現の調節などを調べる。

1. 脳原基の断面視を可能とする新型三次元培養法の開発（宮田，倉持）

脳の生理機能は正常な三次元構造があればこそ発揮される。脳の構造異常が重大な機能不全をもたらすことは、動物モデルのみならず、ヒトにおいても明確である。（リーラマウス，リーリンシグナリングの項参照）脳形成は、前駆細胞による細胞（とくにニューロンの）産生、そして生み出されたニューロンの移動ならびに配列から成し遂げられる。我々は、これまでに種々の培養技術を駆使して、ヒトを含めた哺乳類の脳、とりわけ「層構造」を有する大脳ならびに小脳皮質に注目してその構築メカニズム解明に挑んできた。我々の技術の1つが「低密度単層培養法」であるが、この方法では脳細胞の源である前駆細胞をバラバラにしてプラスチック皿の上で培養する。個々の前駆細胞が分裂し、ニューロンやグリア細胞を生み出す様子を直接観察できる。一方、より三次元的な視点から「微小外植培養法」や「再凝集培養法」、「器官培養法」をも独自に開発・利用してきた。「微小外植培養法」は胎生初期の非常に脆弱な前駆細胞を生存・増殖させるのに有効で、細胞外基質の重要性を明らかにした。「再凝集培養法」と「器官培養法」は、リーリンおよび関連分子のニューロン配列に関する生理作用を調べる機能実験系として極めて有効であった。これらの培養技術はもちろん現時点でもさまざまな目的に応じて利用価値が高いが、我々は、開発主なればこそ把握するこれらの培養技術の弱点・限界を踏まえつつ、先端技術開発部門としての役割を果たすため、新世代型培養系を確立することを昨年来試みてきた。

「低密度単層培養法」はたしかに単一前駆細胞の分裂の様子やそれによって生じる細胞の同定を可能にするが、決定的な弱点（それがもちろん利点でもあるのだが）として、細胞をバラバラにして皿の上に付着させて培養するために、もともとその細胞が生体内でどんな形態を有していたかに

ついては把握できず、もともとの形態と二次元的な培養皿上での形態との関係についても不明である。一方、「微小外植培養法」、「再凝集培養法」、「器官培養法」はいずれも程度の差こそあれ、生体内の三次元的環境を保たせたまままでの培養ではあるが、いずれも、その三次元性が可視化のさまたげとなり、結果の判定は培養組織・細胞を固定してから断面像を得るような切片をつくったのちに免疫染色などによって判定するという手順が必要であった。従って、我々の目ざしたものは、二次元培養的な時間解像度・即時性をもって三次元培養に供した前駆細胞の挙動（形態変化・分裂・細胞産生）を把握することを可能にするような新型培養法であった。

このような我々固有の要望と呼応するように、近年、GFPやその派生蛍光タンパク質による細胞の可視化が盛んに行われるようになってきた。生体内の現象そのものへの応用は、ハエや線虫、ゼブラフィッシュなどでは可能であるが、哺乳類ではいままでのところ、株化細胞を使った遺伝子導入が主で、三次元的な脳構築メカニズム探究のためには、まさに上記のような視点の「断面像」を得られるようなスライス培養法が必要となってくる。我々は、この新世代型スライス培養法を、まず古典的な油溶性色素の DiI を蛍光マーカーとして用いて確立した。そして、世界で初めて、大脳原基の前駆細胞の完全な形態を分裂前・中・後にわたって捉えることに成功した。

最も驚くべき新事実、前駆細胞（注：俗に「神経幹細胞」と呼ばれる）が、300 ミクロンにも及ぶ長い突起を有したまま分裂するということがあった。前駆細胞の細胞体は脳室面（脳原基の最内側）で分裂し、その細胞体から外側に伸びる突起は脳表面（脳膜面）にまで達している。これまで30年間は、電子顕微鏡など、固定した標本における所見から、前駆細胞は分裂中は突起を失って丸まっていると信じられてきた。前駆細胞が丸まる、というコンセプトに依存した現存のモデルは、従って、少なからず改編されるべきであると確信される。すなわち、細胞極性、不等細胞分裂、ニューロン移動・配列などは、分裂時に突起が残るという事実に基づいて、再考される必要がある。

開発はまず DiI を用いて行ったが、このスライス培養法はもちろん GFP や派生蛍光タンパク質の導入にも用いることができ、実際に我々はそれを現在積極的に進めている。細胞レベル・分子レベルで三次元的な脳構築原理の解明を目ざす上でもっとも重要な技術の1つを確立したと考える。応用の幅は限り無く、様々なかたちでの共同研究が可能であろう。我々自身としては、これまでの固有の研究内容の延長にある諸問題について、今回独自に得た新知見にのっとり、さらなる真理探究を目ざす。（大阪大学の川口氏；慶應大学の岡野氏との共同研究）

