

発生期脳における未分化細胞の移動経路と動態

新潟大学脳研究所脳疾患解析センター

柿田 明 美

Migration Pathways and Behavior of Progenitors in the Developing Forebrain

Akiyoshi KAKITA

*Brain Disease Research Center,
Brain Research Institute, Niigata University*

Abstract

The great majority of glial cells are generated in the perinatal period from progenitors in the subventricular zone (SVZ). We investigated the migration of progenitors from the neonatal (postnatal day 0, P0) rat forebrain SVZ by labeling them in vivo with a retrovirus encoding green fluorescent protein gene, and monitoring their movements by time-lapse video microscopy in P3 slice preparations. Cells migrated radially and tangentially after emigration into white matter, cortex, and striatum. During migration, elongation of the leading process and nuclear translocation were independent or linked. Orthogonal turning involved either cessation of the cell body movement and formation of a new leading process, or continuous cell body movement and bending of the leading process. Some cells migrated tangentially through the corpus callosum along the unmyelinated axon fascicles, rather than the radial fibers. The dynamic behavior of progenitors may reflect local tissue architecture and contribute to the widespread distribution of glia.

Key words: subventricular zone, immature cells, radial fiber, axon, retrovirus

Reprint requests to: Akiyoshi KAKITA
Brain Disease Research Center
Brain Research Institute Niigata University
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先： 〒951-8585 新潟市旭町通り1-757
新潟大学脳研究所脳疾患解析センター

柿田 明 美

はじめに

中枢神経系における神経芽細胞あるいはグリア芽細胞の移動メカニズムの解明は Migration Disorders に分類される様々なヒトの発生異常脳の病態を理解する上でも重要な課題である。発生期前脳の未分化細胞は、盛んな分裂能を有する脳室近傍の2つの germinal zone: ventricular zone と subventricular zone (SVZ) から産出し、前者は神経芽細胞を、後者はグリア芽細胞を産出する¹⁾。産出した神経芽細胞は、ラジアルファイバーに沿って cortical plate まで移動し、inside-out の原則に従い整然とした皮質層構造を形成していく²⁾。一方、グリア芽細胞は神経芽細胞より遅れて (ラットでは周産期以降に) 産出し、灰白質・白質に広範に分布していく。この時期には、既に殆どの神経芽細胞はその位置を定め、軸索・樹状突起を伸ばし始めている。また、このグリア芽細胞産出期は、血管の急速な伸長時期とも一致する。このため、グリア芽細胞はこうした長く・密な環境を移動することになる。

近年、未分化細胞の移動経路あるいは細胞系譜を追跡する目的から、*lac Z* などの標識遺伝子を導入したレトロウイルスが用いられるようになったが、こうした導入遺伝子の産生蛋白を同定するためには組織を固定し特定の染色を施す必要があり、実際の細胞移動を直接観察することは不可能であった。そこで我々は、外因性物質を何も加えることなく細胞を標識し、生きた細胞の動きを追跡する目的から、レトロウイルスと time-lapse video microscopy を用いて、未分化細胞の移動動態を観察している。即ち我々の行っているストラテジーは、緑色蛍光蛋白 (GFP) 〈あるいは黄色蛍光蛋白 (YFP) やシアン色蛍光蛋白 (CFP)〉の cDNA を組込んだレトロウイルスを作製し、それらを *in vivo* で未分化細胞に選択的に感染させる。その後、生鮮脳スライスを作製しスライスごと培養する。高解像度カメラを装着した蛍光顕微鏡を用い、蛍光シグナルを発する生きた細胞の動きをリアルタイムで長時間に亘りデジタル画像として取り込む、というものである。本稿では、グリア

