

胎生期マウスの脳室帯の細胞接着損傷が大脳皮質形成へ与える影響

長島 史明

川崎医科大学解剖学, 〒701-0192 倉敷市松島577

抄録 哺乳類の大脳皮質は6層構造を形成するが、特に胎生期および新生直後に層形成が盛んに進むことが知られている。胎生期の脳室に面する脳室帯において、神経幹細胞は神経前駆細胞を経て神経細胞へ分化し、さらに神経細胞が脳表層方向に移動することで6層構造が形成される (inside-out)。このことから、胎生期の脳室帯は脳の形成に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究は、大脳皮質の形成メカニズムの解析を目的とし、脳室帯の組織構造に変化を与えた場合に、どのように脳形成システムに異常を来すのか、検討を行った。

脳室帯は上皮組織のため、細胞間結合が強固である。そこで、上皮細胞間のカルシウム (Ca^{2+}) 依存性接着分子であるカドヘリンに着目し、脳室面の細胞間結合の阻害が脳形成に与える影響を観察した。実験手法として、マウス胎生14.5日目の脳室内へ、 Ca^{2+} を特異的にキレートする EGTA (Ethylene glycol tetraacetic acid) を注入したのち、胎生期および生後の脳組織構造について詳細な解析を行った。

解析の結果、高濃度の EGTA の作用により、一部のマウスは脳浮腫をきたした。また脳室の拡大および大脳皮質の菲薄化も認めた。

さらに、大脳皮質各層のマーカーである SATB2 (2/3層)、Ctip2 (5層) を用いた解析から、脳室帯の細胞間接着構造の破壊により、それ以降の神経細胞の新生は減少するが、層構造の inside-out の法則は維持されていることが分かった。これらのことより、脳室帯構造および脳室帯での神経新生が、inside-out の原理に関与している可能性は低いことがわかった。

(平成25年7月23日受理)

キーワード：神経上皮組織、神経発生、脳発生、大脳皮質

緒言

哺乳類の大脳皮質は、胎生期に神経幹細胞から神経前駆細胞を経て神経細胞へ分化することにより、層構築が盛んに進み、最終的に6層構造 (I ~ VI 層) を形成することが知られている¹⁻³⁾。それにより、形態的、機能的に異なる構造を示し、各層を構成する神経細胞が脳の様々な領域へ軸索を伸ばして神経のネットワークを構築している。この神経細胞の産生は脳室帯とよばれ

る部分を中心に行われており、産生された神経細胞は、軟膜方向 (外方向) へと移動することにより、新しい細胞は外側へと移動し層が形成され、大脳皮質が形成される (inside-out 法則)⁴⁾。

大脳皮質形成メカニズムの解析のために、神経前駆細胞の分化、発生の過程を理解することは非常に重要なことである。神経前駆細胞として、Radial glia (放射状グリア)、intermediate progenitors (中間前駆細胞)、そし

て outer subventricular zone progenitors の3種類が報告されている^{5,6)}。現在それら神経前駆細胞の様々な解析が行われているが、それらの細胞が、分化の過程で外因性の影響を受けているのか、もしくは内因性の影響を受けて分化していくのかの研究は、いまだに解明が不十分である。外因性、内因性の影響を受けているかを切り分けて解析するための手法として異所的細胞移植 (transplantation) がある。しかしこれまでの transplantation は移植された細胞の取り込み効率が悪く、手法として不十分なものである^{7,8)}。そこで我々は、transplantation の取り込み効率を上昇させる手法を確立するという大きな課題に取り組んできた。移植の取り込み効率に関しては、現在投稿中の論文⁹⁾にて確立された。取り込み効率を上げる過程で我々は、細胞間の解離を起こさせるために、細胞間の接着分子である Ca^{2+} 依存性のカドヘリンに着目し、 Ca^{2+} キレート剤である EGTA (Ethylene glycol tetraacetic acid) を用いて脳室面の細胞間結合を解離させることにより、移植細胞の脳組織への取り込み効率が上昇することを見出した。しかし、EGTA の作用による脳室面への影響を検討していくと、その濃度上昇に伴い EGTA 30 mM で脳の形成異常 (脳浮腫) を示すものが認められた。そこで、異常を来たした脳の詳細な検討を行い、脳組織の層形成において、どのような異常が起きているのかについての形態学的解析を行う目的で本研究は進められた。

材料と方法

動物

本研究は、川崎医科大学動物実験委員会の承認番号 (No. 10-084, 11-046, 12-085) を受けている。マウスは妊娠 ICR マウス14.5日目 (E14.5) を使用した。また解析は、E14.5で処置したマウスの出産後10日目 (P10) 新生児マウスを用いて解析した。

EGTA の脳室内への注入

EGTA (SIGMA, Japan) は、PBS にて希釈し

200 mM で調整した溶液を使用した。脳室への注入溶液は、1% first green (最終濃度: 0.1%) と Cell Tracker Orange (CTO, Lonza, Japan, 最終濃度: 50 μ M) を加え、さらに作成済の EGTA を加え作成した。妊娠マウス (E14.5) は、ペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル[®], 共立製薬, 日本) (1.94 mg/1 腹) をもちいて腹腔内投与し麻酔後、腹部正中切開にて開腹し子宮を露出した (図 1 a)。その露出した子宮内の E14.5胎児脳室へ、図 1 b に示すようにガラス毛細管を用いて、各脳室に2-3 μ l/embryo の量を注入した。今回の実験では、EGTA 0 mM (コントロール) と EGTA 30 mM で調整した溶液をそれぞれ注入した。脳室内へ注入後、腹部はナイロン糸で縫合し保温させ回復をさせた。その後出産させ、出産後 (P10) マウスを氷中で処置し、断頭した頭部から脳組織を摘出した。摘出した脳は、4% paraformaldehyde (PFA) で固定 (4°C, 24時間) し、20% sucrose (0.1 M リン酸緩衝液にて希釈) を用いて置換している。