2. 皮質形態形成における Reelin 分子の役割の解析 (竹内, 宮下, 池田, 柳下)

(1) 皮質ニューロンの配置に関わる Reelin の役割

大脳皮質の投射ニューロンは, 脳室壁に誕生し, その後脳室面に垂直な方向に移動し, 最後に脳表面に並行して規則的に層状に配列する。この細胞層は表面側から脳室側へと inside-out に並び, すなわち, より遅生まれニューロンが早生まれのものより皮質のより表面側に配置される。皮質ニューロンの移動と配置の過程について, 我々は神経系のミュータント動物リーラーマウスを利用することにより, この機構の理解につながる新しい情報を得てきた。リーラーの新皮質では, 各種の皮質ニューロンが正常動物の場合と同じ時間帯に誕生するが, 最終的な細胞配列が異常になり, 細胞層は正常動物に比べほぼ逆転したものとなる。我々はこのミュータントの原因遺伝子 *Reln* の産物, Reelin タンパクを特異的に認識するモノクローナル抗体 CR50 を作製し, Reelin が分泌性のタンパク質で, 新皮質に最初に現われるニューロン Cajal-Retzius 細胞から特異的に分泌されることを明らかにした。一方, 野性型ならびにリーラーマウスの大脳皮質から細胞を解離してバラバラにし, ついで再集合を起こさせると, それぞれの細胞が元の皮質に特徴的な形態をもつ凝集塊を形成する。この解離-再集合細胞培養において, 野性型マウスから取り出した皮質細胞に CR50 を加えると, その細胞集塊がリーラー型になることを示した。組織片ならびにスライス培養の実験結果からも, Reelin が皮質ニューロンの移動と細胞配置に関わっていることを明らかにしてきた。

一方, 突然変異マウスヨタリなどの解析から *Dab1* 遺伝子の変異によってもリーラーとほぼ同じ表現型を示すことが明らかにされた。*Dab1* は, 非受容体型のチロシンリン酸化酵素に結合する分子として分離された。Reelin は Cajal-Retzius 細胞で作られ, 分泌性のタンパク質であるのに対して, *Dab1* は Cajal-Retzius 細胞に隣接する cortical plate ニューロンに発現し, 細胞内でシグナル伝達に係るタンパク質である。同じ表現型を示すことから, *Dab1* は Reelin のシグナルを受容する側の細胞の移動に, Reelin シグナル伝達の下流の要として直接に関係していると予想された。また, リーラーでは *Dab1* が増えていること, 培養皮質細胞において Reelin の作用により *Dab1* のリン酸化が促進することが示された。これらのことから, 細胞外分子の Reelin を感知し, 細胞内の *Dab1* のリン酸化に連結するような機能をもつ Reelin 受容体の存在が予想された。

八木らは先にチロシンリン酸化酵素 *Fyn* と結合する分子の解析から新規カドヘリン型受容体 (cadherin-related neuronal receptors, CNRs) を単離した。CNRs が Reelin の受容体に該当する可能性が考えられたので, 共同実験によってこの点を検討した結果, CNRs が cortical plate ニューロンに発現し, Cajal-Retzius 細胞に発現しないこと, CNRs が Reelin と結合すること, またその結合サイトを明らかにした。さらに, CNRs と Reelin の結合が, CR-50 ないし CNR の細胞外領域に対する抗体によって阻害され, さらに後者の抗体によって, 皮質ニューロンの Reelin による *Dab1* のリン酸化が阻害されることを示した。これらのことから, CNRs が Reelin 受容体として皮質構築過程に機能的に関わっていることを明らかにした。CNRs に加えて, 膜

タンパク質である apoER2 および VLDLR も Reelin 受容体であることが明らかにされている。これらのタンパク質に対する抗体を用いて, Reelin とこれらタンパク質が cortical plate ニューロンの神経突起部分に共存することを観察した。このような複数の Reelin 受容体がどのように協調して機能しているのか, 各受容体の遺伝子欠損マウスなどを使って解析していく。(阪大細胞工学センター八木氏, 矢崎氏との共同研究)

(2) 小脳の形態形成に関わる Reelin の役割 (柴, 牧田, 望月)

