

# Involvement of Netrin-1 Slit2 in mammillary tract formation in mouse brain

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7639">http://hdl.handle.net/2297/7639</a>

# 乳頭体神経回路形成における Netrin-1 と Slit2 の関与と その作用機序の解析

金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻  
生体防御応答学研究分野  
(主任：中西義信教授)

土 屋 玲 子

神経回路の形成には、胎生期に神経細胞の軸索が標的へ正確にガイダンスされる必要がある。この現象には、ガイダンス分子と呼ばれる化学誘引物質と化学反発物質の働きが必須である。本研究では、間脳視床下部にある乳頭体の回路形成について、軸索ガイダンス機構を解析した。Pax6は胚発生初期の神経系に発現する転写調節因子の1つで、胎生期の間脳の形成や軸索形成に重要な役割を果たすことが知られている。この遺伝子の突然変異体マウス (small eye, Sey) の症状から、この転写調節因子が様々な神経核の軸索ガイダンスに関わっていることが示されており、特に乳頭体視床路形成への関与が指摘されている。このマウスを使って乳頭体回路形成の機構について解析を行ったところ、発生の早い時期で乳頭体からの軸索の走行異常が起こることがわかった。そこで、Sey胚と野生型胚との間で様々なガイダンス分子の発現を比較すると、Sey胚の間脳でNetrin-1の異所的発現とSlit1及びSlit2の発現低下が見られた。次に、これらの分子をコードする遺伝子をSey胚胎児の間脳に導入して発現させると、Netrin-1が乳頭体の軸索を誘引してSlit2が軸索伸長を阻害し、軸索の走行が是正された。以上より、正常な乳頭体視床路の形成には軸索ガイダンスであるNetrin-1とSlit2が必要であり、Seyにおける乳頭体視床路の欠損にはこれら軸索ガイダンス分子の発現異常がその一部として関与することが示唆された。

**Key words** axon guidance, Netrin-1, Slit2, mammillary body, Sey

行動や思考・記憶といった脳の高次機能は、脳神経系において正確な神経回路網が形成され、情報の伝達に必要な構造が作られて成り立っている。胎児期の脳では、脳の領域特異化と回路網の形成という二つの過程が同時進行している。神経発生過程での回路網形成では、ニューロンの軸索が様々なガイダンス分子によって正確に標的に導かれる<sup>1)~3)</sup>。すなわち、脳の各領域では特有のガイダンス分子が発現し、ニューロン側ではそれらのレセプターが発現して、両者間で特異的なシナプス結合が形成される<sup>4)~6)</sup>。その一方で、正しい標的とシナプス形成することができなかったニューロンは、アポトーシスを起こして除去される<sup>7)8)</sup>。

伸長するニューロンの軸索の先端は成長円錐と呼ばれ、ガイダンス分子のセンサーとして働いて軸索の伸長方向を決定する役割を担う。ガイダンス分子は軸索を誘引するものと反発するものの2つに分類され、それぞれに分泌拡散して作用するものと細胞膜上にあって接触を介して作用するものが存在する<sup>9)</sup>。

Netrinは軸索を誘導する代表的なガイダンス分子であり、脊髄腹側正中部にある底板から分泌され、脊髄交連性ニューロンの軸索を誘引する<sup>9) 10)</sup>。Netrinのレセプターは、ヒト大腸癌の腫瘍抑制遺伝子として知られていたDCC (deleted in colorectal cancer) である<sup>11)</sup>。一方、反発性のガイダンス分子には

Semaphorinファミリー、ephrinファミリーやSlitなどがあり、これらのレセプターも同定されてきている<sup>12)~18)</sup>。

このように多くのガイダンス分子が同定されているものの、脳の中の各々の神経回路がどの軸索ガイダンスあるいはその組み合わせにより形成されるのか、さらにそれがどのような分子カスケードにより行われているのかについてはまだ十分にわかっていない。本研究では、胚発生過程の最も早い時期に回路形成が始まる乳頭体について、ガイダンス機構の解析を行った。「Papezの記憶の回路」の重要な中継核である乳頭体は、視床下部腹側の最も尾側に存在する神経核である。その軸索は胚発生の初期に、まず最初に後方の中脳被蓋へ投射して乳頭体被蓋路を形成したのち、途中から枝分かれして視床前方へ投射し、乳頭体視床路が形成される<sup>19)</sup>。最近の研究により、転写因子Pax6をコードする遺伝子の変異体マウス (small eye, Sey<sup>Neu</sup>) において、この乳頭体視床路が完全に欠失していることがわかった<sup>20)</sup>。本研究では、その欠失の原因がガイダンス分子の異常に起因するかどうかを検証した。

## 材料及び方法

### I. 実験動物

この研究で使用されたPax6突然変異体マウスSeyは、

平成17年10月13日受付、平成17年11月16日受理

Abbreviations : DCC, deleted in colorectal cancer; DIG, digoxigenin; DiI, 1,1-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; DT, dorsal thalamus; GFP, green fluorescent protein; M, mesencephalon; PFA, paraformaldehyde; Sey, small eye; SPC, spinal cord; ZLI, zona limitans intrathalamica

Roberts<sup>21)</sup>が発見し継代した、遺伝的背景がFVB系のマウスである。Seyのホモ接合体は生後すぐに死亡するため、実験に供するホモ接合体を得るために、ヘテロ接合体同士を交配した。交配後、プラグを確認した日の朝を胚発生のE0.5とした。ホモ接合体は、その眼の形成不全から正常胚と容易に区別することができる<sup>22) 23)</sup>。コントロールとなる正常胚は、発生ステージを合わせたFVB系統のマウスから得た。移植実験に用いられた緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) トランスジェニックマウスは、大阪大の岡部博士より供与を受けた<sup>24)</sup>。

## II. DiI標識

発生段階E11.5~E13.5の胎児より脳を取り出し、正中で切り開き髄膜を取り除いた後、4%パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde, PFA) を含むPBSで固定した。乳頭体からの軸索の投射を可視化するために、微小ガラス管の先端でカルボシアニン蛍光色素DiI (1, 1-dioctadecyl-3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) (Molecular Probe, Eugene, OR) の小塊を乳頭体に注入した。脳組織を密閉容器に入れ軸索の先端が標識されるまで、2日~1週間、37℃の暗室に保存した。標識された脳組織はカバーガラスをかけて封入し、共焦点顕微鏡LSM5 PASCAL (Carl Zeiss, Jena, Germany) で観察、記録した。

