



## 大脳皮質の層形成「制御」因子リーリンは、何を「制御」しているのか？

### 1. はじめに

我々哺乳類の大脳皮質を構成する神経細胞は、脳表面に平行な多層構造を形成している。特にヒトにおいて大きく発達した新皮質では、6層構造をしており、各層はそれぞれ形態や線維連絡様式等において共通の特徴を持った神経細胞群が集まって形作られている。構成要素である神経細胞には、大きく分けて興奮性神経細胞と抑制性神経細胞とがあり、両者がバランス良く配置されることによって機能的な回路網が形成されている。興味深いことに、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞とはその誕生部位と移動経路が全く異なることが知られている。すなわち、前者は皮質（外套）内の脳室面近くにある脳室帯または脳室下帯で誕生し、脳表面に向かって放射状に移動する（図1）<sup>1,2)</sup>のに対し、後者は（少なくともげっ歯類においては）終脳腹側にある基底核原基（ganglionic eminence）の脳室面近くで誕生し、脳表面に平行に背側へと移動して皮質内に進入する<sup>3)</sup>。それらは、いずれも皮質内においては基本的に“inside-out”様式、すなわち、より早生まれの神経細胞ほど最終的に深い層に、遅生まれの神経細胞ほど脳表面近くの浅い層に配置されることが知られている（図1）。この“inside-out”様式での神経細胞の配置に異常がある突然変異マウスが複数知られており、その代表格であるリーラー（*reeler*）マウスは、約60年前に報告されて以来多くの研究者の興味を引きつけてきた。リーラーの大脳皮質は、層構造が全体としておおよそ逆転してしまう（“outside-in”様式）という特徴的な表現型を有するためである。リーラーマウスでは興奮性神経細胞と抑制性神経細胞の両方が「逆転」するが、本稿では主に前者の挙動に焦点をあてて論じたい。

### 2. リーリンとそのシグナル伝達を担う役者たちの同定

リーラーマウスの原因遺伝子として、1995年に *reelin* が同定され、報告された<sup>4)</sup>。また、2年後の1997年には、移動細胞側のアダプター分子 Disabled homolog 1 (*Dab1*) の複数の欠損マウスがリーラーマウスと酷似した表現型を示すことが報告された。そのさらに2年後の1999年には、リーリンの受容体として apolipoprotein E receptor 2/low density lipoprotein receptor-related protein 8 (*ApoER2/Lrp8*) 及び very low density lipoprotein receptor (*VLDLR*) が報告された。この辺りの話には、セレンディピティーを伴う様々な興味深い出来事があったが、本稿ではスペースの関係で紹介する余裕がないため、詳細は最近の別の総説<sup>5)</sup>を参照していただければ幸いである。

受容体同定後、リーリン-*ApoER2/VLDLR-Dab1* という経路が確かに存在すること、そして、リーリンによる *Dab1* のチロシンリン酸化がリーリンの機能にとって重要であることが、数多くの研究によって示された。このまま一気にリーリンの下流のシグナルカスケードが同定され、脳の層形成機構が分子の言葉で説明される日も近いと誰もが予想したに違いない。

その後の10年で、確かに受容体の下流のカスケードについては多くの役者がわかってきた<sup>5)</sup>。そのうちのいくつかについては、例えばノックアウトマウスを作成するとリーラーマウスと似た表現型を示すことも報告された。つまり、生化学的には、かなり詳細な「分子」の語彙は増えてきた。しかしながら、今ひとつ「合点がいった」感じがしない。様々な下流分子がリーリンによって例えばリン酸化されてシグナルが伝わるのがわかったとしても、結局リーリンシグナルを受けた細胞は「どうなるのか」が未だにはっきりしないためである。役者の変化は解けても、役者たちが織りなす「層形成のドラマ」の全体像がまだ見えてこないのである。

### 3. リーリンは何をしているのか？

#### —「停止/離脱シグナル」説 vs.「許容 (permissive) シグナル」説

リーリンの移動神経細胞に対する生物学的機能を明らかにするため、この10数年間に様々な試みがなされてきたが、その結果、多くの異なる仮説が提唱されるに至った。そのうちのいくつかは、一見相反するものも含まれており、統一的な見解とは言い難い状況にある<sup>5)</sup>。本稿では、リーリンの生物学的機能に関する仮説のうち代表的なもの