大脳の場合と異なって, リーラーの小脳は顆粒細胞の数が正常動物のそれに比べて著しく少なく, また葉構造を形成しない。このような表現型の特徴から, リーラーは小脳における葉形成の機構を調べる上で有効なモデル動物である。タンネル染色および BrdU 取り込みなどの実験から, リーラーでは外側胚芽層 (external germinal layer, EGL) における顆粒細胞の産生率が著しく低いことが示された。また培養実験から, Reelin は EGL 細胞からの顆粒細胞産生に直接に作用しないことと示された。ヨタリ (*dab1* 変異マウス) の小脳もリーラーとほぼ同じ表現型を示すことから, Reelin/*Dab1* シグナル経路における下流に, EGL からの顆粒細胞産生を促す因子が関わっているのではないかと予想された。そこでリーラーならびにヨタリミュータントマウス的小脳から RNA を抽出し, Differential Display 法によって正常動物とは発現量の異なる mRNA の検索を行った。その結果約 100 クローンの遺伝子断片を得た。これらの遺伝子配列を解析したところ約 40% が既知の遺伝子であり, 細胞骨格系・細胞内情報伝達系・遺伝子発現制御に関するものであった。残り 60% が未知の遺伝子であった。これらの断片をもとに cRNA プローブを合成し, in situ hybridization による脳組織での発現解析を行ったところ, ミュータントマウスで発現量が少ない 1 つのクローン *Rei-5* を同定した。このクローンの機能解析を現在行っている。

小脳のプルキンエ細胞は, 分子層と顆粒細胞層の境界部に規則的に一列となって配置される。プルキンエ細胞は第 4 脳室に面した神経上皮から発生し, その後表面部へと移動して一列の細胞層にと配置される。リーラーマウス的小脳では, 正常動物と同じ部位で誕生するプルキンエ細胞の大部分が, 皮質外に異所性に配置する。まず, プルキンエ細胞が誕生してまもない時期の野生型ならびにリーラーマウスから小脳を取り出し, in vitro 下にも, genotype に依存したプルキンエ細胞の空間配置がみられる器官培養法を開発した。ついでこの培養法を用いて, 野生型から取り出した小脳の培養液に CR-50 を添加すると, プルキンエ細胞の配置がリーラータイプになること, リーラーから取り出した小脳に, 野生型的小脳から分離した Reelin を分泌する顆粒細胞を接触させて共培養したところ, リーラーのプルキンエ細胞配置が野生型タイプになることが示された。更に Reelin を分泌する細胞株を用いても, 同様の現象がみられることを確認した。これらのことから, 小脳のプルキンエ細胞の空間配置に Reelin が関係していることは明らかである。しかし, Reelin が時空間的にどのようにしてプルキンエ細胞の空間配置を制御しているかについては分かっていない。発達期的小脳においては Reelin は前移動層 (premigratory zone) の顆粒細胞に強く発現する。この細胞で分泌される

Reelin が、プルキンエ細胞の移動を促し、小脳表層下に一列に配置させるためのシグナル分子として機能している可能性が予想される。この仮説を *in vivo* に検討すべく、リーラマウスをバックグラウンドに、Reelin を顆粒前駆細胞に特異的に発現するトランスジェニックマウスの作製を始めている。この際、顆粒前駆細胞特異的エンハンサーである Math1 遺伝子の制御領域および Reelin タンパク質をコードする mRNA を組み込んだトランスジーンを作製し、リーラマウス受精卵に組み込んでトランスジェニックマウスを作製する。これにより、Reelin 活性欠損個体でありながら胎生期顆粒前駆細胞には Reelin が発現することになり、プルキンエ細胞の空間配置がリーラマウスの表現型に比べ正常型へとシフトすることが期待される。

3. 神経系形成における BMP 受容体シグナリングの機能解析 (山田, 河野)

神経系組織の発生はその端を中胚葉誘導にまで遡ることのできるダイナミックなプロセスで、どのように複雑かつ機能分化した神経ネットワークが形成されていくのかというテーマは興味深いものである。初期発生の過程で神経系細胞がどのように運命づけられ、様々な機能を有する細胞へと分化するのか、その分子機構の解明は極めて重要な課題であるが、まだほとんど明らかにされていないのが現状である。液性因子の 1 つである BMP2/4 分子は、胚発生期の中胚葉誘導に重要な働きをしているが、この段階では BMP は神経発生に対して抑制的に働くといわれている。一方、発生が進んでからは、逆に BMP2/4 が神経幹細胞から神経細胞への運命決定を促進していることが示されている。そこで米国 NIEHS の三品博士のグループと我々は、BMP の神経系組織への作用を、中胚葉誘導から神経細胞の運命決定に至るまでの時期の異なるそれぞれの点において解析することが重要であると考えた。三品博士のグループは初期胚での BMP の機能解析において成果を上げている。我々は、BMP による神経発生のダイナミックな制御過程を『初期胚での神経誘導から神経ネットワークの形成まで』の時間軸、空間軸に沿って総合的かつ効果的に解明する。(米国 NIEHS 三品氏との共同研究)