## III. 発現ベクター

マウスの脳組織内で目的のガイダンス分子のタンパク質を発現、分泌させるために、サイトメガロウイルス遺伝子のプロモーターを持つpSecTag Bベクター (Invitrogen, Calsbad, CA) を使用した。マウスのSlit1, Slit2をコードする配列には、その発現を確認するためにN末にヒト胎盤由来アルカリ性フォスファターゼをコードする遺伝子配列を結合してベクターに挿入した。ニワトリ由来Netrin-1発現ベクターはTessier-Lavigne博士 (Stanford大学, 現Genentech社) より供与を受けた。発現マーカーとしてのGFPプラスミドベクターはpIRES-hrGFP-1a (Stratagene, La Jolla, CA) を用いた。いずれも脳組織に導入する前に、HEK293 (ヒト胚腎臓由来培養細胞) にトランスフェクトして、その発現を確認した。

## IV. *In situ* ハイブリダイゼーション

### 1. RNAプロローブの作製

*Netrin-1*, *Slit1*, *Slit2*, *DCC*, *Robo1*, *Robo2*, *Foxb1* および *Pax6* の遺伝子は、ラットE15.5日胚cDNAよりPCRで単離し、pGEM-Tベクター (Promega, Madison, WI) を用いてクローニングした。精製したプラスミドは制限酵素により直鎖状にし、これを *in situ* hybridization のプロローブ合成の鋳型とした。Digoxigenin (DIG) 標識センスプロローブ及びアンチセンスプロローブはDIG-11-UDP RNA labeling kit (Roche, Germany) を用いて、メーカーのマニュアルにしたがって合成した。

### 2. 胎児脳切片の調製

全ての胚はE12.5で麻酔下で母マウスの子宮より取り出し、PBSで洗浄後4%PFA/PBSで4℃で一晩固定した。続く24時間で20%シヨ糖に置換し、O.T.C. compound (Tissue-Tek, サクラ精機, 東京) に包埋した。クリオスタットにて16  $\mu$  mの凍結切片を作製し、MASコートスライドガラス (松浪硝子, 大阪) に載せ、冷風乾燥させ、使用時まで-80℃にて保存した。

### 3. ハイブリダイゼーション (hybridization)

切片試料を風乾後、4%PFA/PBSにて30分間浸漬した後固定し、0.1%Triton-X100/PBSにて5分透過処理後、PBSで5分3回洗浄した。0.2NのHC1に20分浸漬後、1  $\mu$  g/mlのproteinaseK

で37℃で5分間処理し、PBSで5分3回洗浄した。再度、4%PFA/PBSで固定後、2mg/mlのグリシン液に15分間づつ2回浸漬した。2  $\times$  SSC, 50%ホルムアミド溶液で65℃にて1時間、プレハイブリダイゼーションを行った。DIG標識RNAプロローブをハイブリダイゼーション液 (5  $\times$  SSC, 2%ブロッキングリエージェント (Roche), 50%ホルムアミド) で100倍希釈混和し、90℃で2分間、変性させた後プレハイブリダイゼーションの終わった試料に滴下した。50%ホルムアミドで加湿した湿箱にスライドガラスを並べ、65℃で16時間、ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、2  $\times$  SSC, 50%ホルムアミドで65℃, 1時間、プロローブの洗浄を行い、RNase用緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH8.0, 500 mM NaCl) に37℃10分間浸漬したのち、20  $\mu$  g/mlのRNaseで37℃30分間、処理を行った。再びRNase用緩衝液に37℃10分間、続いて2  $\times$  SSCに65℃20分間、0.2  $\times$  SSCに65℃20分間を2回、スライドガラスを浸漬することによって洗浄した。DIG緩衝液-1 (100 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl) に2%ブロッキングリエージェント, 20%子羊血清を加えてブロッキング溶液とし、これをスライドガラスに滴下して湿箱にて室温で1時間ブロッキングした。ブロッキング溶液で1000倍に希釈したヒツジ抗DIG抗体 (Roche) をスライドガラスに滴下し室温で1時間、湿箱にて抗原抗体反応を行った後、DIG緩衝液-1で15分間、3回洗浄した。次にDIG緩衝液-2 (100mM Tris-HCl pH9.5, 150mM NaCl) に5分間浸漬後、ニトロブルーテトラゾリウム (nitroblue tetrazolium, NBT)/Xリン酸 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, BCIP) 発色液 (Roche) を滴下し、室温で一晩発色させた。DIG緩衝液-1で軽く洗浄して発色を停止後、水溶性封入剤で封入し、光学顕微鏡PROVIS AX-80 (Olympus, 東京) で観察した。

## V. 免疫組織化学

E12.5の胎児脳を4%PFA/PBSで固定後、20%シヨ糖に置換し、O.C.T. compoundに包埋した。これらはクリオスタットにて20  $\mu$  mに薄切し、室温で風乾した後、Avidin-Biotin Complex法 (VECTASTAIN ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) にて免疫組織化学染色を行った。風乾後、スライドガラスを1.5%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含むメタノール溶液中で5分間浸漬して、内因性ペルオキシダーゼを失活させた。PBSで5分洗浄後、10%牛胎児血清を含むPBST (0.1%Triton-X 100/PBS) で30分間ブロッキングを行ったのち、一次抗体との反応を4℃で一晩行った。一次抗体の抗Robo1, Robo2ウサギポリクローナル抗体 (大阪大学の村上富士夫教授より供与) は6000倍希釈で使用した。PBSTで5分間3回洗浄した後、ビオチン化抗ウサギIgG抗体と30分間反応後、ストレプトアビジンとhorseradish peroxidase標識ビオチンの複合体を30分間反応させた。PBSTで5分間3回洗浄した後、3,3'-ジアミノベンチジン4塩酸塩 (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) にて発色させ、PBSTで洗浄後、封入して顕微鏡観察を行った。

## VI. *In vitro* エレクトロポレーション

エレクトロポレーションによるE12.5のSey胎児脳への遺伝子導入は、Saitoら<sup>25)</sup>の方法に従った。発現ベクターは5mg/mlの濃度でPBSに溶解し脳内注入をモニターするため、ファストグリーンを添加した。導入マーカーとしてEGFPベクターを含む、1~3  $\mu$  lの各発現ベクター溶液を実体顕微鏡下で極小マウスピペットを使って胎児脳の第三脳室へ注入した。続いて、PBS中で胎児脳をピンセット電極 (直径5mm, CUY650-5, ネット

バジーン, 千葉)の中央に置き, 遺伝子導入装置 (CUY21, ネッパジーン)で電気パルス (30Vを50ms, 950msの間隔を置いて5回)を与えた。

Ⅶ. 組織培養

エレクトロポレーションの終わった胎児脳を正中で切り開き, 髄膜を除いた。トリミングをおこなった後, 拡散分子の濃度勾配を形成させるために, ラット尾由来コラーゲンゲル (Type IV; Roche) に包埋し, カルチャーインサート (Millicell-CM 0.4  $\mu$  m pore size; Millipore, Bedford, MA) に載せて培養した。Neurobasal培地 (Invitrogen Japan, 東京) にN-2 supplement (Invitrogen Japan) を1/100容加え, 5% CO<sub>2</sub>, 37℃で2日間培養した。コントロールには, 同じ発生段階の遺伝子導入を行わないSey胎児脳を同様に培養した。いくつかの脳は拡散性誘引・反発分子の探索のために底板を含む脊髄 (spinal cord, SPC) と共培養した。SPCは宿主側の組織と容易に区別するため, GFPトランスジェニックマウス (E12.5) より採取した。培養2日目に4%PFA/PBSで固定, DiIにて乳頭体軸索を標識し, 同様に形態観察をおこなった。