芽細胞の移動に関する我々の知見³⁾⁻⁵⁾を中心に、これらが移動経路上で遭遇する構造物との関連についても述べてみたい。

移動経路とダイナミクス

出生当日 (P0) のラット前脳 SVZ の未分化細胞をレトロウイルスで標識し、P3 の生鮮脳冠状断切片における蛍光発色細胞を観察したところ、その殆どは卵円形の胞体と1本の先端突起を有する未分化な形態を示しつつ (図1A) スライス内で移動した。標識細胞の多くは SVZ 内に認められたが、一部は既に皮質・白質・線条体に移動しており、そこでは厳然とした移動経路が存在していた (図1B, C, D)。その際、移動は常に先端突起の遠位端方向に起こり、刻々とその速度を変えながら起こった。これらの部位における未分化細胞の多くは、ラジアルファイバーの伸長方向に一致した放射状の移動を示したが、一部は途中で直角方向に経路を変えて tangential に移動した。少数は移動経路を逆行するものも観察された (図1B, C)。その結果、線条体では格子状の移動経路の存在が明らかとなった (図1D)。現在のところ、この tangential な移動をガイドする因子についてはよく解っていない。しかしながら、方向転換は決まって直角に行われるなど極めて一定のパターンを示すことから、濃度勾配を示す分子あるいは拡散性の分子 (chemoattractive or chemorepulsive factors) に支配されるのではなく、何らかの構造物に依存した動きである可能性が考えられる。この際、移動細胞の先端突起は、伸長と収縮あるいは分岐を反復する運動を示した (後述)。同様の tangential な移動様式は神経芽細胞でも報告されている。例えば、新皮質における GABAergic な interneuron は ganglionic eminence で産出し、これを横切った後 tangential に皮質内で広がる⁶⁾、という。

さて、実質的な細胞移動には突起の伸長と核の移動が必須であるが、未分化細胞の動きを観察していると、この動きには2つの異なった様式があることが解った。即ち、核の位置を変えずに突起