肉眼的形態観察

E14.5で注入された胎児脳は、出生後 (P10) にマウスの全身の形態を観察した。また、摘出した脳においても、各 EGTA 濃度で形態を比較し観察した。

組織学的解析

固定された脳組織は、ライカ高機能凍結ミクロトーム (Leica Microsystems, CM3050S, Germany) を用いて凍結切片 (16 μ m) を作成した。免疫学的解析¹⁰⁾として、以下の抗体を用いて解析した。脳室面の神経上皮間の actin の結合を観察するために、phalloidin (1: 250, Alexa Fluor 488 phalloidin conjugate; Invitrogen, Japan) を用いた。またニューロンのマーカーとして Tuj1 (mouse, 1: 500; Covance, Japan)、大脳皮質層構築のマーカーとして VGluT2 (Vesicular glutamate transporter 2) (rabbit, 1: 250;¹¹⁾、各層のマーカーとして SATB2 (1: 200, abcam, Japan)、Ctip2 (1: 200, abcam, Japan)^{12,13)} を用い

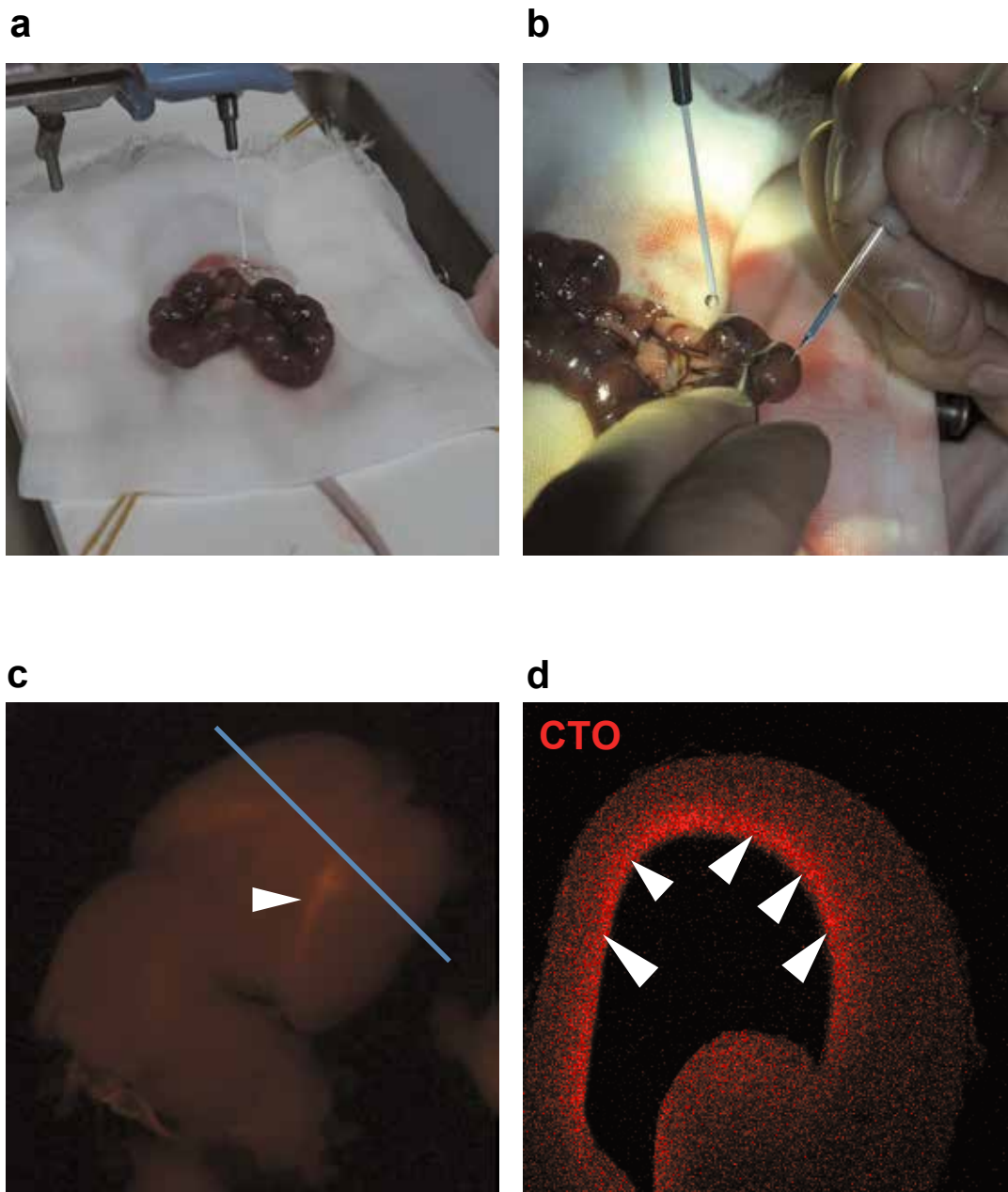


図1 マウス脳室へのEGTA溶液の注入.

a. 妊娠マウスを開腹し、子宮を露出した.

b. 露出した子宮内の胎児 (E14.5) 脳室内へ、ガラス毛细管を用いてEGTA溶液を注入している様子.

c. EGTA溶液を注入し24時間経過後、胎児脳を取り出し、蛍光実体顕微鏡にて脳室内の蛍光色素CTOを観察した (矢頭). 青線部分で冠状断切片を作成した.

d. 終脳冠状断切片. CTOにより脳室面が染色されている様子が観察できる (矢頭).

て解析した. 細胞の核は全て DAPI (1: 1000, Molecular Probes, USA) にて染色し解析した. 染色方法は, 1 次抗体においては 2 時間 (室温), 2 次抗体においては 1 時間 (室温) で反応させ, いずれも PBS で洗浄後 (5 分, 3 回), 封入し観察した. SATB2, CTIP2 においては, 抗原賦活化のため, Histo VT one (Nakarai tesque, Japan) を用いて, 90°C, 20 分賦活化後同様に染色した.