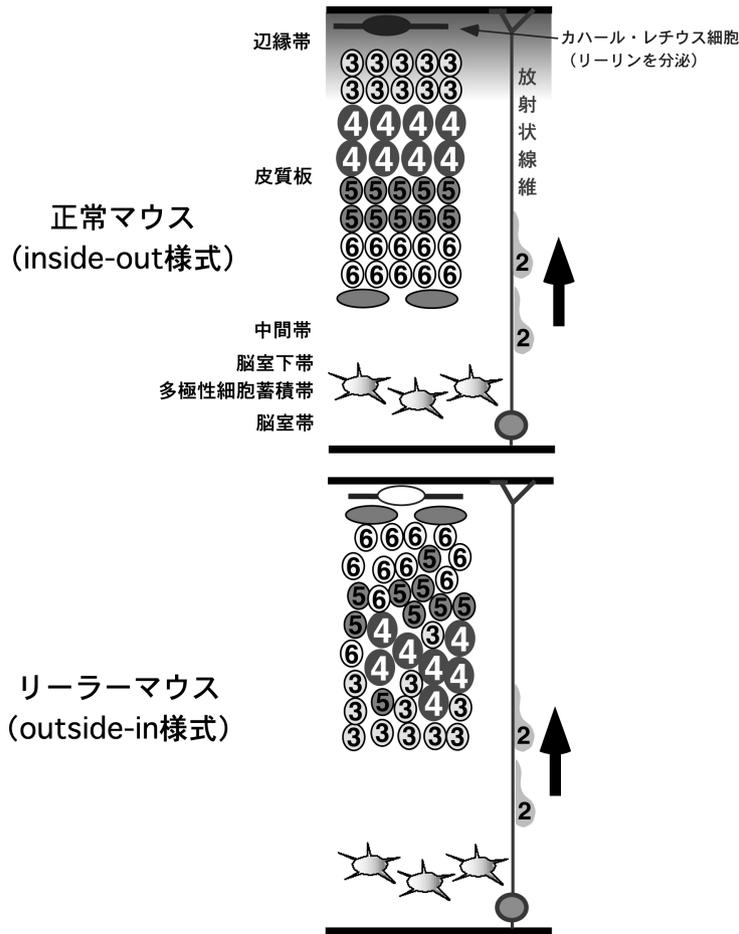


図1 “inside-out” 様式での大脳皮質の形成

脳室面近くで産生された興奮性神経細胞は、放射状に脳表面へと向かって移動する。正常では常に辺縁帯直下まで移動してその移動を終えるため、遅生まれの神経細胞は早生まれの神経細胞を乗り越えて脳表面近くに配置されることになる (“inside-out” 様式)。リーリンを欠損したリーラー突然変異マウスでは、全体としておおよそ逆転した “outside-in” 様式になることが知られている。

の一部を取り上げ、議論したい。

リーリンは、主に移動神経細胞の終点に位置する細胞から細胞外に分泌されるため、リーリンは移動細胞に対する「停止シグナル」である可能性が、分子の発見当初から提唱された(図1)。前述のように、大脳皮質の興奮性神経細胞は、その誕生部位から放射状に脳表面に向けて移動するが、その移動過程の後半では「放射状グリア」と呼ばれる細胞の突起(「放射状線維」)を足場として移動していくことが知られている。この足場から離脱すると移動は結果として停止すると考えられるため、「停止シグナル」説については、細胞の運動としての遊走能を停止させるという

考え方以外に、移動細胞の放射状線維からの離脱を促し、結果として停止させる「離脱シグナル」とする考え方もある。

Antonらは、 $\alpha 3\beta 1$  インテグリンがリーリンの受容体であると主張し、培養系にリーリンを加えるとこの $\alpha 3\beta 1$  インテグリンを介した反応によって放射状線維から移動神経細胞が離脱すると報告した<sup>6)</sup>(これについては異論も多い<sup>7)</sup>)。さらに、Dab1が放射状線維からの離脱に必要であることを示唆する結果も報告された<sup>8)</sup>。この報告では、GFPを発現するレトロウイルスを感染させて、同一クローン内の放射状線維と移動神経細胞との距離が計測され