Ⅷ. 解析

DiI標識した全ての脳は, 共焦点顕微鏡で観察, 画像を取得後に解析した。乳頭体からの軸索の長さの定量解析はPASCAL付属ソフトウェアで行った。測定値は平均値±標準誤差 (SEM) で表記した。コントロールとの差の統計学的有意性は, Student's t-testを用いて行い, P<0.05を統計学的有意差ありと評価した。

成績

I. 正常胚での乳頭体の回路形成

まず最初に, 野生型マウスについて胚発生過程での乳頭体軸索形成を組織化学的に調べた。乳頭体は発生初期の間脳視床下部腹側に存在し, Mastickら<sup>26)</sup>の報告したようにE10.5頃に最初の軸索形成が認められた。さらにE11.5, E12.5と発生が進むと, 東化した軸索が正中腹側の底板に沿って湾曲しながら一斉に後方の中脳へ伸びてゆく像が観察された (図1. A, B, C, D)。そしてE13.5になると, 東化してZona Limitans Intrathalamica (ZLI) に達した軸索は, ZLIを過ぎると一斉に幅を広げてさらに後方へ伸びていた (図1. E, F)。ただし, 将来視床になる領域である背側視床 (dorsal thalamus, DT) には決して侵入していなかった。

II. Seyでの乳頭体からの軸索走行異常

一方, 転写因子Pax6の変異マウスSeyでは, E10.5で脳の発達不全が認められ乳頭体軸索の伸長も観察されなかった。E11.5になると, 軸索の数は正常胚と同程度までに増えたが, 本来の軌跡から大きく外れて迷走する異常な軸索が多数観察された (図1. G, H)。E12.5, E13.5と発生が進むにつれて, その傾向はますます強まり, DT領域のほぼ全域に迷走した異常な軸索が観察された (図1. I, J, K, L)。この軸索の異常走行は, 調べた全てのSeyマウスで認められ, 正常マウスでは決して観察されなかった。

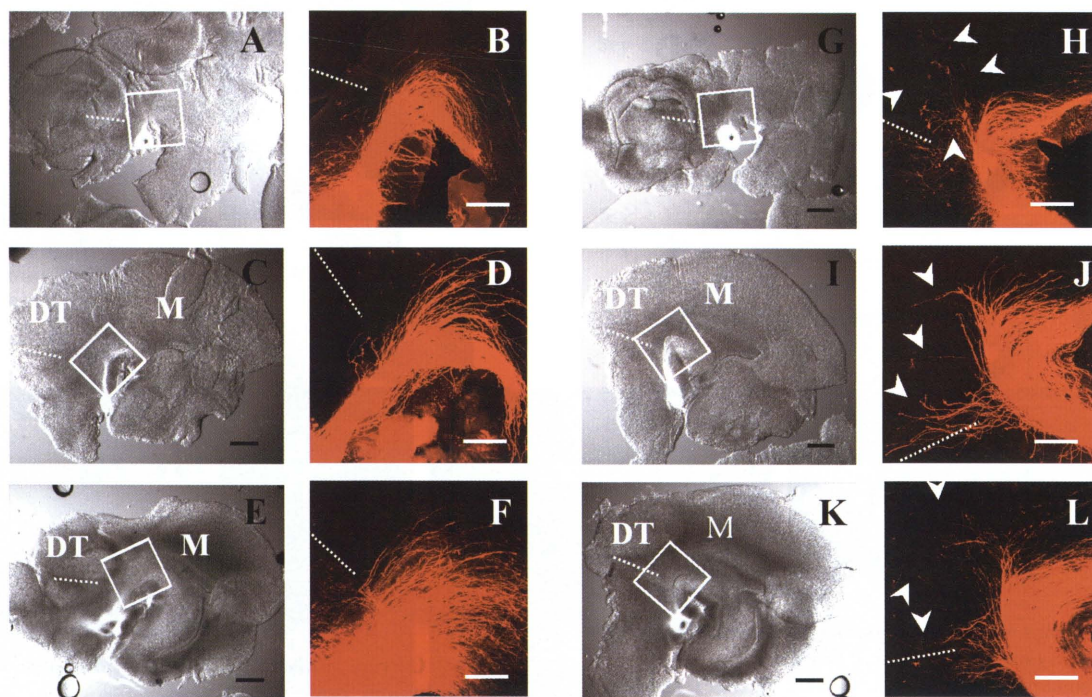
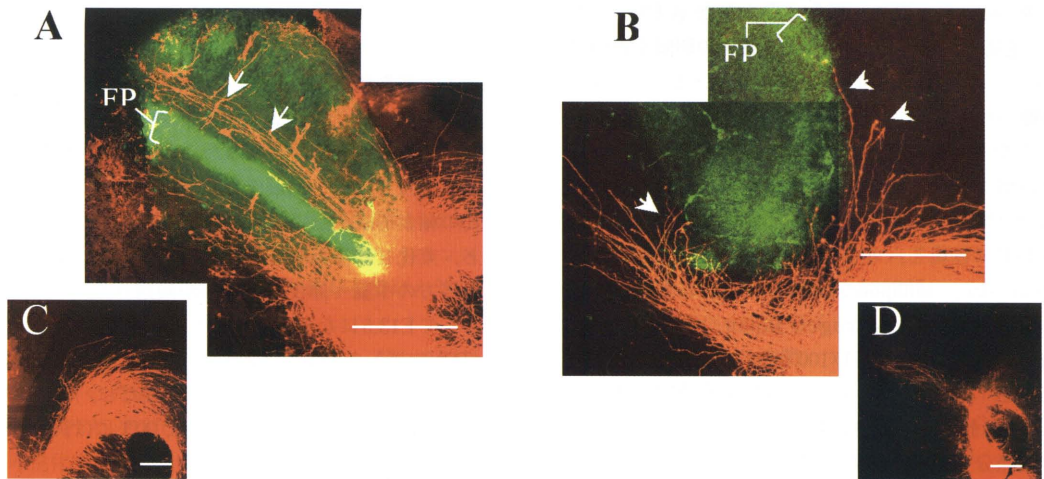


Fig. 1. Aberrant pathfindings of mammillary axons in embryos of Sey mice.