観察は, 脳室内に CTO が注入されているかを確認するために蛍光実体顕微鏡 (Olympus SZX16, Japan) を使用し, 作成した切片の染色

後の観察に蛍光顕微鏡 (Olympus, BX61, Japan) と, 共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, FV-1000, Japan) を用いて観察した.

また, 観察した切片に EGTA が作用しているかは, 図 1 c, d に示すように, 注入の際に一緒に調整している CTO が脳室面に浸潤している様子から作用していることを確認している.

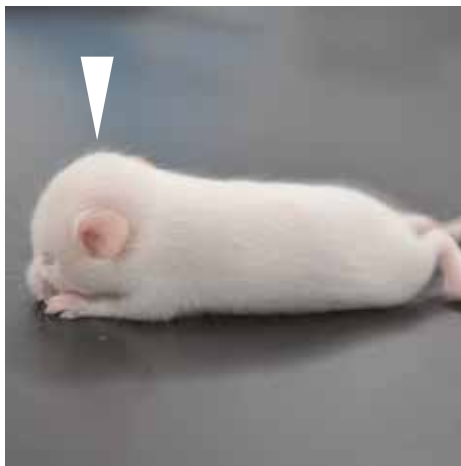
定量解析

大脳皮質の背側皮質 (dorsal cortex : 図 3 a 囲み部分) (EGTA 0 mM: n = 21 切片, EGTA 30 mM:

a EGTA 0mM P10



b EGTA 30mM P10



a'



b'



図2 出生後10日目 (P10) でのマウスの肉眼形態観察.

a, b. EGTA 0 mM (a) と 30 mM (b) の P10 の全身写真. EGTA 30 mM において頭部の形態異常 (矢頭) を認める.

a', b'. EGTA 0 mM (a') と 30 mM (b') の P10 の脳を上方より見た写真. EGTA 30 mM において脳組織が浮腫状を呈しているのが観察できる.

n = 27切片) 部分は、画像解析ソフト (Volocity Visualization, Perkin-Elmer) を用いて計測し、その後 t 検定を行った。t 検定は、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

EGTA 30 mM において脳の肉眼的形態異常を認める。

EGTA 0 mM と 30 mM の溶液を E14.5 マウス胎児脳室へ注入し、出生後 (P10) のステージで

肉眼的変化があるかを観察した。図 2 a, b に示すように、EGTA 0 mM では頭部に明らかな形態異常は認めないが、EGTA 30 mM においては、頭部の形態異常を認めるものが複数存在した。その頻度は我々の研究より、EGTA 30 mM においては約 25% の頻度で形態異常を示すことがわかっている⁹⁾。形態異常を示す頭部は、全体が拡大し浮腫状を呈していた。また脳組織そのものにどのような異常があるかを確認するために、脳組織を取り出し観察したところ、図 2 a' ,

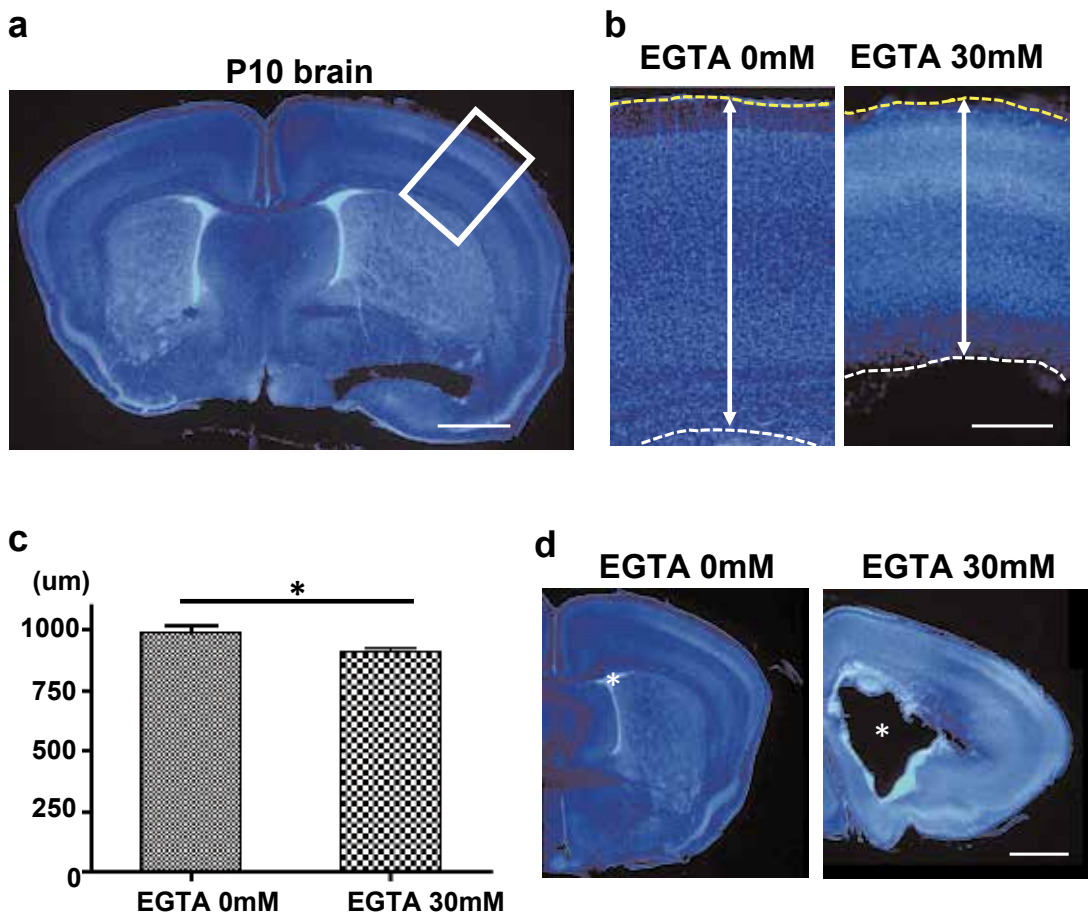


図3 出生後10日目 (P10) マウス脳組織像。

a. 正常脳組織の DAPI 染色全体像。Bar: 1 mm

b. a における囲み部分の強拡大像。両矢印は大脳皮質の厚みを示している。EGTA 0 mM と 30 mM とでは、大脳皮質の厚みに違いを認める。白点線は脳室面、黄点線は軟膜面を示している。Bar: 300 μm

