

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 外崎 円

### 論文題目

L1cam is crucial for cell locomotion and terminal translocation for the soma in radial migration during murine corticogenesis.

### 論文内容の要旨

神経細胞接着分子 L1cam (L1 cell adhesion molecule, 以下 L1) は、ヒトの遺伝性神経疾患候群の責任遺伝子であり、X 染色体連鎖性水頭症との関連がよく知られている。最近、マウス的大脑皮質形成過程において、L1 分子の発現抑制により皮質神経細胞遊走遅延や細胞分化方向の異常が生じることが明らかになり、この過程で L1 が重要な分子として機能することが報告された。しかし、L1 が RNA 干渉法によって発現抑制されたとき、いかなる変化が惹起されて細胞遊走への影響が出現するのかという、単一細胞レベルでのメカニズムに関しては全く解明されていない。そこで、著者はその動態変化を解明するためにタイムラプス観察による解析を実施した。

はじめに、子宮内電気穿孔法および RNA 干渉法を用いたマウス胎仔終脳への *in vivo* 遺伝子導入に加えて、タイムラプス観察を行うための *in vitro* 実験系の確立に着手した。L1 を標的とした shRNA 発現ベクターを導入(以下、遺伝子導入)後、胎仔脳をすばやく取り出して、低融点アガロースに包埋した状態で 200  $\mu\text{m}$  の厚さに切り出し、目的とする大脳壁スライスを観察用ガラスボトム皿上にコラーゲン包埋したのちに培養することで観察可能とした。

その後、蛍光標識された遺伝子導入細胞の動態を詳細に解析するために、5%  $\text{CO}_2$ 、37°C でインキュベーションしながらレーザ共焦点顕微鏡下でタイムラプス画像を 10 分間隔で連続的に取得し、L1 の発現抑制が細胞遊走に及ぼす変化を詳細に比較解析した。

通常、正常な哺乳類的大脑皮質の形成過程では、神経細胞が脳室寄りの部位(脳室帯: ventricular zone)で生まれたのち表層に向かう放射状細胞遊走を開始し、中間帯(intermediate zone)を通過し(当該細胞遊走様式をロコモーションと呼ぶ)、皮質板に侵入、さらに脳表面近くの原皮質帯(primitive cortical zone)に到達し、タ

ーミナルトランスロケーションと呼ばれる段階を経て細胞遊走を終了する。

そこでまず、L1 が抑制された細胞(以下、L1KD 細胞)の遊走遅延が、細胞遊走速度の低下によるものかどうか検討した。胎齢 13.5 日(E13.5)で遺伝子導入し E14.5 で作製した脳スライスをを用いて、蛍光標識された細胞の動態を 3 日間連続観察した。その結果、対照細胞では中間帯で速やかなロコモーションを示し皮質板に侵入する像が観察された(Days *in vitro* (Div) 1-2:  $5.32 \pm 0.46 \mu\text{m/hr}$ 、Div2-3:  $7.39 \pm 0.64 \mu\text{m/hr}$ )。一方、L1KD 細胞では中間帯でのロコモーションによる細胞遊走速度が 24 時間(Div1)後から低下傾向を示し、48 時間(Div2)以降で有意に低下していた(Div1-2:  $4.48 \pm 0.35 \mu\text{m/hr}$ 、Div2-3:  $4.33 \pm 0.48 \mu\text{m/hr}$ )。このことから、L1KD 細胞の遊走遅延には、遊走速度が関係していることが示唆された。

続いて、中間帯を通過したのちの細胞の動態について解析するために、原皮質帯におけるターミナルトランスロケーションに注目した。E13.5 で遺伝子導入し E15.5 で作製した脳スライスをを用いて 24 時間タイムラプス観察した。対照細胞では、原皮質帯まで遊走后、先端突起先端が辺縁帯(marginal zone)に到達すると、すばやく先端突起が短縮することにより細胞体が皮質板の最上部まで引き上げられた。これに対して、L1KD 細胞では、先端突起がより長くかつ彎曲していた(突起長: 対照細胞  $35.78 \pm 2.49 \mu\text{m}$ 、L1KD 細胞  $60.62 \pm 5.66 \mu\text{m}$ )。彎曲度を定量的に評価するために、突起の曲線性を指標とした彎曲度数(Curvature Index)を計測すると、対照細胞のそれに比し L1KD 細胞では有意に増加していた(対照細胞  $1.019 \pm 0.006$ 、L1KD 細胞  $1.073 \pm 0.026$ )。さらに、この差は突起先端が辺縁帯に達するターミナルトランスロケーション開始時以降も継続し、皮質板最上部への細胞体移動が有意に低下していたことから、当該突起形態の異常はターミナルトランスロケーションの動態に影響を与えていることが考えられた。

以上の結果より、哺乳類的大脑皮質形成過程において重要なステップに位置付けられる放射状遊走の各相(ロコモーションおよびターミナルトランスロケーション)の進行に、L1 が機能的に極めて深く関わっていることが示唆された。