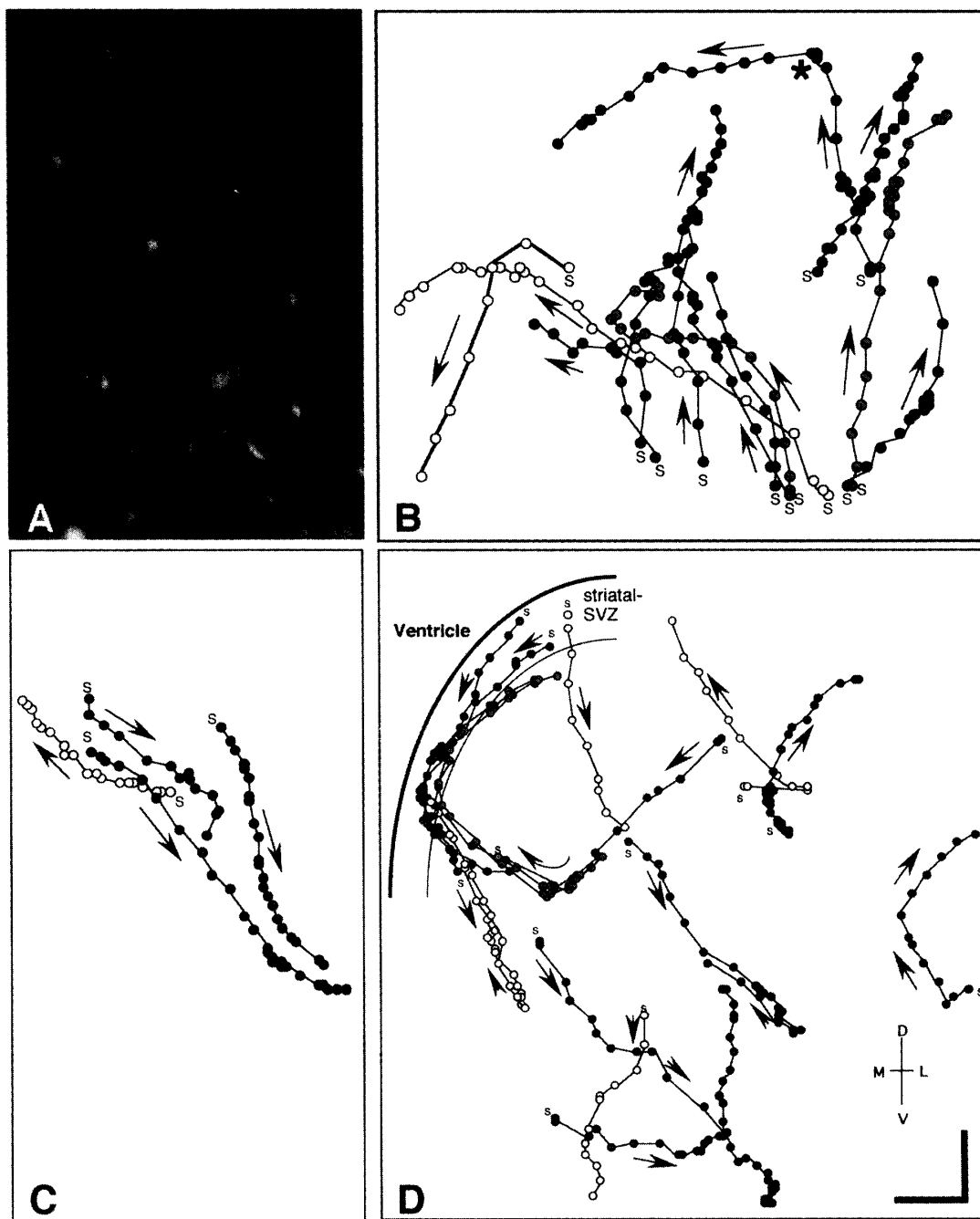


図1 ラット新生児脳における移動中の生きた未分化細胞 (A) とその移動経路 (B-D).

未分化細胞は卵円形の胞体と一本の先導突起を有し、常に突起の伸長方向に移動する。B-D における線は各々1個の未分化細胞の移動軌跡を示し、それぞれの○はその細胞の9分毎の胞体の位置を示す。B: 皮質, C: 外側白質, D: 線状体。Scale bar=50 μ m. D, dorsal; V, ventral; M, medial; L, lateral.

を伸長した後に急速な核移動が起る場合と、突起を伸長しつつそれと同期して核移動が起る場合が観察された。このことから、突起を伸長させる細胞内プロセスと核を移動させるプロセスとは、時にリンクして、時に独立して起こるものであることが考えられた。個々の細胞を長時間観察していると、両様式の間中型、即ち突起を伸長しつつ核が僅かに移動する動きも観察された。また、多くの細胞は片方の様式を示した後もう一方の様式で移動することも解った。このことから、両様式は細胞の種類あるいは場所により規定される様式ではなく、細胞進展の異なったフェーズと考えられた。方向変換を達成する際には、2通りのパターンがあることが解った。その1つのパターンは、胞体の移動を一時停止させ、これまでの先導突起が虚脱すると同時に何本もの新たな突起が形成され、その1本が次第に太くなり新たな先導突起となって、胞体移動を再開する、というパターンであった。この突起運動はあたかも新たなガイドワイヤーを模索しているかのような動きに見える。また、このパターンの際には突起伸長と核移動のプロセスは完全にそのリンクを一時絶っているものと考えられる。他方、胞体移動を継続しつつ先導突起を屈曲させながら方向転換するパターンも観察された。この動きは、これまで従ってきたガイドワイヤーが屈曲するのに従って方向転換しているように見える。後者の方向転換パターンは、ラジアルファイバーの屈曲がしばしば観察される線条体で主に見られた。更に、同じ経路を通過して逆行する細胞も観察され、移動をガイドする構造物は時に双方向性の移動を起こさせ得ることも解った。その際には胞体移動を停止し、これまでの先導突起の虚脱とその対極における新たな突起形成を伴うものであることが解った(図2)。このように、実際の細胞移動は、これまでに観察されてこなかったさまざまなダイナミクスを示しつつ起こるものであることが明らかとなった。移動する神経芽細胞の先導突起では、常に positive end を遠位側に向けた微小管の極性が保たれることが知られている。実質的な細胞移動を担う様々な細胞内分子の挙動は、おそらく細胞が移動中に遭遇する