c. 大脳皮質の厚みの定量解析。EGTA 0 mM においては $987.7 \pm 28.4 \mu\text{m}$ (n=21 切片)、EGTA 30 mM においては $909.8 \pm 14.9 \mu\text{m}$ (n=27 切片) であり、統計学的に有意差 ($*P < 0.05$, t-test) を認める。

d. 脳室の拡大。EGTA 0 mM と 30 mM のそれぞれの大脳半球を示している。アスタリスク (*) は側脳室を示している。EGTA 30 mM において脳室の拡大を認める。Bar: 1 mm

b' に示すように, EGTA 0 mM では脳組織自体には異常は認めなかったが, EGTA 30 mM では, 脳組織が柔らかく, また拡大し浮腫状を呈する形態異常を認めた.

肉眼的形態観察より, EGTA 30 mM において浮腫状を呈する脳は, EGTA が脳形成へ及ぼした影響が何かしらあることが考えられる.

大脳皮質の菲薄化, 脳室の拡大

肉眼的形態において, EGTA 30 mM では違いを認めるが, それら異常を呈する脳の組織にどのような変化があるのかを確認するために, 浮腫状を呈する脳組織の組織学的解析をおこなった. 最初に, 脳組織全体に違いがあるかどうかを DAPI 染色にて観察した (図 3a). その観察から, 2つの大きな違いを認めた. 第1に, 大脳皮質の層の厚みに違いがあることが観察できた. それらをより詳細に解析するため, 図 3a, b に示すように, 大脳皮質の dorsal cortex 部分の厚みをそれぞれ計測したところ, EGTA 0 mM においては $987.7 \pm 28.4 \mu\text{m}$ ($n = 21$ 切片), EGTA 30 mM においては $909.8 \pm 14.9 \mu\text{m}$ ($n = 27$ 切片) であり, 統計学的に有意差 ($*P < 0.05$, t-test.) をもって dorsal cortex の厚みに違いを認めた (図 3c). 第2に, 脳室に注目すると, EGTA 0 mM の出生後のステージでの脳室においては, 脳室の隙間は認めず脳実質で詰まっているが, EGTA 30 mM では明らかに脳室腔の拡大を認めた (図 3d).

以上より, 高濃度の EGTA の影響により脳室が拡大し, それに伴い大脳皮質が菲薄化することにより脳が浮腫を呈すると考えられる.

大脳皮質層構築の組織学的形態異常

哺乳類大脳皮質は通常6層構造を呈するが, EGTA 30 mM の脳において6層構造が保たれているのかどうかを確認するために, 組織学的解析をより詳細に進めた.

最初に, EGTA が脳室面に作用することにより, 大脳皮質の細胞間の結合に異常をもたらすかを観察した. Actin に特異的に結合する

phalloidin を用いて染色し観察をおこなった.

EGTA 0 mM では全層において, actin の密集した強固な結合を認めるが, EGTA 30 mM においては, 上層部分において actin 細胞骨格が疎な形態が観察できた (図 4a, b). また, 神経細胞層の形成に変化があるかを, ニューロンのマーカーである Tuj1 を用いて観察したところ, actin と同様に上層に疎な形成部分を認めた (図 4c, d).

上層部分に疎な構造異常を呈することは観察したが, 大脳皮質全体での層構築にはどのような変化が起きているのかを確認するために, 以下の詳細な解析を追加した. 大脳皮質の6層構造全体を観察するためのマーカーとして, VGluT2抗体を用いて観察した. この VGluT2抗体はグルタミン酸作動性ニューロンの特異的マーカーであり, シナプス終末を同定することが出来る¹¹⁾. そのため, 各層でのニューロンの分布密度の違いにより, 図 5b の様に各層を染め分けることができる. EGTA 0 mM においては図 5 に示すように, I層からVI層までを染色の濃淡により確認することができる. しかし, EGTA 30 mM においては, actin, Tuj1 と同様に上層部分の疎な構造を認め (図 5 アステリスク (*)), 層形成においても境界がはっきりせず, 層形成に異常をきたしていることが観察できた. そこで, 大脳皮質上層 (II/III) のマーカーである SATB2, 下層 (V) のマーカーである Ctip2抗体を用いて層構築への影響を観察した. Ctip2では, EGTA 0 mM, 30 mM とも同じ発現を示しているが, SATB2の発現では違いを認めた. EGTA 0 mM, 30 mM とも上層に強い発現を認めているが, EGTA 0 mM においては, 下層において発生後期に産生された SATB2 陽性細胞が広い層で発現しているのが観察できる. 一方, EGTA 30 mM においては, 下層に SATB2 陽性の細胞はほとんど認めず, 上層に局限して発現している (図 6 アステリスク (*)).

以上の解析より, 高濃度の EGTA の作用により大脳皮質の層構築に異常を来たしたことを示している.