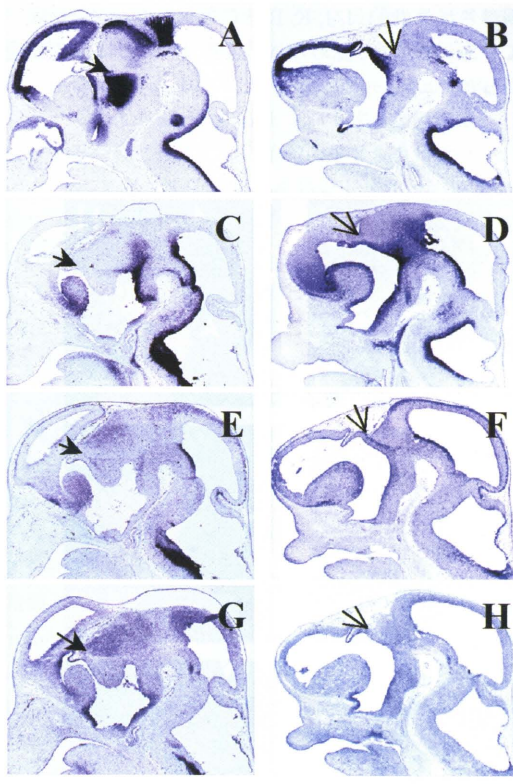
Mammillary axonal pathfindings were examined by confocal microscopy with brain preparations from E11.5 (A, B, G, H), E12.5 (C, D, I, J), and E13.5 (E, F, K, L) embryos of wild-type (A-F) and Sey (G-L) mice. DiI-labeled mammillary axons are seen white in black-and-white panels or red in color panels. Panels B, D, F, H, J and L are magnified views of the squares indicated in panels A, C, E, G, I and K, respectively. Aberrant neuronal fibers observed in the mutant are indicated with arrowheads in H, J and L. The dashed lines show the position of zona limitans intrathalamica. DT, dorsal thalamus; M, mesencephalon. Original magnification is  $\times 20$  (A, C, E, G, I, K),  $\times 100$  (B, D, F, H, J, L). Scale bars mean 500  $\mu$  m (black) and 200  $\mu$  m (white). Data from one experiment of four with similar results are presented.





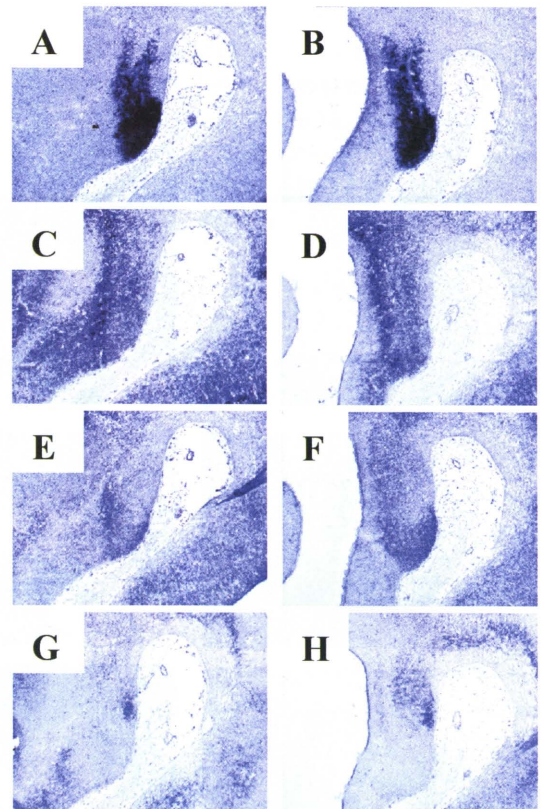
**Fig. 2. Correct pathfindings of mammillary axons of Sey mice co-cultured with spinal cord of wild-type mice.**

Mammillary axonal pathfinding was examined by confocal microscopy with brain preparations from E12.5 embryos of wild-type (A) and Sey (B) mice that had been co-cultured with spinal cord explant (seen in green) containing floor plate (FP) of GFP-transgenic wild-type mice. Panels C and D show the results without co-culture as control for A and B, respectively. The arrows indicate growing mammillary axons (seen in red), whose guidance was seemingly corrected during co-culture. Original magnifications are  $\times 200$  (A, B) and  $\times 100$  (C, D). Scale bars mean  $200 \mu\text{m}$ . Data from one experiment of 10 (wild type) and 12 (Sey) with similar results are presented.



**Fig. 3. Aberrant mRNA expression of axonal guidance molecules in embryonic brain of Sey mice.**

Distribution of mRNA of Netrin-1 (C, D), Slit1 (E, F), and Slit2 (G, H) was determined by in situ hybridization with sections prepared from E12.5 embryonic brains of wild-type (A, C, E, G) and Sey (B, D, F, H) mice. Pax6 mRNA was similarly analyzed as control to locate ventral thalamus and edge of dorsal thalamus (A, B). Positive signals are seen in dark blue. The arrows indicate the position of zona limitans intrathalamica. Original magnification is  $\times 40$ . Scale bar means  $1\text{mm}$ . Data from one experiment of three (wild type) and 10 (Sey) with similar results are presented.



**Fig. 4. Correct mRNA expression of guidance receptors in embryonic brain of Sey mice.**

Distribution of mRNA of DCC (C, D), Robo1 (E, F), and Robo2 (G, H) in mammillary bodies was determined by in situ hybridization with sections prepared from E12.5 embryonic brains of wild-type (A, C, E, G) and Sey (B, D, F, H) mice. Foxb1 mRNA was similarly analyzed as control to locate mammillary bodies (A, B). Positive signals are seen in dark blue. Original magnification is  $\times 100$ . Scale bar means  $200 \mu\text{m}$ . Data from one experiment of three (wild type) and eight (Sey) with similar results are presented.



III. 乳頭体軸索のガイダンス分子への応答性

Seyで観察された軸索の走行異常は、ガイダンス分子の発現異常に起因すると仮定した。これを検証するために、E12.5で摘出したSey胚脳を正常なガイダンス分子を分泌する基板を含む脊髄組織片と共培養させて軸索走行を調べた。その結果、コントロールとして用いた正常胚脳で観察される基板に沿った乳頭体軸索走行(図2. A)が、正常脊髄組織片との共培養によりSey胚脳でも起こるようになった(図2. B)。このことは、Sey胚脳の乳頭体軸索がガイダンス分子に対する反応性は正常であることを示し、軸索走行異常はガイダンス分子の発現異常に由来するという仮定が支持された。

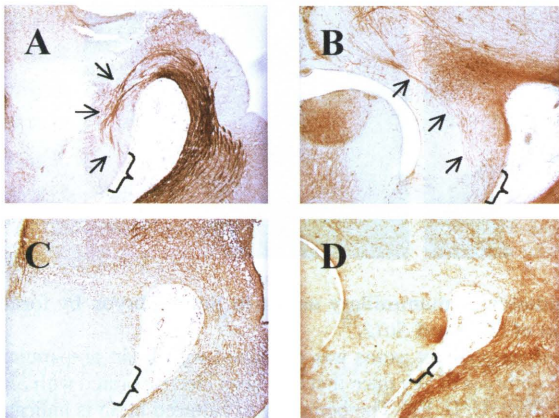


Fig. 5. Correct expression of Robo proteins in mammillary axons of Sey mice.

