

脳幹の形成過程で見られる正中領域を越える細胞の移動

小野勝彦、川野幸平*

京都府立医科大学 大学院 神経発生生物学

* (現所属) 自然科学研究機構基礎生物学研究所 神経行動学研究部門

要約

脳幹の発生過程では、正中線を越えて反対側に移動する神経細胞がみられる。どのような仕組みで正中交差移動が制御されているのか、動眼神経核の運動ニューロンをモデルとして調べた。早期に最終分裂を行う動眼神経核ニューロンは核の前部に多くみられ交差移動しないのに対して、遅くに最終分裂する細胞は神経核内の後部に位置しており交差移動することが分かった。さらに、最終分裂の時期により、反発性軸索ガイダンス分子 Slit の受容体 Robo2 の発現が異なり、早くに最終分裂を行うニューロンで発現がみられた。遅くに最終分裂を迎えるニューロンは Robo2 を発現しないので Slit に反応せず、このため正中領域を通過し反対側に移動できるものと考えられる。この結果から、正中交差移動は細胞の誕生日（最終分裂の時期）に依存した分子発現により調節されていることが示された。

はじめに：正中交差移動の発見

中枢神経系の形成過程では、神経細胞・グリア細胞ともに脳室に面した脳室層で分化した後、機能する場所に向かって移動する。神経細胞は一般的に、脳室層で最終分裂をしたのちに移動を開始するので(Fujita 1963)、最終分裂の際に放射性同位元素(トリチウム)で標識したチミジンを取り込ませることにより、その移動を追跡することが可能である(Rakic 1974)。最近では、扱いの煩雑なトリチウム標識チミジンよりも、そのアナログ物質である 5-ブロモ-2'-デオキシウリジン(BrdU)を取り込ませて免疫組織化学的に検出する方法が用いられ、さらに 5-エチル-2'-デオキシウリジン(EdU)を取り込ませて特殊な化学反応により短時間で検出できるようになっている(Nomura et al. 2016)。これらの物質を用いて胎児期の分裂細胞を標識し、生後の脳内での分布を調べることで、大脳皮質の層構造の in-side out pattern の形成様式(Rakic 1974)や、小脳の外顆粒層から内顆粒層への移動が明らかにされた

(Altman and Bayer 1978a)。大脳皮質や小脳皮質の層構造形成過程では、放射状グリアの突起に沿った神経細胞の移動がみられ、*radial migration* (放射状移動) と呼ばれてきた (Rakic 1971)。これに対して皮質の層形成以外の領域では、軟膜表面に平行に移動する細胞がみられこのような移動は *tangential migration* と呼ばれており、神経細胞の突起に沿った移動や相互にコンタクトを持って移動細胞の「流れ (*migratory stream*)」を形成するものがしばしば認められる。

Tangential migration の例として、GABA ニューロンが終脳の線条体原基で生まれて大脳皮質へ移動するものや (Tamamaki et al. 1997)、側脳室の脳室下帯から嗅球への移動がよく知られている (Hu et al. 1996; Ono et al. 1994)。一方、神経発生学の歴史を紐解くと *tangential migration* の最初の記載は 19 世紀の終わりにさかのぼり、His によるヒト胎児の脳幹の形成過程の報告でこのような細胞移動の記載がみられる (His 1890)。20 世紀に入ると Essick により、軟膜直下において正中線をまたいで連続して存在する細胞集団が一過性に見られることが報告され、正中線を越えて移動する細胞であることが示唆された (Essick 1912)。いずれも、細胞集団の連続性から脳幹背外側部の下菱脳唇に由来することが記載されている。その後、1950 年代になって、本当に正中線を越えて反対側の脳幹に移動しているのかを検証する実験が行われた。ニワトリ胚の下菱脳唇の片側を電氣的に破壊したのち胚発生を進行させ、どの核がどのように委縮するかが調べられた。その結果、破壊した下菱脳唇の反対側の橋核と縫線核で形成不全がみられたことから、実験形態学的に神経細胞の対側移動が示された (Harkmark 1954)。この論文の中で、「生体染色法を用いて調べることができれば移動を示すことができるだろう」(Harkmark 1954) とあることは示唆的であり、半世紀を経て実現することになる (後述)。

動眼神経核の形成過程においても、その後部で一過性に左右の神経核が融合し再び分かれて左右に独立した核をとなること、および細胞の微細形態から、正中線を越えて神経細胞が移動することが予想された (Puelles and Privat 1977; Puelles 1978)。動眼神経核の正中交差移動は交差性回路を形成し、交差した神経細胞は反対側の外眼筋を支配する (図 1)。