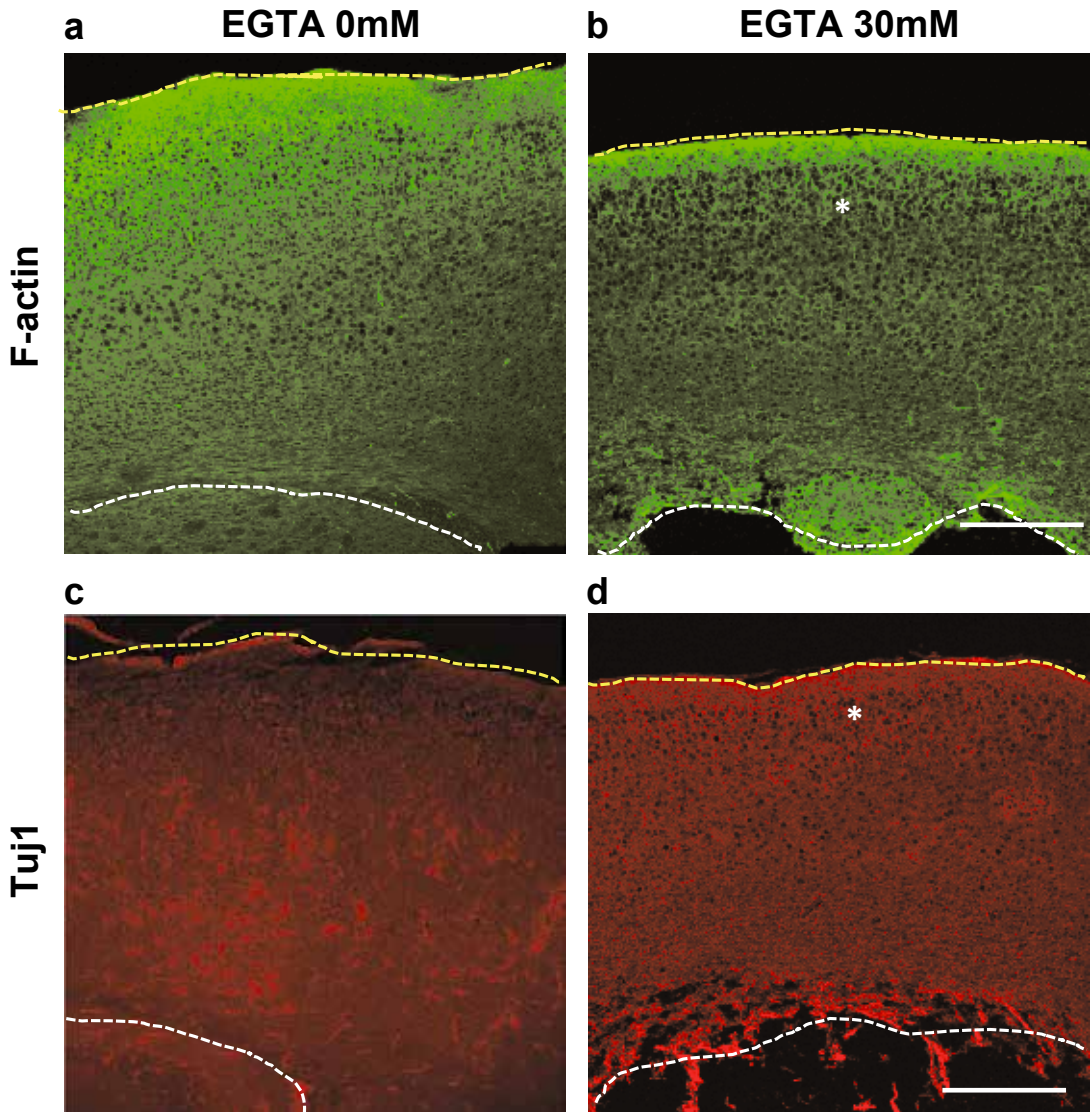


図4 大脳皮質の強拡大像。図3aの囲み部分に相当する。

a, b. Phalloidinを用いたactin染色像。EGTA 0 mMではactinの密集した強固な結合を認めるが、EGTA 30 mMでは上層部分が疎な結合(アステリスク*)を認める。

c, d. Tuj1染色像。Actinと同様にEGTA 30 mMでは0 mMと比して上層部分が疎な構築(アステリスク*)を認める。白点線は脳室面、黄点線は軟膜面を示している。Bar: 300 μ m