Protein expression of Robo1 (A, B) and Robo2 (C, D) in mammillary axons was examined by immunohistochemistry with sections prepared from E12.5 embryos of wild-type (A, C) and Sey (B, D) mice. Positive signals are shown in brown. The arrows in panels A and B indicate Robo1-positive mammillary fibers, and the brackets in panel C and D indicate mammillary bodies. Original magnification is  $\times 100$ . Scale bar means  $200 \mu\text{m}$ . Data from one experiment of five (Robo1 with wild-type mice), three (Robo2 with wild-type mice), six (Robo1 with Sey mice), and four (Robo2 with Sey mice) with similar results are presented.

IV. ガイダンス分子の発現比較

そこで次に、Sey胚脳におけるガイダンス分子の発現の有無を調べた。そのために、E12.5の脳において基板から分泌される既知のガイダンス分子<sup>10), 27)~32)</sup>であるNetrinとSlitの発現を*in situ*ハイブリダイゼーションで調べた。また同時に、それらのレセプターであるDCCとRoboについても解析した。解剖学的コントロールとしてPax6(図3. A, B)とFoxb1(図4. A, B)のmRNAを検出し、それぞれDTと乳頭体<sup>33) 34)</sup>の位置とした。

1. Netrin-1 mRNAの発現比較

野生型でのNetrin-1のmRNAは、腹側正中の基板に平行するとともに、ZLIの一部に発現し(図3. C)、DTには存在しなかった。一方、Seyでは基板に平行した発現は野生型と同様であったが、その発現はDTにも広がっており、発現部位が異常になっていることが分かった(図3. D)。

2. Slit mRNAの発現

野生型では、Slit1, Slit2のmRNAとも程度は低いものの、間脳では主にDTに発現していた(図3. E, G)。それに対しSeyではDT予定域にシグナルは検出されず、発現レベルが低下していることが分かった(図3. F, H)。

3. 乳頭体でのレセプター分子の発現

Seyマウス胚でのガイダンス分子に対する反応性が正常であることを裏付けるため、乳頭体でのレセプターの発現を調べた。

NetrinレセプターであるDCC mRNAの発現は、レベルと部位ともに野生型とSeyとで同等であった(図4. C, D)。また、SlitレセプターであるRobo1(図4. E, F)とRobo2(図4. G, H)とも、野生型とSeyとで差は認められなかった(図4. E, F)。Roboタンパク質の発現を免疫組織化学で調べると、やはり野生型とSeyとで同一であった。すなわち、E12.5胚脳の乳頭体軸索上にはRobo1の発現が認められたが、Robo2は乳頭体上核に発現しており乳頭体軸索上には存在しなかった(図5. A, B, C, D)。これらの結果はNetrinレセプターとSlitレセプターともSeyマウス胚における発現は正常であることを示し、機能的解析の結果と一致した。

V. ガイダンス分子の遺伝子導入

Sey胚脳でNetrinとSlitの発現異常が認められたので、乳頭体軸索の走行異常がこれらガイダンス分子の発現異常に起因す

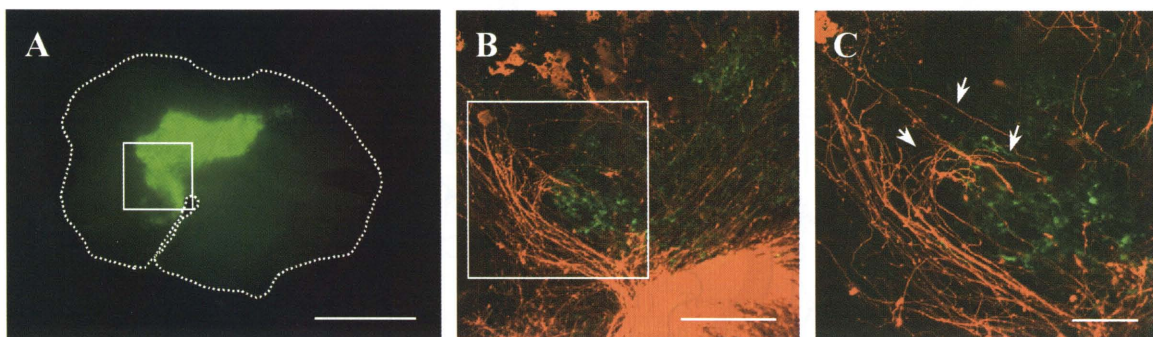


Fig. 6. Guidance of mammillary axons in brains of Sey mouse embryos by forced expression of Netrin-1.

Guidance of mammillary axons was examined with brain preparations from E12.5 embryos of Sey mice that had been electroporated with *Netrin-1*. The boundary of cultured brain is indicated with dashed line in panel A, and the area with ectopic expression of *Netrin-1* is seen in green due to co-expression of GFP (A, B, C). DiI-labeled mammillary axons are stained red (B, C). Panel B is a magnified view of a portion of panel A, and panel C is a magnified view of the squared area in panel B. The arrows in panel C indicate mammillary axons whose guidance was seemingly corrected by the expressed *Netrin-1*. Original magnifications are  $\times 20$  (A),  $\times 100$  (B), and  $\times 200$  (C). Scale bars mean 1 mm (A),  $500 \mu\text{m}$  (B), and  $200 \mu\text{m}$  (C). The data are representative of four independent experiments that showed similar results.