た。その結果、正常マウスにおいては両者の距離はばらつきが大きかったが、Dab1を欠損した *scrambler* マウスでは両者は近接していた。 $\alpha 3$  インテグリンに対する機能阻害抗体でこの異常な近接は阻害できること、また、*scrambler* マウスでは $\alpha 3$  インテグリンの発現低下が起こらないことも示された。以上より、Dab1は $\alpha 3$  インテグリンを介して移動神経細胞の放射状線維に対する接着性を制御していると提唱された。しかしながら、 $\alpha 3$  インテグリンのノックアウトマウスや、 $\beta 1$  インテグリンの条件付きノックアウトマウスではリーラーマウス様の脳にならない<sup>9,10)</sup>ことから、リーリンシグナルとインテグリンとの関係の全体像については今後の更なる検証が必要と考えられている。

「停止／離脱シグナル」説とは逆に、むしろリーリンは細胞移動に対してポジティブに作用する「許容シグナル」とする仮説も提唱されている。この仮説が提唱されたきっかけになった有名な実験が、リーリンを脳室帯に異所的に発現させたトランスジェニックマウスの解析である<sup>11)</sup>。この解析では、リーリンが正常に機能するためには本来の発現部位（大脳皮質では脳表面の辺縁帯に存在するカハール・レチウス細胞）（図1）で発現する必要があるのかを検討するため、ネスチンプロモーターによって脳室側で強制発現させたマウスが作成された。リーラーのバックグラウンドにこのトランスジーンを導入したところ、プレプレートの分割等、不完全ながらも一部の表現型がレスキューされた。さらに、リーラーのヘテロマウスに導入したところ、脳室帯で異所的に発現したリーリンは神経細胞移動を阻害しなかった。これらの結果は、リーリンが移動細胞に対する単純な「停止／離脱シグナル」ではなく、むしろ移動に対する「許容シグナル」である可能性を示唆する（ただし、異所的リーリンの一部が放射状線維の中を運ばれてその先端、すなわち辺縁帯で分泌される可能性は否定できていない）。そのため、上記の「停止／離脱シグナル」説を支持するデータとどのように整合性を持って解釈すれば良いのか、様々な議論が行われた。

「許容シグナル」説を支持する論文は他にも複数報告された。まず、*p73*の欠損マウスの解析である。*p73*は*p53*のホモログであり、カハール・レチウス細胞で発現する。*p73*欠損マウスでは、大脳皮質辺縁帯のリーリン陽性細胞が激減してしまうにも関わらず、プレプレートの分割や初期皮質板の形成は正常に起こることが観察された<sup>12)</sup>。また、終脳背内側部のcortical hemと呼ばれる部位由来のカハール・レチウス細胞を除去することによって辺縁帯内の

カハール・レチウス細胞を著減させたマウスを作成した実験でも、皮質板は正常に形成された<sup>13)</sup>。さらに、リーラーマウス胎児大脳皮質のスライス培養に、リーリンの全長または中央部分の断片を添加したところ、やはりプレプレートの分割や皮質板の形成はレスキューされた。以上の結果は、リーリンが単純な「停止／離脱シグナル」であるとすると解釈が困難であり、リーリンがその正常な機能（の少なくとも一部）を発揮するためには細胞移動の終点で分泌される必要はないことを示している。そのためリーリンは、リーリン以外の未知の制御シグナルに移動細胞が反応するための「許容シグナル」ではないかと考えられるようになった。

#### 4. リーリンは辺縁帯様構造を誘導し、かつ移動神経細胞の“inside-out”様式での凝集を引き起こす

我々は、移動神経細胞に対するリーリンの*in vivo*での機能を再検討するため、以前我々のグループで開発した子宮内胎児脳電気穿孔法<sup>14)</sup>（特許第4536233号）を用いて発生期の正常マウス大脳皮質に異所的にリーリンを強制発現させる実験を行ってみた<sup>15)</sup>。リーリンが「停止／離脱シグナル」であるなら移動細胞は停止するであろうし、「許容シグナル」であるなら大きな変化はないことが期待された。