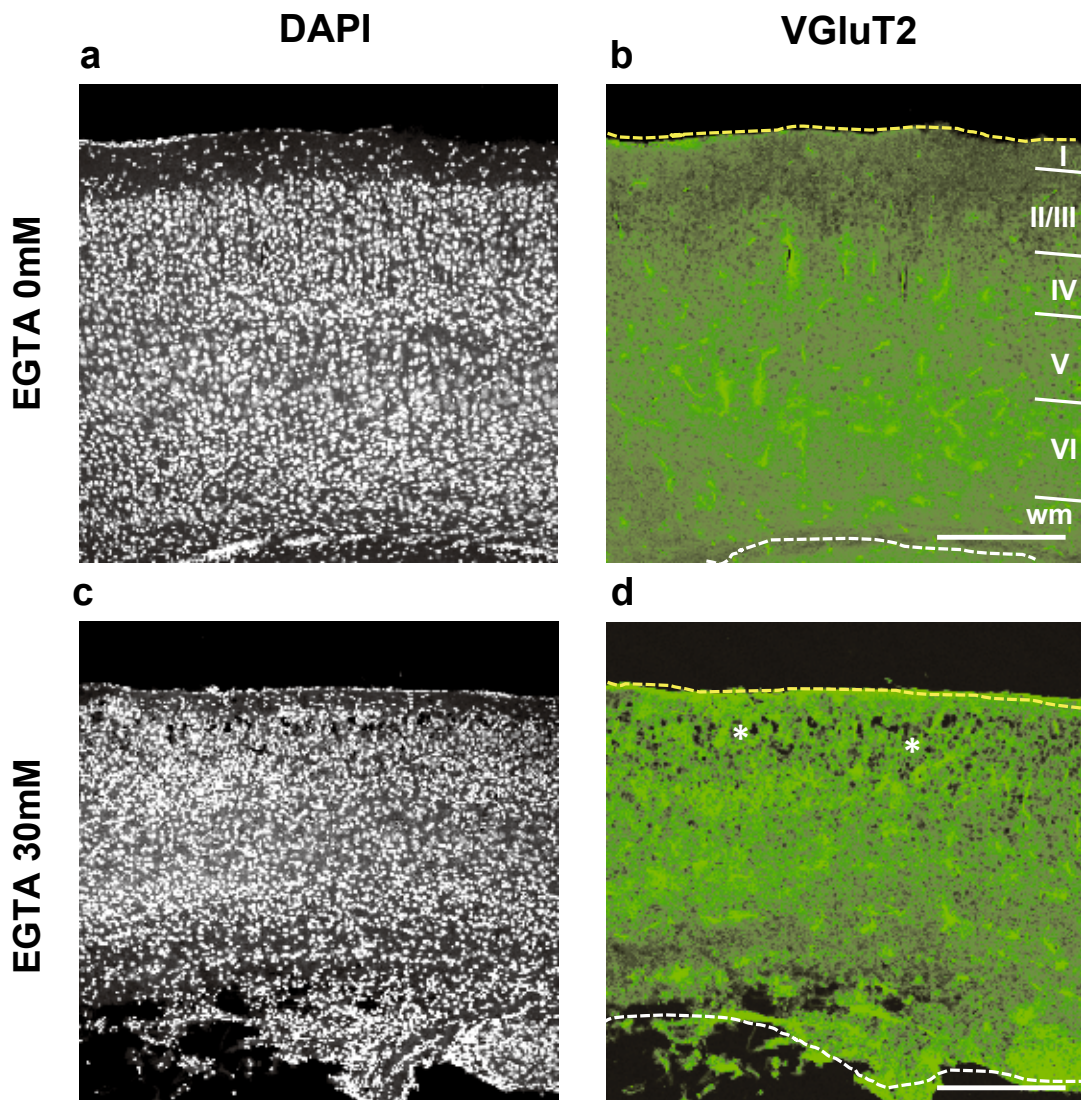


図5 大脳皮質層形成の解析。

大脳皮質層構造を VGLuT2抗体を用いた染色により判定した。

a, b. EGTA 0 mM. c, d. EGTA 30 mM.

EGTA 0 mM では、I～VI 層の染色の濃淡を確認できるが、EGTA 30 mM では層形成を確認できない。EGTA 30 mM の上層は、疎な構造を示す (アステリスク (*))。

白点線は脳室面、黄点線は軟膜面を示している。Bar: 300 μ m

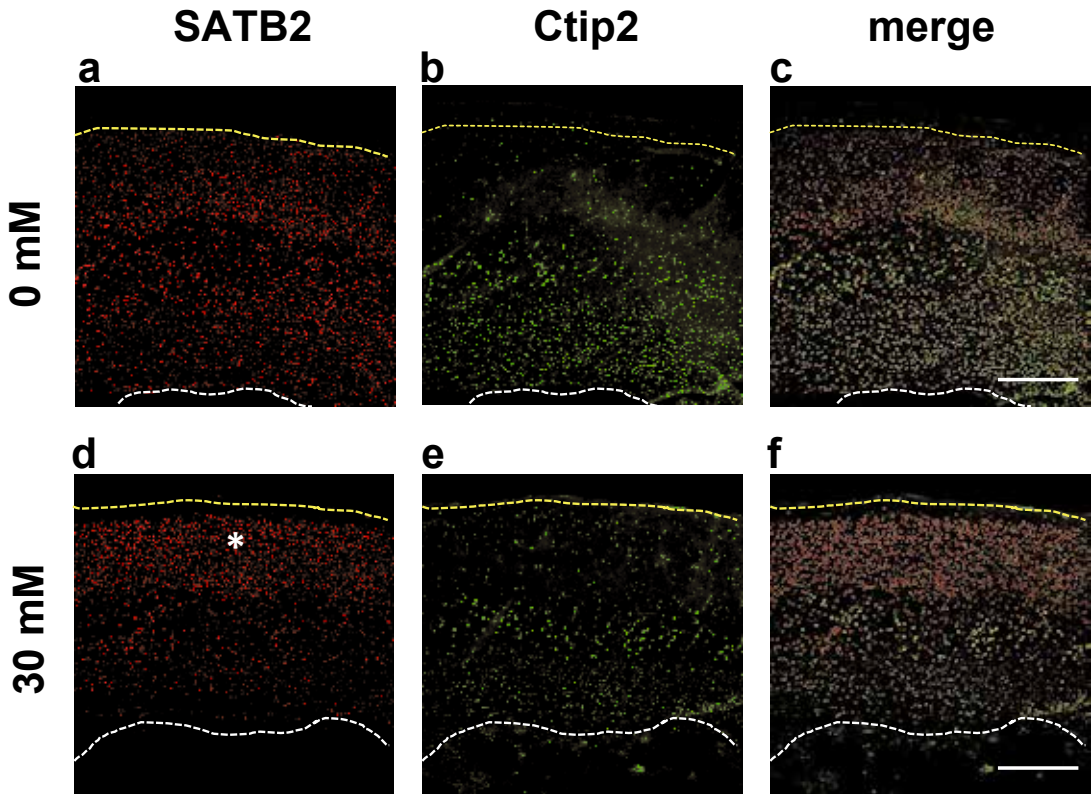


図6 大脳皮質の層マーカーを用いた解析。

a-c. EGTA 0 mM. d-f. EGTA 30 mM.