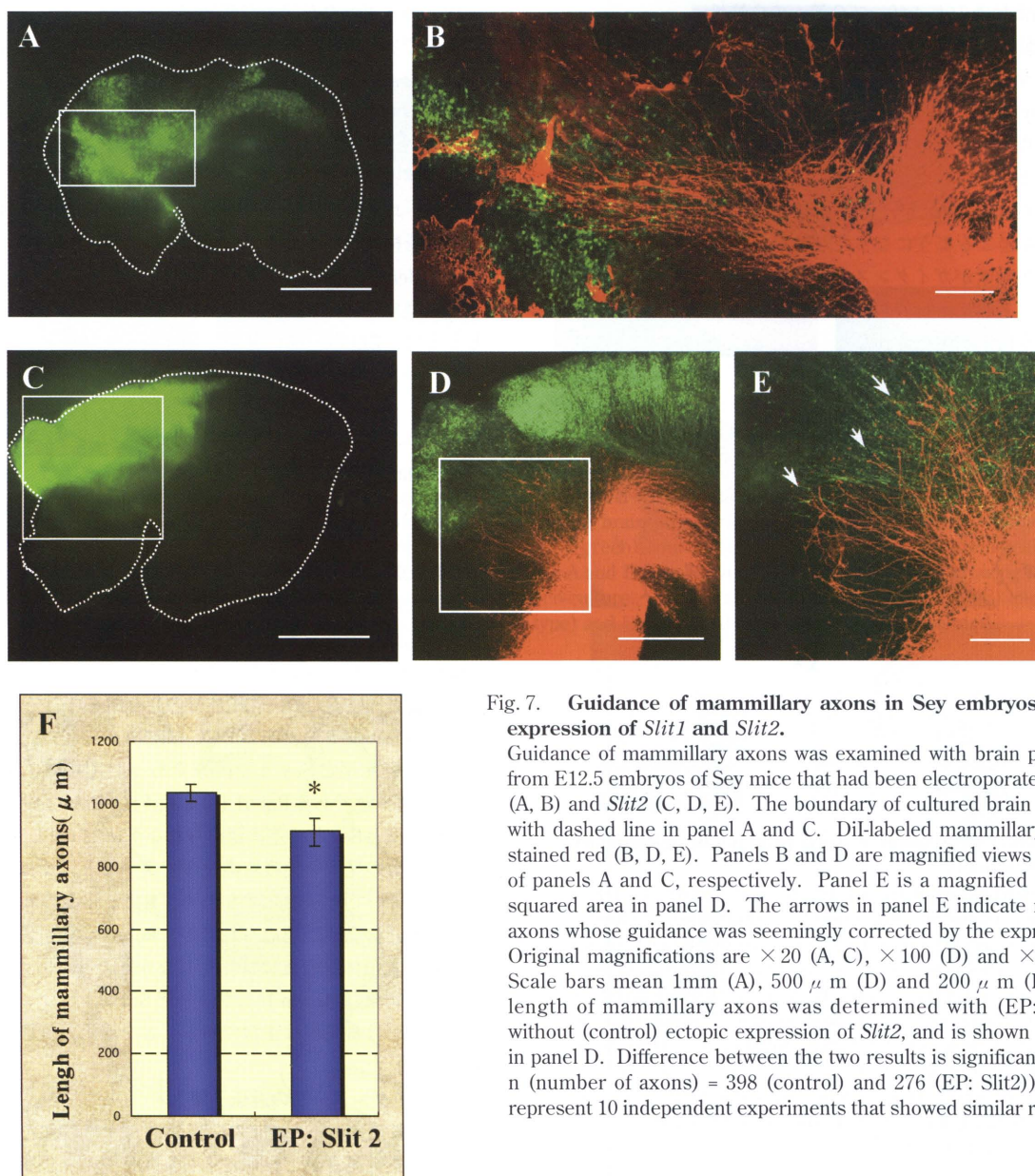


Fig. 7. Guidance of mammillary axons in Sey embryos by forced expression of *Slit1* and *Slit2*.

Guidance of mammillary axons was examined with brain preparations from E12.5 embryos of Sey mice that had been electroporated with *Slit1* (A, B) and *Slit2* (C, D, E). The boundary of cultured brain is indicated with dashed line in panel A and C. Dil-labeled mammillary axons are stained red (B, D, E). Panels B and D are magnified views of a portion of panels A and C, respectively. Panel E is a magnified view of the squared area in panel D. The arrows in panel E indicate mammillary axons whose guidance was seemingly corrected by the expressed *Slit2*. Original magnifications are  $\times 20$  (A, C),  $\times 100$  (D) and  $\times 200$  (B, E). Scale bars mean 1mm (A),  $500\ \mu\text{m}$  (D) and  $200\ \mu\text{m}$  (B, E). The length of mammillary axons was determined with (EP: *Slit2*) and without (control) ectopic expression of *Slit2*, and is shown as  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  in panel D. Difference between the two results is significant (\*,  $p < 0.05$ ; n (number of axons) = 398 (control) and 276 (EP: *Slit2*)). The data represent 10 independent experiments that showed similar results.

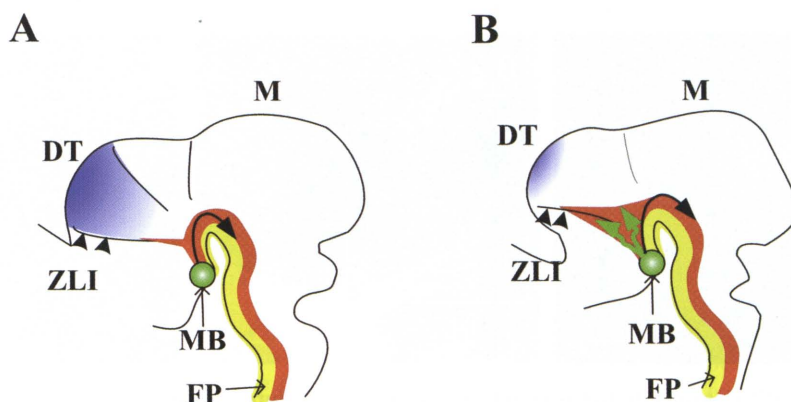


Fig. 8. Proposed mechanism of the regulation of mammillary axon guidance by Netrin-1 and *Slit2*.

In embryonic brain of wild-type mice (A), Netrin-1 (red) is expressed mostly along floor plate (FP, yellow) and to some extent in zona limitans intrathalamica (ZLI), and *Slit2* (blue) is widely distributed in dorsal thalamus (DT). In Sey mice (B), Netrin-1 expression is expanded to DT, and *Slit2* expression is weakened in DT. As a result, axons are aberrantly guided from mammillary body (MB) (shown in green). The arrowheads indicate ZLI, and the term M shows mesencephalon.

るか否かを追求することにした。そのために、Sey胚脳のDT領域でそれぞれを強制発現させて軸索走行への影響を調べた。

#### 1. Netrin-1の発現

ニワトリアクチン遺伝子のプロモーター支配下にNetrin-1を発現するベクターを、GFPを発現させるベクターとともに、E12.5 Sey胚脳の異所的に走行する乳頭体軸索近傍に導入した(図6. A)。その結果、DT領域に向かって異常走行していた軸索が、正常の向きに引き戻されることが分かった(図6. B, C)。この結果は、Netrin-1が乳頭体軸索を正しい方向へ誘引する作用を有することを示す。

#### 2. Slit遺伝子の導入

次に、Slit1およびSlit2発現ベクターを発現が見られなかったSey間脳DT領域へ導入した。その結果、Slit1の強制発現では軸索走行は影響されなかったが(図7. A, B)、Slit2の強制発現では、異常走行した軸索がSlit2遺伝子導入部位で伸長を停止した像が観察された(図7. C, D, E)。そこで、遺伝子導入の有無で軸索の長さを統計処理し比較したところ、導入群では軸索が有意に短くなっていることが分かった( $p < 0.05$ ) (図7. F)。これらの結果は、Slit2が軸索伸長阻害作用を有している事実<sup>16) 17)</sup>と符合し、このガイダンス分子が乳頭体の軸索走行を規定する役割を担うことを示す。