細胞外環境に強く影響を受けるものと思われる。その結果、例えば微小管の極性の解離と再構築などの細胞内構造の変化が次々と起こっているものと予想される。

未分化細胞の分化と分布

P0でSVZ内にレトロウィルスを注入し、P28に達した個体を灌流固定し、その大脳における標識細胞の分化像と分布を観察したところ、成熟したグリア細胞が皮質・白質・線状体に広範に認められた。観察した計474個の標識細胞のうち、皮質には116個が分布しており、その内64.6%はアストロサイトに、28.5%はオリゴデンドロサイトの像を示していた。残り6.9%は未分化な形態のまま成熟脳に存在する、いわゆる adult progenitor であった。白質に分布していた207個は、アストロサイトが16.9%、オリゴデンドロサイトが74.9%、未分化細胞は8.2%であった。線条体内の151個は、順に43.8%、48.3%、7.9%であった。なお、神経細胞は全く認められなかった。このように、新生児期のSVZは、in vivo ではグリア細胞の progenitor を産出する部位と考えられる。しかしながら、同部位から細胞を採取した primary culture では、培地に添加する血清濃度を変えるなどの条件で神経細胞にも分化し得る⁷⁾ことが知られており、本来はグリア細胞・神経細胞の両者へと分化し得る bipotential な性格を有するのかも知れない。なお、SVZの最先端部(anterior SVZ)から産出する未分化細胞は、我々が注入を行っている caudal SVZ のそれとは分化・移動経路が全く異なり、rostral migratory stream に乗って矢状方向に集団をなして移動し、嗅球の interneuron に分化することが知られている⁸⁾。成熟脳における未分化細胞、“adult progenitor”の存在も極めて興味深い現象であり、今後さまざまな病態における挙動や病巣修復機序における役割も明らかにされてくるものと思われる。