SATB2はII/III層のマーカー。CtIp2はV層のマーカー。

CtIp2陽性細胞の局在には明らかな違いは見られないが、SATB2陽性細胞の局在は、EGTA 30 mMの場合、より上層に限局して発現している（図6dアスタリスク(*)）。

白点線は脳室面，黄点線は軟膜面を示している。Bar: 300 μm

考 察

脳の形成異常には様々なものがあり、水頭症を呈する原因として多くのことが知られている。それらの原因としては、神経管閉鎖障害、脳胞形成異常、神経細胞遊走障害など多くのことがいわれているが、いずれも詳細は不明な点が多い¹⁴⁾。本研究は、EGTAが脳室面及び脳室帯に作用することにより、水頭症様の症状を呈することを示した。一般的な水頭症の組織所見としては、脳室内圧の上昇の結果、脳室の拡大、大脳皮質の菲薄化を認める¹⁵⁾。本研究では、脳室内圧の測定は行っていないが、EGTAを脳室

面に作用させることで、脳室帯の細胞間接着を阻害した結果、図3のとおり脳室の拡大、大脳皮質の菲薄化という水頭症と同様の所見を示した。このように脳室面の影響による水頭症の観察を行った報告は、我々が認識する限りでは見当たらない。

脳の層形成においては、発生初期に脳室帯の神経上皮から増殖、分裂を繰り返し、最終的に分化したニューロンは放射状に拡大することにより6層構造を形成することが知られている¹⁶⁻²⁰⁾。図4、5で示すように、神経細胞のマーカーであるTuj1、細胞骨格のマーカーである

actin, そして層構造を判別できる VGluT2での解析により, EGTA 30mM においては層構造が崩れていることが観察できる. 大脳皮質の層構造の乱れについて, 上層部において疎の構造が観察できることから, 脳室面がEGTAにより障害されることにより上層が障害されることがわかった. これは後述する層形成のメカニズムである inside-out の原理に大きく関与していると考えられる. 妊娠マウスの脳形成時の神経前駆細胞の細胞分裂・増殖を見てみると, E11.5 までは前駆細胞が盛んに増殖する時期であるのに対し, E14.5 においてはニューロンを盛んに生み出す時期である^{21,22)}. 本研究では, 妊娠マウス E14.5 のステージで EGTA を注入しているが, E14.5 は層形成には重要な時期であり, この時期に EGTA で脳室面に影響を与える結果, 層形成に影響がでるものと考えられる.

また層形成には, 前述した inside-out の原理が深く関わっている. 神経前駆細胞は脳室周囲の脳室帯に存在し, 自己複製的増殖の後, 神経細胞に分化する. 分化した神経細胞は, 細胞分裂の停止した時期に応じて決定される. すなわち, 神経発生の初期に増殖が停止した神経細胞は大脳皮質の第 V, VI 層になり, 後期で停止したものは第 II ~ IV 層の神経細胞になる. このように, 大脳皮質において下層の神経細胞から上層の神経細胞へと積み上げるように層が形成されていく形式を inside-out 原理という²³⁾. 我々の示した図 4, 5 を見てみると, 上層部分が疎な構造になっている. それが果たして inside-out の原理が破壊されたことによるのか, もしくは神経細胞の発生が EGTA により障害されたことによるのかは, この段階では判断ができない. そのため, 我々は脳室面の上層 (II/III) と下層 (V) のマーカーである SATB2 抗体, Ctip2 抗体を用いて EGTA 処置後の脳組織を観察した. 上層のマーカーである SATB2 は, マウス発生期の E14.5 ~ E16.5 の時期で発現を認め始め, Ctip2 は E11.5 ~ E14.5 の時期で発現を認めてくるものである^{24,25)}. このことから, Ctip2 は EGTA の作用する前に発現するので,

EGTA 0 mM と 30 mM では Ctip2 陽性細胞の局在に明らかな差はなく, 同様の発現を認めているが, SATB2 陽性細胞は, EGTA 30 mM では上層側に偏局在しており, 下層側の細胞が減少していることが観察できる (図 6). このことは, EGTA が作用した E14.5 以降は, 脳室帯で SATB2 を発現する細胞の産生が低下していることが伺える. しかし, 上層に移動し局在しているということから, inside-out の原理は保たれていることが考えられる.

以上のことから, 本研究では, 高濃度の EGTA で脳室帯に障害を与えた場合, 脳浮腫を呈し, また障害を加えた段階以降の神経細胞の産生が低下することがわかった. また脳室帯そのものは inside-out の原理には関与が低いことが考察できる. 本研究では行っていないが, これらのことをより詳細に解析するには, リーラーマウスを用いた解析も有効な手法の一つと考える. リーラーマウスは, inside-out 原理が正常に行われない突然変異マウスのことである²⁶⁾. 大脳皮質や小脳, 海馬, 各種神経細胞核に広く神経細胞の位置異常が見られ, 大脳皮質においては, 層構造がおおむね逆転し, outside-in の様式をとる. 今回確立した実験系にこのようなマウスを用いることで, より大脳皮質構築の inside-out の原理の解明につながる可能性があると考えられる.

結 語

発生期のマウス脳室面に EGTA を作用させることにより, EGTA 20 mM 以下の濃度では脳形成に異常は来たさなかったが, EGTA 30 mM 以上では脳浮腫様の症状を呈し, また神経細胞の層形成に異常が認められた. しかし層構築の inside-out の原理に影響はないことがわかった.

謝 辞

本研究を終えるにあたり, ご指導とご協力をいただいた川崎医科大学解剖学教室の樋田一徳教授, 小曾戸陽一准教授, 清菫恵美講師, また研究を進めるにあたり, 川崎医科大学解剖学教室の研究補助員の方々に深謝い