ところが、結果はそう単純ではなかった。移動細胞はリーリンによって単純に停止するわけではなく、異所的に球状の細胞凝集塊を形成した（図2）。その凝集塊は、リーリンを強制発現した細胞だけではなく、遺伝子導入されていない周囲の正常細胞を多く巻き込んで形成されていた。しかも、凝集塊の表面は比較的平滑であり、各細胞は左右に移動して相互の位置を調整しながら一つの滑らかな塊を形成していく可能性が示唆された（単純な「停止シグナル」だとすると、むしろ表面は不整形になると推測される）。興味深いことに、凝集塊中の各細胞は突起を凝集塊の中心に向けて放射状に配列しており、その凝集塊中心近くからは細胞体が排除されて突起のみが高密度に分布していることを見いだした。この部位にはリーリンが濃縮して局在しており、集まった突起はMAP2陽性の樹状突起に分化していくこともわかった。つまり、脳表面の辺縁帯とその直下の構造ときわめて良く似た構造が、異所的にリーリンによって誘導されることがわかった。ちなみに、リーリン発現量については、前述のネスチンプロモーター下でのリーリンの異所的発現実験では、カハール・レチウス細胞における内在性リーリンの10~20%のみだったが、本実験では40~60%の発現量が得られた。

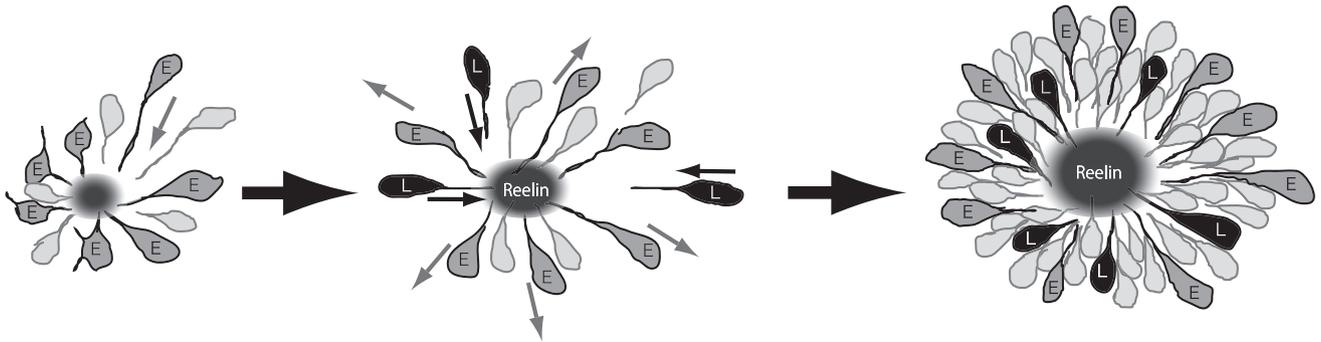


図2 リーリンによる「ミニ皮質」の誘導<sup>15)</sup>

リーリンを発生期大脳皮質の本来と違う場所に強制発現させたところ、まず早生まれの神経細胞 (E: early-born) が突起を中心に凝集し始めた (左図)。次に、後続の遅生まれ神経細胞 (L: late-born) が早生まれ神経細胞 (E) を乗り越えて凝集塊の中心近くに向かって進入する (中図の小黒矢印) と同時に、早生まれ神経細胞 (E) は突起を中心付近に向けたまま細胞体が“退いて”凝集塊の周囲へと移動した (中図の小グレー矢印)。その結果、「ミニ皮質」とも言えるような“inside-out”構造の凝集塊が、異所的リーリンを囲むようにできあがった (右図)。(文献15の図を改変)

以上の実験は、一部の移動神経細胞自身にリーリン発現ベクターを導入したものであったが、同様の結果はリーリンを分泌する細胞株を発生期大脳皮質に異所的に移植することによっても引き起こされた。従って、電気穿孔法等によるアーチファクトの可能性は否定された。