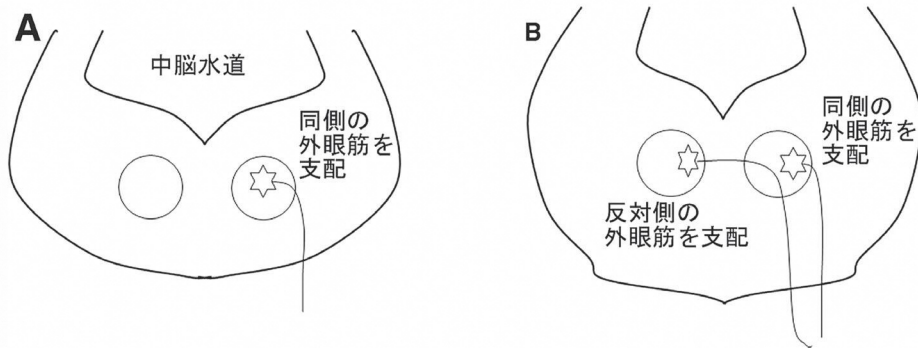


図 1 動眼神経核のニューロンの筋の支配

Aは前部、Bは後部を示す。前部のニューロンはすべて同側の外眼筋を支配し、後部では一部のニューロンが反対側の外眼筋を支配する。

下菱脳唇と小脳前核

下菱脳唇に由来する移動細胞は、当初から小脳前核の神経細胞に分化することが示唆されていた。これは、上記のトリチウムチミジンを用いた細胞の追跡で明らかにされた。当初は、下菱脳唇に由来する細胞は下オリーブ核の神経細胞にも分化すると考えられていたが、詳細な観察により、別の領域に由来するものと考えられるようになった (Altman and Bayer 1978b, 1987a, b)。下菱脳唇に由来する細胞の分化は、遺伝子改変マウスを用いた細胞系譜解析により明らかにされた。下菱脳唇に発現する遺伝子座 (*Wnt*, *Math1*, *GDF7* など) に Cre recombinase または FLP recombinase 遺伝子をノックインしたマウス (driver マウス) をレポーターマウスと交配させることで細胞を永続的に標識できるようになった (Rodriguez and Dymecki 2000)。これらの実験を通して、下菱脳唇に由来する細胞が、様々な小脳前核ニューロンやさらに三叉神経脊髄路核や上オリーブ核 (下オリーブ核とは全く別の神経核) のニューロンに分化するものも含まれることが明らかにされた (Landsberg et al. 2005)。さらに、下オリーブ核のニューロンは、下菱脳唇に隣接した *Brn3a* 陽性領域に由来することも明らかにされ、Altman and Bayer の非常に鋭い観察眼が再認識された。一方で、遺伝子改変マウスを用いた細胞系譜解析では、両側の下菱脳唇の細胞が同時に標識されることから、交差移動そのものを明確に示すことはできない。これは、片側の細胞集団のみを標識することによってのみ明らかにされる。

正中交差移動の可視化

1990年代の終わりごろから、発生段階の脳の特定の領域に電気パルスを用いて外来遺伝子を導入する方法が開発され、この方法を用いて細胞を標識しその系譜を追跡することが可能となった (Sakamoto et al. 1998; Saito and Nakatsuji 2001; Tabata and Nakajima 2001)。細胞標識には、オワンクラゲの緑色蛍光タンパク (GFP) やサンゴの赤色蛍光タンパク (RFP) などが用いられている。この方法を用いて、鳥類や哺乳類の胚や胎仔の片側の下菱脳唇を標識して細胞移動を追跡した報告がなされた。最初には下菱脳唇を標識したラット胎仔の脳幹を細切せずにそのまま脳室面を下にして (細胞の移動する軟膜面を上にして) 培養し (open book culture)、GFP で標識された細胞を追跡することにより、正中線を超えることが示された (Taniguchi et al. 2002)。次いで、卵殻内のニワトリ胚や (Ono et al. 2004) 子宮内のラット胎仔 (Kawauchi et al. 2006) およびマウス胎仔 (Okada et al. 2007) の下菱脳唇を標識し、標識された細胞が発生の進行に伴ってどこでどのような細胞に分化するかを調べる実験が行われた。その結果、いずれの実験においても、片側の下菱脳唇に由来する細胞が対側の脳幹に移動して入ることが明らかとなった。下菱脳唇から出た細胞は、移動方向に細長い突起 (先導突起) を伸ばす。そのまま脳幹の外周を軟膜表面に沿って移動し、一定の領域に到達するとそれまでの移動方向に直交する突起を内部に伸ばして、移動方向を転換して脳幹内部に向かって放射状移動を始める。ニワトリ胚では底板 (将来の縫線) に沿って移動するものが顕著であるが、マウスやラットは反対側の脳幹で外側網様核や外楔状束核などに向かうものが多い (Okada et al. 2007)。またマウスやラットでは、橋底部に向かうものも多いが、橋核では同側優位で両側に移動細胞が定着することが示された (Kawauchi et al. 2006)。また、反対側の脳幹に移動した細胞は、反対側 (細胞の生まれた側) の小脳に軸索投射しており、下菱脳唇由来細胞の正中交差移動も交連回路の形成に関わっていることが示された (Okada et al. 2007)。