たします。

本研究は川崎医科大学プロジェクト研究費 (24大 - 2) の援助を受けて行われた。

引用文献

- 1) Gaspard N, Bouchet T, Hourez R, *et al.*: An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature* 455: 351-357, 2008
- 2) Espuny-Camacho I, Michelsen K.A, Gall D, *et al.*: Pyramidal neurons derived from human pluripotent stem cells integrate efficiently into mouse brain circuits in vivo. *Neuron* 77: 440-456, 2013
- 3) Shi Y, Kirwan P, Smith J, Robinson H.P, Livesey F.J: Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nat Neurosci* 15: 477-486, 2012
- 4) Bradley J, Molyneaux, Paola Arlotta, Joao R.L Menezes, Jeffrey D. Macklis: Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nature reviews. Neuroscience* 8: 427-437, 2007
- 5) Fietz S.A, Huttner W.B: Cortical progenitor expansion, self-renewal and neurogenesis-a polarized perspective. *Curr Opin Neurobiol* 21: 23-35, 2011
- 6) Lui J.H, Hansen D.V, Kriegstein A.R: Development and evolution of the human neocortex. *Cell* 146: 18-36, 2011
- 7) Lachlan H, Thompson, Deniz Kirik, Anders Björklund: Non-dopaminergic neurons in ventral mesencephalic transplants make widespread axonal connections in the host brain. *Experimental Neurology* 213: 220-228, 2008
- 8) Junya Hayashi, Yasushi Takagi, Hitoshi Fukuda, Takayuki Imazato, Masaki Nishimura, Motoaki Fujimoto, Jun Takahashi, Nobuo Hashimoto, Kazuhiko Nozaki: Primate embryonic stem cell-derived neuronal progenitors transplanted into ischemic brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 26: 906-914, 2006
- 9) Nagashima F, Suzuki IK, Shitamukai A, Sakaguchi H, Iwashita M, Kobayashi T, Tone S, Toida K, Vanderhaeghen P, and Kosodo Y: High efficient transplantation reveals the acquisition of polarized processes by cortical cells derived from mouse and human pluripotent stem cells (投稿中). *Stem Cells and Development*
- 10) Toida K, Kosaka K, Aika Y, Kosaka T: Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb--IV. Intraglomerular synapses of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons. *Neuroscience* 101: 11-17, 2000
- 11) Nakamura K, Hioki H, Fujiyama F, Kaneko T: Postnatal changes of vesicular glutamate transporter (VGluT) 1 and VGluT2 immunoreactivities and their colocalization in the mouse forebrain. *J Comp Neurol* 492: 263-288, 2005
- 12) Tarabykin V, Stoykova A, Usman N, Gruss P: Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by Svet1 gene expression. *Development* 128: 1983-1993, 2001
- 13) Zimmer C, Tiveron MC, Bodmer R, Cremer H: Dynamics of Cux2 expression suggests that an early pool of SVZ precursors is fated to become upper cortical layer neurons. *Cereb Cortex* 14: 1408-1420, 2004
- 14) Mizuguchi M: Molecular Pathology of Brain Malformations Associated with Hydrocephalus. *Nervous System in Children* 26: 102-109, 2001
- 15) 有賀 純: 脳形成異常の発生的メカニズム. *実験医学* 18: 1283-1289, 2000
- 16) Rakic P: Specification of cerebral cortical areas. *Science* 241: 170-176, 1988
- 17) Chenn A, McConnell SK: Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* 82: 631-641, 1995
- 18) Miyata T, Kawaguchi A, Okano H, Ogawa M: Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 31: 727-741, 2001
- 19) Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR: Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409: 714-720, 2001
- 20) Götz M, Huttner WB: The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 777-788, 2005
- 21) Miyata T, Kawaguchi A, Okano H, Ogawa M: Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 31: 727-741, 2001
- 22) Miyata T, Kawaguchi A, Saito K, Kawano M, Muto T, Ogawa M: Asymmetric production of surface - dividing and non - surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131: 3133-3145, 2004
- 23) Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD: Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 8: 427-437, 2007
- 24) Jessica M, Alsiöa, Basile Tarchinib, Michel Cayouette, Frederick J, Livesey: Ikaros promotes early-born

- neuronal fates in the cerebral cortex. PNAS 110: 716-725, 2013
- 25) Gaspard N, Bouchet T, Hourez R, *et al.*: An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. Nature 455: 351-357, 2008
- 26) Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K: The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. Neuron 14: 899-912, 1995

Role of cell adhesion of neuroepithelium in the developing mouse cerebral cortex

Fumiaki NAGASHIMA

Department of anatomy, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

ABSTRACT The cerebral cortex of mammals is a structure consisting of six layers. The progression of layer formation is known to be particularly active during the embryonic and immediate postnatal periods. In the ventricular zones, which adjoin the embryonic cerebral ventricles, neural stem cells differentiate first into neuronal precursor cells and then into neurons. The neurons then migrate toward the surface layer of the brain, forming the 6-layered structure (inside-out). The ventricular zones are thus thought to play an important role in the formation of the brain during the embryonic period. We therefore examined how altering the tissue structure of the cerebral ventricular zones results in abnormalities of the brain formation system. Because the ventricular zones consist of epithelial tissue, the cell junctions are rigid. Consequently, we observed the effect on brain formation of disrupting cell junctions on the ventricular surface, focusing on cadherins, which are calcium (Ca^{2+})-dependent adhesion molecules between epithelial cells. The experimental method involved injecting ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), which specifically chelates Ca^{2+} , into the cerebral ventricles of 14.5-day-old mouse embryos, then analyzing the tissue structure of the brain in the embryonic and postnatal periods in detail. The results showed that EGTA at high concentration resulted in cerebral edema in some mice. Enlargement of the cerebral ventricles and thinning of the cerebral cortex were also observed. In addition, analysis using SATB2 as a marker of layers 2 and 3 and Ctip2 as a marker of layer 5 showed that although subsequent neurogenesis decreased with the breakdown of the adhesive structure of the ventricular zones, the inside-out rule was maintained for the layer structure. These findings show that the ventricular zone structure and neurogenesis in the ventricular zones are unlikely to play a role in the mechanism underlying the inside-out principle.

(Accepted on July 23, 2013)

Key words : Neuroepithelial tissue, Neurogenesis, Brain development, Cerebral cortex

Corresponding author

Fumiaki Nagashima

Department of Anatomy, Kawasaki Medical School, 577
Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 462 1199

E-mail : fnagaprs@yahoo.co.jp