4. アセチルコリン作動性神経系が司る脳機能への遺伝学的アプローチ (山田, 牧田, 河野)

ムスカリン性受容体遺伝子は、分子生物学的解析が、早くから行われていた分子である。ムスカリン性受容体遺伝子には、5 種類の異なったサブタイプ (M1-M5) が存在し、いずれのサブタイプも脳に発現していることが知られている。さらに膨大な薬理学的解析から生理学的機能も全て解析しつくされたという印象を研究者に与えていた。しかしながら、特定のサブタイプに選択性を示すアンタゴニストがいくつか知られているが、特異性は絶対的ではなく高濃度では選択性が無くなってしまいう問題点があり、サブタイプ特異的な機能は依然不明であった。そこで、米国 NIH-NIDDK の Dr. Jurgen Wess と共同でムスカリン性受容体遺伝子の各々のサブタイプに対する遺伝子欠損マウスを作製し、サブタイプ特異的な生理機能を解析した。

M1 受容体ノックアウトマウスの解析から、M1 ムスカリン性受容体が海馬 CA3 領域において、脳高次機能である

「情報の結合」に重要であると考えられるガンマ帯域の脳波 (30-80 Hz の周波数帯域) の形成に重要であるという新しい知見を見いだした。(投稿中) 海馬は、対角帯野からのアセチルコリン作動性神経系の入力を受けており、海馬由来の記憶の形成にムスカリン性受容体を介したアセチルコリンによる入力が重要であると考えられていた。しかし、M1-M5 全てのサブタイプが海馬に発現していることから、アセチルコリン依存性ガンマ形成にどのサブタイプが中心的役割を担っているか不明であった。我々は、M1 受容体ノックアウトマウスに見られたアセチルコリン依存性ガンマの形成不全は、他の M2-M5 ムスカリン性受容体遺伝子欠損マウスでは見られないことを示した。更に、この海馬 CA3 領域におけるアセチルコリン依存性ガンマ形成が、 I_m current ではなく I_h current によって形成されることをパッチクランプ法によって明らかにした。もともと I_h current は、神経系や心筋でペースメーカー current として知られており、神経細胞集合体としての情報処理機構に重要な役割を演じていると考えられていた。我々の研究は、これらここに記憶形成に重要であると考えられていた鍵となる事象を M1 受容体ノックアウトマウスを解析することによって結びつける発見となった。この研究から、アルツハイマー病等の高次機能疾患に用いられている M1 選択性の治療薬は、ガンマ帯域の脳波形成を促進している可能性が考えられる。

次に、M3 受容体ノックアウトマウスの解析から、アセチルコリンが脳で M3 ムスカリン性受容体を介して食欲を調節していることが明らかにされた。(Nature in press) マウス脳視床下部の食欲を制御する領域では、複雑な神経回路を構成し、生命の維持に重要な機能を果たしている。我々は M3 ムスカリン性受容体を欠損させたマウスを作製したところ、このマウスが食事量の減少によって体の脂肪が少ないマウスであることを発見した。この食事量の減少は、末梢脂肪組織から脳に送られる「もっと食べたい」というレプチンによる情報が、視床下部において遮断されていたためであることを確認した。このことにより、アセチルコリンが、脳で M3 ムスカリン性受容体を介して食欲を調節していることが明らかとされた。

脂肪細胞から分泌されるペプチドホルモンであるレプチンは、血流に乗り脳視床下部に到達し、視床下部弓状核 (arcuate nucleus: ARC) に存在するレプチン受容体に結合する。その結果、メラノコルチン (α MSH) の合成と分泌を促進する。このメラノコルチンは、AGRP (agouti-related peptide) と標的受容体において拮抗し、MCH (melanin-concentrating hormone) の合成や放出を抑えて摂食を抑制する。ところが、M3 ムスカリン性受容体遺伝子欠損マウスではレプチンが減少しており AGRP が増加しているにもかかわらず、MCH の発現が減少していた。そこで、AGRP や MCH を脳室内に投与し、節食行動を解析した結果、M3 ムスカリン性受容体遺伝子欠損マウスでは、AGRP に全く反応を示さず、餌に近寄る行動も示さなかった。しかし、レプチン神経回路網の下流に位置する MCH には、対象と同じように反応し餌を摂取した。この実験の結果から、MCH ニューロンの機能不全が示された。更に、MCH ニューロンに M3 ムスカリン性受容体タンパク質が発現していることを突き止めたことから、MCH ニューロンが M3 ムスカ