一方、動眼神経ニューロンの移動は、全く別の方法で可視化された。多くの運動ニューロンは、脳の外にある標的細胞や筋に軸索を伸ばした後も移動を続けることから、標的領域にトレーサー物質を投与して細胞体を逆行性に標識し、これを継時的にサンプリングし観察することで移動が明らかにされている (Markham and Vaughn 1991)。動眼神経核運動ニューロンも同様で (Bjorke et al. 2016)、固定したマウス胎仔の眼窩に脂溶性蛍光色素 DiI (ホルマリン固定された軸索内を拡散する) を注入す

ると、動眼神経ニューロンが標識される。胎齢 12.5 日目 (E12.5) に注入すると、同側の動眼神経ニューロンが標識され、後部の内側部の細胞は内側方向 (つまり反対側方向) に突起を伸ばしているものがあり、ごく少数の標識細胞が正中線領域にも見られた。E13.5 の眼窩に DiI を注入すると多くの標識細胞が正中線領域にも分布するようになり、E15.5 で標識すると動眼神経核の後部では反対側にも標識細胞がみられた (Kawano et al. 2018)。一連の結果から、マウスの動眼神経核の形成過程では、その後部で E12 から E15 の間に後部の一部の細胞が正中交差移動をすることがわかった。

ニューロンの誕生時期特異的な交差移動とその仕組み

神経細胞の移動は、多くの場合、最終分裂を同じくする細胞は同じような移動パターンをとることが報告されている。大脳皮質のニューロンの *inside-out pattern* はその典型である (Rakic 1974)。ラットの下菱脳唇由来ニューロンでも、早く最終分裂を終えたニューロンは反対側に移動する傾向にあり、遅くに最終分裂を終えたものは同側の脳幹に留まる (Kawauchi et al. 2006)。ニワトリ胚では最終分裂の時期の特定は難しく最終分裂の時期と対側移動との関連は不明であるが、電気穿孔法で遅い時期に標識された下菱脳唇由来ニューロンは正中交差移動するものが多くみられ、早い時期に標識されたものは同側に留まっていた (Ono et al. 2004)。このように、下菱脳唇由来ニューロンの移動もランダムではなく、最終分裂や標識された時期に特異的な移動パターンを示す。

動眼神経核の運動ニューロンにおいても、誕生時期特異的な交差移動が明らかにされた。動眼神経核前部では E9.5 に最終分裂を終えるニューロンが多いのに対して、後部では E10.5 に最終分裂を行う傾向にあった。上述の通り、交差移動は後部でのみみられるので、遅くに最終分裂を迎えたものが交差移動することが BrdU の取り込みと運動ニューロンの運動マーカーを用いた二重染色から明らかにされた (図 2) (Kawano et al. 2018)。