皮質板を移動する正常な神経細胞は個々バラバラに移動するが、その後辺縁帯直下でリーリンに触れると、「凝集」して層構造を作っていく。そのため、リーリンが移動神経細胞の凝集を引き起こすことは理にかなっていると考えられる。しかしながら、その凝集塊は後続の移動神経細胞の障壁になってはならないという条件を満たすことが必須である。もし後続細胞の移動を阻害してしまうと、それらは辺縁帯直下まで到達できず、結果として皮質板は「逆転」してしまって“inside-out”様式ではなくなってしまうからである。

そこで次に、相対的に早生まれの神経細胞と遅生まれの神経細胞がリーリンによる異所的凝集塊内でどのように配置するかを調べてみた。その結果、興味深いことに、凝集塊に新たに参加する移動細胞は、凝集塊の表面から中心近くの辺縁帯様領域 (細胞体がほとんど存在しないリーリン陽性領域) に接した部位まで奥深く進入することを見いだした。それに伴い、早生まれ細胞は凝集塊の周辺近くに追いやられた (図2中)。すなわち、本来辺縁帯直下で正常移動細胞が示すように、後輩細胞が先輩細胞を追い越して「辺縁帯直下」まで移動して停止するという現象が異所的に再現されていることがわかった。

この異所的“inside-out”様式は、移動細胞中の Dab1 や ApoER2/VLDLR を RNA 干渉法によってノックダウンす

ると阻害されることから、リーリンの既知のシグナルカスケードを利用した現象であることも示唆された。

以上より、リーリンは異所的に辺縁帯様構造を誘導し、かつ移動神経細胞の“inside-out”様式での凝集を引き起こす能力を持っていることがわかった。

## 5. リーリンの生物学的機能とは？

では、懸案の「停止／離脱シグナル」説と「許容シグナル」説についてはどう解釈すれば良いのであろうか。リーリンは、脳室下帯付近の深部にも少量発現していることが報告されている。想定できる一つの可能性は、この深部のリーリンが「許容シグナル」として作用し、辺縁帯のリーリンが「停止／離脱シグナル」として機能するという考え方であろう。もしかしたら、深部リーリンによって“competent”になった移動細胞は辺縁帯直下では低濃度のリーリンでも十分反応できるのかも知れない。電気穿孔法による強制発現では、リーリンが高濃度であったために本来辺縁帯直下で起こるべき現象が異所的に起こったのであろうか。

もしリーリンが「停止／離脱シグナル」と「許容シグナル」の両方の作用を持つのだとすると、その使い分けはどのようにされているのであろうか？ “competent”になった細胞となっていない細胞とではどんな相違があるのか？ そもそも、リーリンによって細胞の凝集が起こるのはなぜか？ 細胞体間の接着性が変化しているのか、または突起のみが凝集して中心から細胞体を牽引しているのか？ 凝集塊の中心に細胞体が入れないのはなぜか？

この約10年間の世界のリーリン研究は、残念ながら未

だに「層形成のドラマ」の全体像を描き出すまでには至っていない。しかしながらその成果は、今後追究すべきターゲットを浮き彫りにし、具体化することに大きく貢献した。今後はその中で特にブレイクスルーになりうる重要な問題がどれかを見極め、「ドラマ」の本質を明らかにしていくことが求められる。斬新な発想を持つ多くの若い頭脳が、この分野に参入してくれることを願っている。