リン性受容体を介し，直接アセチルコリン作動性神経系に調節を受けていることが明らかになった。この発見は，脳アセチルコリンが記憶や情動といった脳高次機能以外に脂肪の蓄積と食欲をコントロールしていることを示すとともに，拒食症の発症機序の解明に新たな知見を与えた。また，M3 ムスカリン性受容体特異的な拮抗薬の開発は，過食症の治療薬となる可能性も期待される。

誌 上 発 表 Publications

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Darmanto W., Inoue M., Takagishi Y., Ogawa M., Mikoshiba K., and Murata Y.: “Derangement of Purkinje cells in the rat cerebellum following prenatal exposure to X-irradiation: Decreased reelin level is a possible cause”, J. Neuropathol. Exp. Neurol. **59**, 251–262 (2000). *

Kawaguchi A., Miyata T., Sawamoto K., Takashita N., Murayama A., Akamatsu W., Ogawa M., Okabe M., Tano Y., Goldman S. A., and Okano H.: “Nestin-EGFP transgenic mice: Visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells”, Mol. Cell. Neurosci. **17**, 259–273 (2001). *

Yamada M., Miyakawa T., Duttaroy A., Yamanaka A., Moriguchi T., Makita R., Ogawa M., Chou C. J., Xia B., Crawley J. N., Felder C. C., Deng C.-X., and Wess J.: “Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean”, Nature **410**, 207–212 (2001). *

Ohshima T., Ogawa M., Veeranna., Hirasawa M., Longenecker G., Ishiguro K., Pant H. C., Brady R. O., Kulkarni A. B., and Mikoshiba K.: “Synergistic contributions of cyclin-dependant kinase 5/p35 and Reelin/Dab1 to the positioning of cortical neurons in the developing mouse brain”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 2764–2769 (2001). *

山田真久，牧田亨介，宮田卓樹: “皮質形成のメカニズム：脳構築を担う液性因子リーリンタンパク質”，実験医学 **18**, 1276–1282 (2000). *

(その他)

Mikoshiba K., Aruga J., Nagai T., Nakata K., Nakajima K., Miyata T., and Ogawa M.: “Molecular mechanism involved in neural induction and neuronal fate determination”, Proc. Int. Workshop on Neuronal Precursor Cell Biology and Application for Treatment of Inborn Error of Metabolism, pp. 168–183 (1999).

宮田卓樹，小川正晴: “小脳の発生に関する分子機構：プルキンエ細胞と顆粒神経細胞の大河ドラマ”，神経研究の進歩 **44**, 965–973 (2000).

仲嶋一範，御子柴克彦，小川正晴: “大脳・小脳皮質における細胞配列の分子機構”，蛋白質 核酸 酵素 増刊号 **45**, 241–247 (2000).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国内会議)

星野潤，仲嶋一範，田畑秀典，小川正晴，御子柴克彦: “発生後期中枢神経系に発現するリーリン遺伝子のスプライシング・アイソフォーム MR-1 の解析”，第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会合同大会，横浜，9 月 (2000).

Research Subjects and Members of Laboratory for Cell Culture Development

1. Development of a Novel Three-Dimensional Culture Technique
2. Analyses of the Role for Reelin in Corticohistogenesis
3. Functional Analyses of Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)
4. Neuronal Circuits Underlying Specific Behavior of Muscarinic Acetylcholine Receptor Knockout Mice

Laboratory Head

Dr. Masaharu OGAWA

Scientists

Dr. Masahisa YAMADA

Dr. Ryosuke MAKITA

Dr. Reiko SHIBA

Dr. Takaki MIYATA

Dr. Kyoko TAN-TAKEUCHI

Technical Staffs

Ms. Fujiko MOCHIZUKI

Ms. Masako KAWANO

Mr. Hiroshi KURAMOCHI

Junior Research Associates

Mr. Hideaki MIYASHITA

Trainees

Mr. Takuya NISHIMURA

Ms. Emi IKEDA

Mr. Jun YAGISHITA

Visiting Scientists

Dr. Koki KAWAMURA (Keio Univ.)

Collaborations

Dr. Yuji MISHINA (NIEHS, USA)