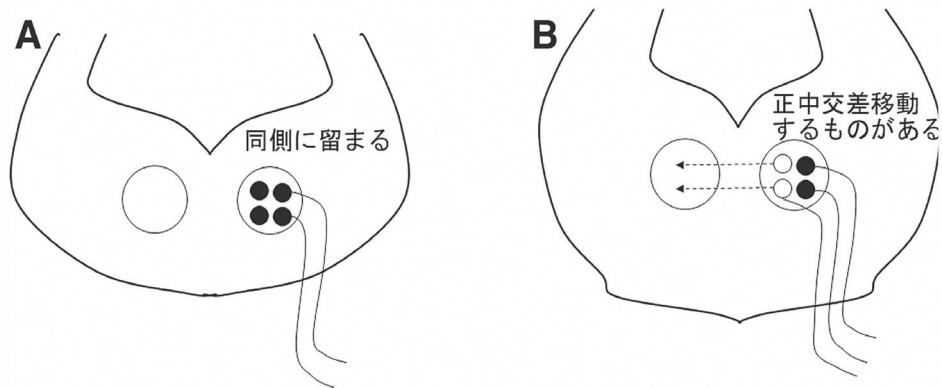


図2 動眼神経核ニューロンの最終分裂時期と正中交差移動

動眼神経核ニューロンの最終分裂の時期は、前部では胎齢 9.5 日 (●)、後部では胎齢 10.5 日 (○) である。運動ニューロンは軸索を標的に伸ばしたのちに正中交差移動する (破線)。

このような神経細胞の最終分裂依存的な正中線交差は、細胞移動のみならず神経回路形成でも報告されている。聴覚系の中継核である上オリーブ核ニューロンは、さらに上位の聴覚領域である下丘に軸索を投射する。その回路形成における神経細胞の最終分裂の時期と線維の投射パターンが調べられている。すなわち、妊娠ラットに BrdU を投与し胎仔の上オリーブ核ニューロンの最終分裂の際にこれを取り込ませ、成体となった段階で下丘に軸索トレーサーを取り込ませて軸索投射が調べられた。その結果、E12-13 の時期に最終分裂を終えたニューロンは反対側の下丘に軸索を送るのに対して、E14-16 の時期に最終分裂を迎えるニューロンはすべて同側の下丘に投射することが明らかとなった (Kudo et al. 1996)。

どのような仕組みで誕生日依存的な挙動がみられるのかを明らかにするため、我々はさらに動眼神経核ニューロンを用いて調べた。動眼神経核の正中交差移動は、軸索ガイダンス分子の Slit/Robo シグナルによって早熟な移動が抑制されていることが報告されている (Bjorke et al. 2016)。Slit は軸索伸長を抑制する軸索ガイダンス分子で、中脳では正中線領域から分泌される。Robo2 はその受容体であり、Robo2 を発現する細胞や突起は Slit を発現する領域には進入できない。そこで、動眼神経核ニューロンの最終分裂の時期 (E9.5 または E10.5) に BrdU を取り込ませ、正中交差移動を開始する時期 (E12.5) での Robo2 の発現を調べた。その結果、E9.5 で最終分裂を行う細胞は、動眼神経核の前部でも後部でも Robo2 を発現する傾向にあったが、E10.5 で

最終分裂を行う後部の細胞はこれを発現していなかった。また、E10.5 で最終分裂する細胞は、その後 E13.5 には正中領域に見られるようになることから、正中交差移動する細胞群であることも明らかにされた (Kawano et al. 2018)。このように、誕生日依存的な細胞移動は、誕生日依存的な Robo 発現によるものであることが示された (図 3)。

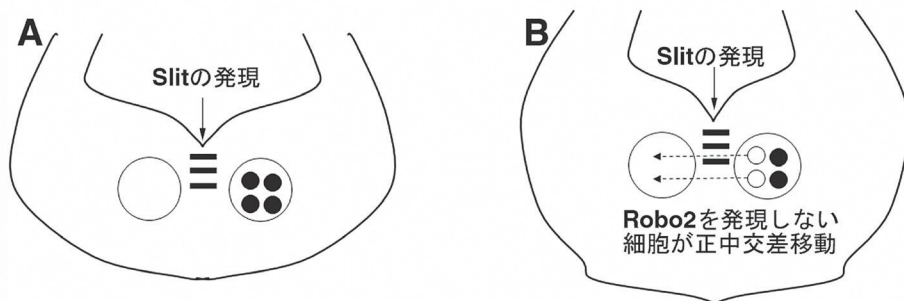


図 3 軸索ガイダンス分子 Slit と受容体 Robo の発現

Robo2 受容体は胎齢 9.5 日に最終分裂を行った細胞 (●) で発現し、胎齢 10.5 日に最終分裂を行った細胞 (○) では発現しない。Slit は正中領域に発現し、Robo2 を発現する細胞の正中交差移動を止め、Robo2 を発現しない細胞が、正中交差移動する。