最後に、本稿では引用文献数の制限のため多くの重要な文献を引用できなかったことをお詫びしたい。

- 1) Valiente, M. & Marin, O. (2010) *Curr. Opin. Neurobiol.*, **20**, 68–78.
- 2) 仲嶋一範 (2009) ブレインサイエンス・レビュー 2009 (伊藤, 川合編), pp. 207–232, クバプロ, 東京.
- 3) Nakajima, K. (2007) *Neurochem. Int.*, **51**, 121–131.
- 4) D'Arcangelo, G., Miao, G.G., Chen, S.C., Soares, H.D., Morgan, J.I., & Curran, T. (1995) *Nature*, **374**, 719–723.
- 5) Honda, T., Kobayashi, K., Mikoshiba, K., & Nakajima, K. (2011) *Neurochem Res.*, in press.
- 6) Dulabon, L., Olson, E.C., Taglienti, M.G., Eisenhuth, S., McGrath, B., Walsh, C.A., Kreidberg, J.A., & Anton, E.S. (2000) *Neuron*, **27**, 33–44.
- 7) Magdaleno, S.M. & Curran, T. (2001) *Curr. Biol.*, **11**, R1032–1035.
- 8) Sanada, K., Gupta, A., & Tsai, L.H. (2004) *Neuron*, **42**, 197–211.
- 9) Belvindrah, R., Graus-Porta, D., Goebbels, S., Nave, K.A., & Muller, U. (2007) *J. Neurosci.*, **27**, 13854–13865.
- 10) Graus-Porta, D., Blaess, S., Senften, M., Littlewood-Evans, A., Damsky, C., Huang, Z., Orban, P., Klein, R., Schittny, J.C., & Muller, U. (2001) *Neuron*, **31**, 367–379.
- 11) Magdaleno, S., Keshvara, L., & Curran, T. (2002) *Neuron*, **33**, 573–586.
- 12) Meyer, G., Cabrera Socorro, A., Perez Garcia, C.G., Martinez Millan, L., Walker, N., & Caput, D. (2004) *J. Neurosci.*, **24**, 9878–9887.
- 13) Yoshida, M., Assimacopoulos, S., Jones, K.R., & Grove, E.A. (2006) *Development*, **133**, 537–545.
- 14) Tabata, H. & Nakajima, K. (2001) *Neuroscience*, **103**, 865–872.
- 15) Kubo, K., Honda, T., Tomita, K., Sekine, K., Ishii, K., Uto, A., Kobayashi, K., Tabata, H., & Nakajima, K. (2010) *J. Neurosci.*, **30**, 10953–10966.

仲嶋 一範

(慶應義塾大学医学部解剖学教室)

What does Reelin control to regulate neuronal layer formation in the developing cerebral cortex ?

Kazunori Nakajima (Department of Anatomy, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan)

## MAP キナーゼのサブタイプ特異的シグナルクロストークによるがん抑制性ケモカイン CXCL14/BRAK の発現制御

### 1. はじめに

日本において国民の1/2ががんに罹患し、1/3ががんで死亡する。その治療にかかる費用も年間3兆円を超えるようになってきた。現在のがん治療薬の主流はがんにおいて発現が上昇する、あるいは活性化が起こる分子を標的とし、その分子の活性を阻害する分子、あるいは阻害抗体を用いて標的分子を阻害する分子標的治療が主流である。しかし、がんで活性が上昇する分子も正常細胞の生理機能発現に重要な分子である場合が多く、その分子の活性阻害により強い副作用を示す場合が多い。我々は正常細胞が種々のがん増殖抑制分子を合成しているためにがんの発生、増殖が抑えられており、その分子の発現低下、あるいは活性の低下によりがんが進行する可能性を考え、がんの増殖過程で発現が低下する分子を探索し、*in vivo* でがん抑制作用を示すケモカイン CXCL14/BRAK を見いだした。この分子は殆どすべての正常細胞によって合成されており、その発現制御機構の解析から MAP キナーゼのサブタイプ特異的クロストークによって発現が制御されていることが明らかになった。

### 2. CXCL14/BRAK はがん抑制性のケモカインである

がんは種々の段階を経て徐々に進展・悪性化し、かつ、各段階はがん進展促進因子とがん抑制分子との活性のバランスによって進行すると考えられている。

頭頸部がんを含む多くのがんで上皮増殖因子 (EGF) 受容体 (EGFR) の異常な活性化が観察されるので、がん抑制分子を見いだすことを目的として無血清培養下で EGF 処理により発現の低下する分子を DNA チップ法と RT-PCR 法でスクリーニングし、顕著に低下する分子として、白血球の遊走を促進するケモカイン (chemotactic cytokine) の一種である CXCL14 を見いだした<sup>1)</sup>。この分子は 1999 年に細胞のトランスフォーメーションやがん化で低下する分子として報告され、Breast And Kidney で発現が高いことから BRAK などと呼ばれたが<sup>2)</sup>、現在は分子の N 末端領域に二つのシステインを含む CXC 配列を持つことから統一名として CXC 型ケモカインの 14 番目のリガンド