さて、分化を開始したオリゴデンドログリアの動きを共焦点レーザー顕微鏡を用いて time-lapse で見てみると、その胞体は既に全くその位置を変

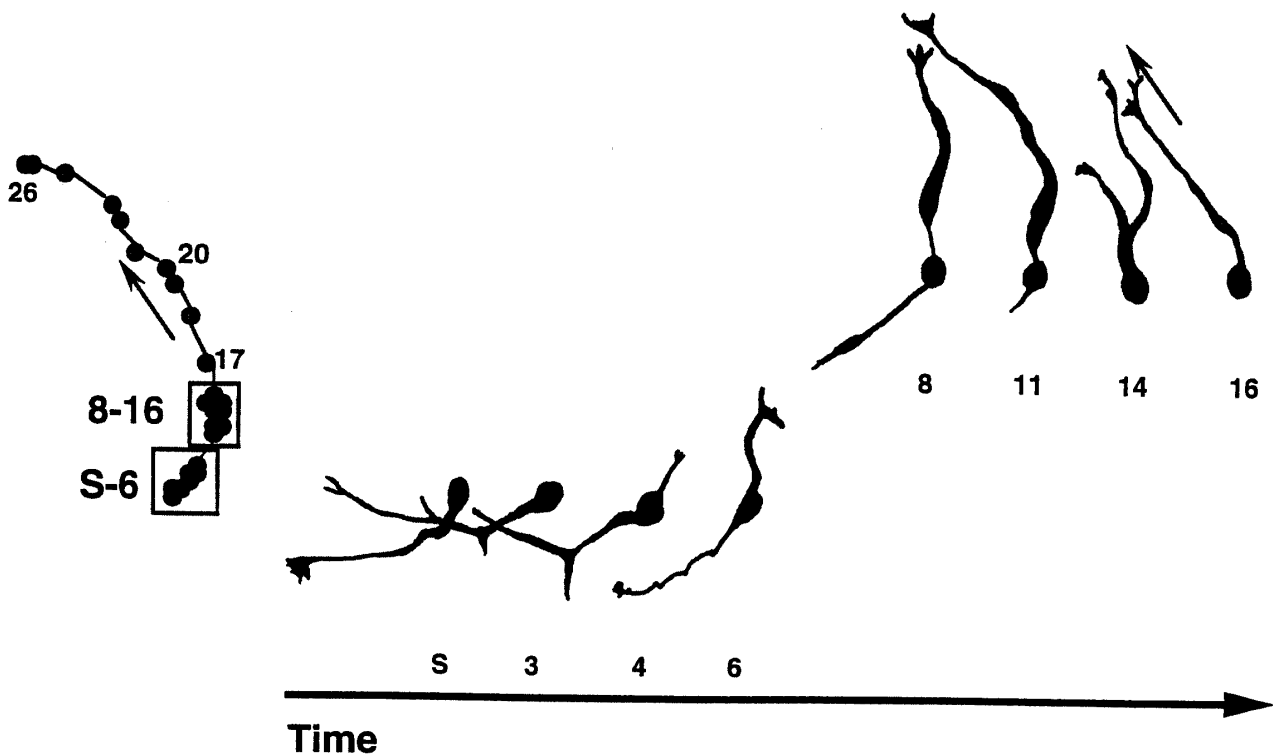


図2 未分化細胞が示す突起伸長と胞体移動のダイナミクス

左端にこの細胞の移動軌跡を示す。●は9分毎の胞体の位置を示し、これらには経時的に番号を付けてある。Sは観察開始時点での位置。この細胞は、S-6 (45分間) および8-16 (72分間) の位置で胞体の移動は殆ど見られず、しかし突起の伸長と収縮が見られた (図右)。この際、先導突起が次第に虚脱し (S, 3), 胞体を介して180°反対側に新たな突起が伸び始め (4, 6), それが太くなり (8, 11, 14), 新たな先導突起となってその伸長方向に移動を開始した (16)。矢印：移動方向。

えず、しかし突起末端部は盛んに伸長と収縮を繰り返している像が観察された⁴⁾。これら髄鞘へと分化しつつある突起は、周囲の軸索を模索しているかのような動きを示しつつその内の1つを選択するのも知れない。この時期に至ると、もはや核移動と突起伸長のプロセスは完全にそのリンクを絶っているものと考えられる。

未分化細胞の移動ガイド： ラジアルファイバーと軸索

ラジアルファイバーの伸長方向とは直交する細胞移動は、何がガイドするのか？我々は、その1つは未だ髄鞘に巻かれていない軸索であろうと考えている⁵⁾。この考えは、実はスライス内の移動細胞

を観察している際、多くの標識細胞から離れ、脳梁を通り対側大脳半球へ移動する細胞がいることに気付いたことがきっかけであった。脳梁に認められた生きた標識細胞は全て未分化な形態を示す移動性細胞であり、共通の移動パターンを示した。即ち、標識細胞は単一の先導突起を水平に (線維束に平行に) 伸しつつ対側に向かって移動し、その際核の移動は突起の伸長に連動して起る様式を示した。この時期、ラジアルファイバー (免疫組織化学的に vimentin, clone V9 あるいはグルタミン酸トランスポーター GLAST で標識される) は脳室壁から脳表に向かいおおよそ垂直に伸びており、脳梁の標識細胞の移動方向とは直交していた。一方、磷酸化ニューロフィラメントに対する抗体 (SMI-31) で免疫染色すると、脳梁に

は平行に走る神経突起が多数観察され、これらは電顕的には髄鞘に巻かれていない軸索であることが確認された。これら脳梁を通った軸索の投射部位を観察する目的から、片側の cingulum に DiI (lipophilic tracer) を付着させたところ、DiI 標識線維は、対側半球内側部 (cingulate 及び secondary motor area) に投射していた。成熟脳における標識細胞の分布を観察したところ、左半球 (レトロウィルスの注入側とは反対側) に観察された標識細胞の多くは半球内側の白質・皮質に分布し、これは DiI 標識線維の投射部位におよそ一致していた。対側半球に分布していたレトロウィルス標識細胞の数は右半球のその1%程度であり、これらは分化したアストロサイトおよびオリゴデンドロサイトであり、単独あるいは2~3個の cluster を形成していた。