おわりに：今後の課題

神経系の発生過程での回路形成や細胞移動の交差・非交差の現象は、19 世紀から知られていたが、その分子機構は 1990 年代に明らかにされた。一方、同一の細胞核を構成するニューロンの中に同側構造にのみ線維を送るもの (非交差)、反対側の構造に線維を送るもの (交差) がある場合、どのような仕組みによって細胞挙動が制御されているのかという課題は、動眼神経核のニューロンを用いた解析で、誕生日依存的な分子発現がみられその一端が明らかになった。すなわち、誕生日依存的な正中交差移動は、誕生日依存的な分子発現 (ここでは Robo の発現) に依存し、それにより細胞の挙動が調節されていることが示された。時期特異的な分子発現は現象としてはよく知られているが、その仕組みには不明な点が多く、今後の研究によって解明が期待される。

動眼神経核ニューロンの正中交差移動のメカニズムについては、もう一点大きな課題が残されている。小脳前核ニューロンの正中交差移動は、ネトリン、Robo3 といっ

た軸索ガイダンス分子が調節していることがノックアウトマウスを用いた解析から明らかとなっている (Yee et al. 1999; Marillat et al. 2004)。いずれも、正中線方向に細胞や突起を誘引する分子である。一方で、動眼神経核ニューロンの正中交差移動は、これらの分子の欠損マウスでは正常であることが報告されており、運動ニューロンを正中線方向に誘引する分子群は全く明らかではない。我々は、正中線で発現する誘因分子の候補である Shh (Okada et al. 2006) に注目したが、移動中の動眼神経ニューロンには Shh 受容体である Patched が発現していなかった。さらに、Shh に対する機能中和抗体をニワトリ胚脳室に注入したが、動眼神経核の形成に影響は見られなかった (川野他、未発表) ことも、この結果を支持している。どのような分子により運動ニューロンが正中線に向かって移動するのか、これも残された課題の一つである。

謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会の科学研究費補助金の援助を受けて行われました。本校へのコメントをいただいた野村真准教授、後藤仁志講師にお礼を申し上げます。

利益相反

申告すべき潜在的な利益相反はありません。

文献

Altman J, Bayer SA (1978a) Prenatal development of the cerebellar system in the rat. I. Cytogenesis and histogenesis of the deep nuclei and the cortex of the cerebellum. *The Journal of comparative neurology* 179 (1):23-48. doi:10.1002/cne.901790104

Altman J, Bayer SA (1978b) Prenatal development of the cerebellar system in the rat. II. Cytogenesis and histogenesis of the inferior olive, pontine gray, and the precerebellar reticular nuclei. *The Journal of comparative neurology* 179 (1):49-75. doi:10.1002/cne.901790105

Altman J, Bayer SA (1987a) Development of the precerebellar nuclei in the rat: II. The intramural olivary migratory stream and the neurogenetic organization of the inferior olive. *The Journal of comparative neurology* 257

(4):490-512. doi:10.1002/cne.902570403

Altman J, Bayer SA (1987b) Development of the precerebellar nuclei in the rat: III. The posterior precerebellar extramural migratory stream and the lateral reticular and external cuneate nuclei. *The Journal of comparative neurology* 257 (4):513-528. doi:10.1002/cne.902570404

Bjorke B, Shoja-Taheri F, Kim M, Robinson GE, Fontelonga T, Kim KT, Song MR, Mastick GS (2016) Contralateral migration of oculomotor neurons is regulated by Slit/Robo signaling. *Neural development* 11 (1):18. doi:10.1186/s13064-016-0073-y

Essick CR (1912) The development of the nuclei pontis and the nucleus arcuatus in man. *American Journal of Anatomy* 13 (1):25-54

Fujita S (1963) The matrix cell and cytogenesis in the developing central nervous system. *The Journal of comparative neurology* 120:37-42

Harkmark W (1954) Cell migrations from the rhombic lip to the inferior olive, the nucleus raphe and the pons; a morphological and experimental investigation on chick embryos. *The Journal of comparative neurology* 100 (1):115-209

His W (1890) Die Entwicklung des menschlichen Rautenhirns vom Ende des ersten bis zum Beginn des dritten Monats. I. Verl/ingertes Mark. *Abh Kgl Sachs Ges, Wissensch Math Phys K1* 17:1-74

Hu H, Tomasiewicz H, Magnuson T, Rutishauser U (1996) The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* 16 (4):735-743

Kawano K, Gotoh H, Nomura T, Ono K (2018) Birthdate-dependent heterogeneity of oculomotor neurons is involved in transmedian migration in the developing mouse midbrain. *Journal of chemical neuroanatomy* 94:32-38. doi:10.1016/j.jchemneu.2018.08.003