### 考 察

脳の高次機能は、緻密に張り巡らされた神経回路網によって支えられている。神経回路の形成には、胚発生の過程で軸索がガイダンスを受けて正しい標的まで導かれ、シナプスを形成することが重要である。ガイダンス機構が異常になると正しいシナプスは形成されず、軸索を伸ばしたニューロンは死滅して回路は形成されなくなる。回路形成は脳が正常に機能するために必須であり、軸索のガイダンス機構を知ることは脳の機能を理解する上で最も重要である。また、乳頭体は記憶の回路「Papezの回路」上にある重要な中継核であり、乳頭体の回路形成機構の解明は、記憶の実体を知る上でも意義がある。

Ververdeら<sup>20)</sup>は、C57/BL6系統の遺伝的背景を持つPax6変異体Sey<sup>neu</sup>での乳頭体視床路の欠損を報告した。本研究では、FVB系統の遺伝的背景を持つSeyを使って、その異常の原因を軸索ガイダンスの観点から調べた。その結果、彼らと同様の欠損を確認した上で、さらに神経発生の早い時期で乳頭体軸索の異常を見つけた。そして、Seyでの異所的軸索は乳頭体側のレセプターには問題がなく、視床側のガイダンス分子Netrin-1とSlit2の発現異常に起因していることを明らかにした。以上の結果を模式図に示す(図8)。野生型でのNetrin-1の発現は腹側正中の底板に沿うとともにZLIの一部にみられるが、SeyではDT領域へとその発現を広げていた。また、野生型ではDTに広く発現するSlit1、Slit2が、Seyではよりせまい領域でしか発現していなかった。つまり、Seyにおいては、誘引作用をもつNetrin-1の発現領域の異所的拡大と伸長阻害作用を持つSlit2のDTでの発現低下により、乳頭体軸索が本来入るべきでない領域に侵入していったのではないかと考えられる。発生に従ってNetrinによってある範囲の領域を伸長する軸索が、標的となる視床前核がDTの中で形成されるまではSlitによって侵入が抑えられるという仕組みがあるのかもしれない。Pax6はDTの領域を特異化する遺伝子を制御することも知られている<sup>35) 36)</sup>。SeyでDTの形成過程に異常があるとすれば、乳頭体軸索の標

的となる視床前核そのものが形成されないのかもしれない。Seyの脳ではNetrinとSlitというガイダンス分子の発現異常によって誤った時期に誤った方向へ伸びてしまった軸索は、目標を見失い、正しい標的に辿り着くことができずに消えていってしまうのであろう。これまでは、Seyでは乳頭体視床路が無いと言われていたが、始めから無かったのではなく正しくガイダンスされなかったために消失したと考えられる。

これまでにPax6変異体での軸索走行の異常は数多く報告されている<sup>37)~42)</sup>。Pax6がガイダンス分子を制御している可能性については指摘されてきたが<sup>40)~42)</sup>、軸索への直接の影響を確かめたものは例がない。本研究では、乳頭体視床路が正しく形成されるにはNetrin-1とSlit2が必要であることが明らかにされた。しかし、これらのガイダンス分子がどのようにPax6の制御を受けているのか、まだまだ解明すべき点も多い。また、最近の研究では、正中を交差するニューロンにおいてSlitのレセプターであるRoboが、NetrinレセプターであるDCCと複合体を形成し、Netrinの持つ誘引効果を打ち消すこともわかってきた<sup>43) 44)</sup>。乳頭体軸索の回路形成に関わる分子の同定とともに、ガイダンス分子とレセプターの組み合わせによる、より複雑なガイダンス機構を解明することが今後の課題である。

### 結 論

Pax6変異体マウスSeyをモデルとして乳頭体視床路の欠損について検討し、以下の結果を得た。

1. Seyでは、初期発生段階で乳頭体軸索の異所的走行がある。
2. Seyの乳頭体は底板に存在するガイダンス分子に正常に反応する。
3. SeyのDTでは、Netrinの異所的発現とSlitの発現低下が起こる。
4. 乳頭体でのガイダンスにおいて、Netrin-1が誘引、Slit2が伸長阻害の効果を示す。

以上の結果より、正常な乳頭体視床路の形成には、ガイダンス分子Netrin-1とSlit2の正しい時間的・空間的発現が必要であると結論された。

### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、後校閲を賜りました金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻生体防御応答学分野 中西義信教授に深甚なる感謝の意を表します。また本研究の遂行にあたり、直接御指導御協力頂きました三菱化学生命科学研究所神経回路形成グループ高橋浩士リーダーに深甚なる謝意を表します。

なお、本研究の一部は第26回日本分子生物学会年会(2003年、神戸)において発表した。

### 文 献

- 1) Tessier-Lavigne M, Placzek M, Lumsden AGS, Dodd J, Jessell TM. Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature* 336: 775-778, 1988
- 2) Tessier-Lavigne M, Goodman CS. The molecular biology of axon guidance. *Science* 274: 1123-1133, 1996
- 3) Dickson BJ. Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298: 1959-1964, 2002
- 4) Nakagawa Y, O'Leary DDM. Combinatorial expression