このように脳梁を介した移動細胞の存在は、両半球間でクローンの混合が起る可能性を示唆している。また、その際に見られる tangential な移動には、ラジアルファイバーではなく未だ髄鞘に巻かれていない軸索が関与する可能性が示唆された。そもそもラジアルファイバーとは何か? 最近では、従来の「特殊なグリア細胞の突起」との見方では収まらない、多分化能を有する幹細胞のそれ、と解釈される研究結果も出されてきた^{9), 10)}。

おわりに

現在、未分化細胞の移動に関与するとされる様々な分子が同定され、幾つかのノックアウトマウスも報告されている。未分化細胞の移動と分化をめぐるバイオロジーは、更にホットな研究領域として広がっている。

こうした正常発生脳における細胞移動に関する研究と共に、我々は、神経芽細胞やグリア芽細胞の移動障害を惹起するモデルを作製し、その脳を病理組織学的に解析している¹¹⁾。その結果、例えば、胎児脳が神経芽細胞の産生初期に入った妊娠第13日のラットに経胎盤的にメチル水銀を投与すると、その児の脳にはヒトの発生異常脳でも観察される脳表の奇形 (leptomeningeal glioneu-

ronal heterotopia) が高率に惹起されることも明らかとなった¹²⁾。こうした正常発生あるいは病態における未分化細胞の移動動態についての知見は、滑脳症¹³⁾ や bilateral periventricular nodular heterotopia¹⁴⁾ などのいわゆる Migration disorders だけではなく、難治てんかん原性病巣としての皮質異形成症など、様々なヒトの病態理解にも繋がるものと期待している。

参考文献

- 1) Bayer SA and Altman J: Neocortical development. Raven Press, New York, 1991.
- 2) Rakic P: Mode of migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. J Comp Neurol 145: 61-84 1972.
- 3) Kakita A and Goldman JE: Patterns and dynamics of SVZ cell migration in the postnatal forebrain: monitoring living progenitors in slice preparations. Neuron 23: 461-472 1999.
- 4) Kakita A: Migration pathways and behavior of glial progenitors in the postnatal forebrain. Hum Cell 14: 59-75 2001.
- 5) Kakita A, Zerlin M, Takahashi H and Goldman JE: Some SVZ progenitors migrate through the corpus callosum and colonize in the contralateral cerebral hemisphere. J Comp Neurol submitted.
- 6) Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L and Rubenstein JLR: Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. Science 278: 474-476 1997.
- 7) Levison SW and Goldman JE: Multipotential and lineage restricted precursors coexist in the mammalian perinatal subventricular zone. J Neurosci Res 48: 83-94 1997.
- 8) Wichterle H, Garcia-Verdugo JM and Alvarez-Buylla A: Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. Neuron 18: 779-791 1997.
- 9) Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS and Kriegstein AR: Neurons derived from radial glial cells establish

- radial units in neocortex. *Nature* 409: 714-720 2001.
 - 10) Parnavelas JG and Nadarajah B: Radial glial cells: are they really glia? *Neuron* 31: 881-884 2001.
 - 11) Kakita A, Inenaga C, Sakamoto M and Takahashi H: Neuronal migration disturbance and consequent cytoarchitecture in the cerebral cortex following transplacental administration of methylmercury. *Acta Neuropathol* in press.
 - 12) Kakita A, Wakabayashi K, Su M, Piao Y-S and Takahashi H: Experimentally induced leptomeningeal glioneuronal heterotopia and underlying cortical dysplasia of the lateral limbic area in rats treated transplacentally with methylmercury. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 768-777 2001.
 - 13) Mizuguchi M, Takashima S, Kakita A, Yamada M and Ikeda K: Lissencephaly gene product. Localization in the central nervous system and loss of immunoreactivity in Miller-Dieker syndrome. *Am J Pathol* 147: 1142-1151 1995.
 - 14) Kakita A, Hayashi S, Moro F, Guerrini R, Ozawa T, Ono K, Kameyama S, Walsh CA and Takahashi H: Bilateral periventricular nodular heterotopia with an exon 11 (Val 528 Met) *filamin 1* gene mutation: widespread glomeruloid microvascular anomaly and dysplastic cytoarchitecture in the cerebral cortex. *Acta Neuropathol* in press.
-