Kawauchi D, Taniguchi H, Watanabe H, Saito T, Murakami F (2006) Direct visualization of nucleogenesis by precerebellar neurons: involvement of ventricle-directed, radial fibre-associated migration. *Development* 133

- (6):1113-1123. doi:10.1242/dev.02283
- Kudo M, Kitao Y, Okoyama S, Moriya M, Kawano J (1996) Crossed projection neurons are generated prior to uncrossed projection neurons in the lateral superior olive of the rat. *Brain research Developmental brain research* 95 (1):72-78
- Landsberg RL, Awatramani RB, Hunter NL, Farago AF, DiPietrantonio HJ, Rodriguez CI, Dymecki SM (2005) Hindbrain rhombic lip is comprised of discrete progenitor cell populations allocated by Pax6. *Neuron* 48 (6):933-947. doi:10.1016/j.neuron.2005.11.031
- Marillat V, Sabatier C, Failli V, Matsunaga E, Sotelo C, Tessier-Lavigne M, Chedotal A (2004) The slit receptor Rig-1/Robo3 controls midline crossing by hindbrain precerebellar neurons and axons. *Neuron* 43 (1):69-79. doi:10.1016/j.neuron.2004.06.018
- Markham JA, Vaughn JE (1991) Migration patterns of sympathetic preganglionic neurons in embryonic rat spinal cord. *Journal of neurobiology* 22 (8):811-822. doi:10.1002/neu.480220803
- Nomura T, Ohtaka-Maruyama C, Yamashita W, Wakamatsu Y, Murakami Y, Calegari F, Suzuki K, Gotoh H, Ono K (2016) The evolution of basal progenitors in the developing non-mammalian brain. *Development* 143(1):66-74. doi:10.1242/dev.127100
- Okada A, Charron F, Morin S, Shin DS, Wong K, Fabre PJ, Tessier-Lavigne M, McConnell SK (2006) Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature* 444 (7117):369-373. doi:10.1038/nature05246
- Okada T, Keino-Masu K, Masu M (2007) Migration and nucleogenesis of mouse precerebellar neurons visualized by in utero electroporation of a green fluorescent protein gene. *Neuroscience research* 57 (1):40-49. doi:10.1016/j.neures.2006.09.010
- Ono K, Tomasiewicz H, Magnuson T, Rutishauser U (1994) N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* 13 (3):595-609

- Ono K, Yasui Y, Ikenaka K (2004) Lower rhombic lip-derived cells undergo transmedian tangential migration followed by radial migration in the chick embryo brainstem. *The European journal of neuroscience* 20 (4):914-922. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03529.x
- Puelles L (1978) A Golgi-study of oculomotor neuroblasts migrating across the midline in chick embryos. *Anatomy and embryology* 152 (2):205-215
- Puelles L, Privat A (1977) Do oculomotor neuroblasts migrate across the midline in the retal rat brain? *Anatomy and embryology* 150 (2):187-206
- Rakic P (1971) Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *The Journal of comparative neurology* 141 (3):283-312. doi:10.1002/cne.901410303
- Rakic P (1974) Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183 (4123):425-427
- Rodriguez CI, Dymecki SM (2000) Origin of the precerebellar system. *Neuron* 27 (3):475-486
- Saito T, Nakatsuji N (2001) Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation. *Developmental biology* 240 (1):237-246. doi:10.1006/dbio.2001.0439
- Sakamoto K, Nakamura H, Takagi M, Takeda S, Katsube K (1998) Ectopic expression of lunatic Fringe leads to downregulation of Serrate-1 in the developing chick neural tube; analysis using in ovo electroporation transfection technique. *FEBS letters* 426 (3):337-341
- Tabata H, Nakajima K (2001) Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: visualization of neuronal migration in the developing cortex. *Neuroscience* 103 (4):865-872
- Tamamaki N, Fujimori KE, Takauji R (1997) Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17 (21):8313-8323

- Taniguchi H, Hatanaka Y, Murakami F (2002) [Neuronal migratory behavior revealed in organotypic culture]. *Tanpakushitsu kakusan koso Protein, nucleic acid, enzyme* 47 (15):2002-2009
- Yee KT, Simon HH, Tessier-Lavigne M, O'Leary DM (1999) Extension of long leading processes and neuronal migration in the mammalian brain directed by the chemoattractant netrin-1. *Neuron* 24 (3):607-622