- patterns of LIM-homeodomain and other regulatory genes parcellate developing thalamus. *J Neurosci* 21 : 2711-2725, 2001
- 5) Shirasaki R, Pfaff SL. Transcriptional codes and the control of neuronal identity. *Annu Rev Neurosci* 25: 251-258, 2002
  - 6) Schubert FR, Lumsden A. Transcriptional control of early tract formation in the embryonic chick midbrain. *Development* 132: 1785-1793, 2005
  - 7) Oppenheim RW. The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death. *Trends Neurosci* 12: 252-255, 1989
  - 8) Oppenheim RW, Prevette D, Yin QW, Collins F, MacDonald J. Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor. *Science* 251: 1616-1618, 1991
  - 9) Serafini T, Kennedy TE, Gallo MJ, Mizayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78: 409-424, 1994
  - 10) Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87: 1001-1014, 1996
  - 11) Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SSY, Culotti JG, Tessier-Lavigne M. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87: 175-185, 1996
  - 12) Nakamura F, Kalb RG, Strittmatter SM. Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance. *J Neurobiol* 44: 219-229, 2000
  - 13) Fujisawa H. Discovery of semaphorin receptors, neuropilin and plexin, and their functions in neural development. *J Neurobiol* 59: 24-33, 2004
  - 14) Flanagan JG, Vanderhaeghen P. The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* 21: 309-345, 1998
  - 15) O'Leary DD, Wilkinson DG. Eph receptors and ephrins in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 9: 65-73, 1999
  - 16) Kidd T, Bland KS, Goodman CS. Slit is the midline repellent for the Robo receptor in drosophila. *Cell* 96: 785-794, 1999
  - 17) Brose K, Bland KS, Wang KH, Arnott D, Henzel W, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Kidd T. Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 96: 795-806, 1999
  - 18) Brose K, Tessier-Lavigne M. Slit proteins: Key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. *Curr Opin Neurobiol* 10: 95-102, 2000
  - 19) Martinez S, Puelles L. Neurogenetic Compartments of the mouse diencephalons and some characteristic gene expression patterns. *Results Probl Cell Differ* 30: 91-106, 2000
  - 20) Valverde F, Garcia C, Lopez-Mascaraque L, Carlos JA. Development of the mammillothalamic tract in normal and *Pax-6* mutant mice. *J Comp Neurol* 419: 485-504, 2000
  - 21) Roberts RC. Small eyes - a new dominant eye mutant in the mouse. *Genet Res Camp* 9: 121-122, 1967
  - 22) Hogan BL, Horsburgh G, Cohen J, Hetherington CM, Fischer G, Lyon MF. Small eye (Sey) : a homozygous lethal mutation on chromosome 2 which affects the differentiation of both lens and nasal placodes in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 97: 95-110, 1986
  - 23) Hill RE, Favor J, Hogan BL, Ton CC, Saunders GF, Hanson IM, Prosser J, Jordan T, Hastie ND, van Heyningen V. Mouse small eye result from mutations in paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354: 522-525, 1991
  - 24) Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407: 313-319, 1997
  - 25) Saito T, Nakatsuji N. Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using *in vivo* electroporation. *Develop Biol* 240: 237-246, 2001
  - 26) Mastick GS, Easter SS. Initial organization of neurons and tracts in the embryonic mouse fore- and midbrain. *Devlop Biol* 173: 79-94, 1996
  - 27) Kennedy TE, Serafini T, Torre JR, Tessier-Lavigne M. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78: 425-435, 1994
  - 28) Tamada A, Shirasaki R, Murakami F. Floor plate chemoattracts crossed axons and chemorepels uncrossed axons in the vertebrate brain. *Neuron* 14: 1083-1093, 1995
  - 29) Shirasaki R, Tamada A, Katsumata R, Murakami F. Guidance of cerebellofugal axons in the rat embryo: Directed growth toward the floor plate and subsequent elongation along the longitudinal axis. *Neuron* 14: 961-972, 1995
  - 30) Shirasaki R, Mizayan C, Tessier-Lavigne M, Murakami F. Guidance of circumferentially growing axons by netrin-dependent and -Independent floor plate chemotropism in the vertebrate brain. *Neuron* 17: 1079-1088, 1996
  - 31) Murakami F, Shirasaki R. Guidance of circumferentially growing axons by the floor plate in the vertebrate central nervous system. *Cell Tissue Res* 290: 323-330, 1997
  - 32) Shirasaki R, Katsumata R, Murakami F. Change in chemoattractant responsiveness of developing axons at an intermediate target. *Science* 279: 105-107, 1998
  - 33) Labosky PA, Winnier GE, Jetton TL, Hargett L, Ryan AK, Rosenfeld MG, Parlow AF, Hogan BL. The winged helix gene, *Mf3*, is required for normal development of the diencephalon and midbrain, postnatal growth and the milk-ejection reflex. *Development* 124: 1263-1274, 1997
  - 34) Daubas P, Tajbakhsh S, Hadchouel J, Primig M, Buckingham M. Myf5 is a novel early axonal marker in the mouse brain and is subjected to post-transcriptional regulation in neurons. *Development* 127: 319-331, 2000
  - 35) Warren N, Price DJ. Roles of *pax6* in murine diencephalic development. *Development* 124: 1573-1582, 1997
  - 36) Mastick GS, Andrews GL. Pax6 regulates the identity of embryonic diencephalic neurons. *Mol Cell Neurosci* 17: 190-207, 2001
  - 37) Mastick GS, Davis NM, Andrews GL, Easter SS. Pax-6 functions in boundary formation and axon guidance in the embryonic mouse forebrain. *Development* 124: 1985-1997, 1997

- 38) Kawano H, Fukuda T, Kubo K, Horie M, Uyemura K, Takeuchi K, Osumi N, Eto K, Kawamura K. Pax-6 is required for thalamocortical pathway formation in fetal rats. *J Comp Neurol* 408: 147-160, 1999
- 39) Pratt T, Vitalis T, Warren N, Edgar JM, Mason JO, Price DJ. A role for *Pax6* in the normal development of dorsal thalamus and its cortical connections. *Development* 127: 5167-5178, 2000
- 40) Vitalis T, Cases O, Engelkamp D, Verney C, Price DJ. Defects of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons the brains of mice lacking the transcription factor Pax6. *J Neurosci* 20: 6501-6516, 2000
- 41) Pratt T, Quinn JC, Simpson TI, West JD, Mason JO, Price DJ. Disruption of early events in thalamocortical tract formation in mice lacking the transcription factors Pax6 or Foxg1. *J Neurosci* 22: 8523-8531, 2002
- 42) Jones L, Lopez-Bendito G, Gruss P, Stoykova A, Molnar Z. *Pax6* is required for the normal development of the forebrain axonal connections. *Development* 129: 5401-5052, 2002
- 43) Stein E, Tessier-Lavigne M. Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by Slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* 291: 1928-1938, 2001
- 44) Dickson BJ. Developmental neuroscience: Moving on. *Science* 291: 1910-1911, 2001



**Involvement of Netrin-1 and Slit2 in mammillary tract formation in mouse brain** Reiko Tsuchiya, Division of Molecular and Cellular Biochemistry, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-1192 – J. Juzen Med Soc., 114, 69 – 78 (2005)

**Key words** axon guidance, Netrin, Slit, mammillary body, Sey

**Abstract**

The establishment of neuronal connections during embryonic development requires the correct axonal guidance. Previous studies have demonstrated that chemoattraction and chemorepulsion play key roles in axonal guidance. In this study, the mechanism of mammillo-thalamic tract formation was examined as a model system for axonal guidance. *Pax6* is one of the earliest regulatory genes expressed in the developing nervous system, and is required for the formation of a normal embryonic diencephalons and axonal pathfinding of various neuronal populations. Mammillo-thalamic tract is “absent” in mice lacking functional *Pax6*, and a hypothesis is made that this defect is due to incorrect guidance. To examine this possibility, the expression of axon guidance molecules in diencephalons was compared between wild-type and the mutant embryos. We found ectopic expression of Netrin-1 and decreased expression of Slit1 and Slit2 in the presumptive dorsal thalamus of the mutant mice. Moreover, when these guidance molecules were forcedly expressed in dorsal thalamus of the mutant mice, Netrin-1 showed an attractive effect on the mammillary axons, and Slit2 inhibited mammillary axon’s elongation. These results suggest that Netrin and Slit are cooperatively involved in proper axonal projection from the mammillary body.