

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18548

研究課題名(和文)細胞間シグナル伝達を介した神経幹細胞の運命決定機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms that balance neuronal subtype production in the developing neocortex

研究代表者

當麻 憲一(Toma, Kenichi)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・研究員

研究者番号：30749205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、高次脳機能に関与する大脳皮質の上層ニューロンの分化決定を担う細胞間シグナル伝達の分子機構の解明を目的として行った。その結果、神経幹細胞からの上層ニューロンの分化には従来から着目されてきた転写因子に加え、発生時間において先に産生される深層ニューロンからの細胞接触依存的な細胞間シグナル伝達が必要であることが明らかになった。研究期間において、このシグナルはephrin-Eph経路と呼ばれるシグナル伝達経路を使用していること、またその下流は、上層ニューロンの分化を制御する転写因子Brn2の細胞内局在変化によって実装されていることを解明した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research project was to identify the molecular underpinnings of the cell extrinsic signaling responsible for the determination of upper layer (UL) neurons in the cerebral cortex. These UL neurons are ultimately critical in higher brain function. We revealed that in addition to intrinsic factors, such as transcription factors, UL neurogenesis from neural stem cells requires cell-contact dependent intercellular signaling from deep layer (DL) neurons, which are produced earlier in development. We further found that this signaling utilizes the ephrin-Eph pathway, and is implemented downstream by changes in subcellular localization of the transcription factor Brn2 for control of the differentiation of UL neurons.

研究分野：生物科学 発生生物学 幹細胞生物学

キーワード：細胞分化 細胞間シグナル 大脳皮質 神経幹細胞 上層ニューロン 核輸送 細胞接触

1. 研究開始当初の背景

幹細胞の運命決定が、転写因子等の細胞内在性因子のみならず周囲の細胞からの外的な影響を受けることは 1980 年代から示唆されていたが、直接的には検証されていなかった。申請者らは発生中のマウス大脳皮質神経幹細胞の周囲のニューロンを遺伝学的に除去すると、幹細胞の運命が変わることを世界に先駆けて明らかにした(Toma et al. 2014)。

大脳皮質神経幹細胞は、発生時期に大脳皮質を構成する主要なニューロンサブタイプである、CR 細胞→深層ニューロン→上層ニューロンを経時的に順番に産生する。我々は、分化直後の深層ニューロンを生体内で除去すると、神経幹細胞は失った深層ニューロンを補うために通常よりも長い期間深層ニューロン産生を行い、上層ニューロン産生時期が遅くなることを明らかにした。このことから、神経幹細胞は深層ニューロンと連絡を取り、次の上層ニューロンを産生する時期を決定していることを報告した(雑誌論文①-③)。

しかしながら、依然としてどのような機構で幹細胞が周囲の細胞からの情報を受け取り、それを細胞運命に反映させているのか不明なままであった。

2. 研究の目的

本研究課題では、マウス大脳皮質発生をモデルに幹細胞の運命決定を担うニューロン-幹細胞間シグナルの分子実体解明を目指した。

3. 研究の方法

3-1 細胞間シグナル下流の分子イベントの同定

予備データとして、マイクロアレイ解析と免疫組織染色から細胞間シグナルが作動する深層ニューロン/上層ニューロン産生期の切り替え時に起こる分子イベントとして上層ニューロンの分化関連転写因子である Brn2 の神経幹細胞内での局在変化を見出した。Brn2 は、深層ニューロン産生期の神経幹細胞において細胞質に局在しているが、上層ニューロン産生時期に入ると細胞核に局在を変化させる。この細胞内局在変化と上層ニューロン分化の関連性を人為的な Brn2 の局在操作で、また細胞間シグナルとの関連性を、深層ニューロン除去による細胞間シグナルの遮断実験により評価した。

3-2 細胞間シグナルを担う分子機構の同定

深層ニューロン-神経幹細胞間シグナルの分子実体を明らかにするために、まずシグナル特性の解析を行った。生体内から単離した深層ニューロン産生期の神経幹細胞を深層ニューロンと *in vitro* で共培養することにより、細胞間シグナルが細胞接触依存性なのか、分泌性シグナルなのかを明らかにした。

次に、シグナル分子のスクリーニングのために生体内での神経幹細胞の深層ニューロン→上層ニューロンの分化パターンをミミ

ックできる試験管内培養モデルを確立した。このモデルでは、深層ニューロンは赤色蛍光レポーターを、上層ニューロンは緑色蛍光レポーターを発現するように遺伝子操作されている。つまり、最終的な緑色/赤色細胞の割合が深層ニューロン→上層ニューロンの分化時期を反映していることを意味する。この培養系に各種阻害剤を添加することで、この割合にバイアスをかけることのできる因子を探索した。また特定した因子を直接的に生体内で子宮内電気穿孔法によって操作し、神経幹細胞の運命決定への影響を評価した。

これらの解析を通し、大脳皮質発生において、上層ニューロンの分化決定を担う細胞間シグナルの分子実体と、その下流の分子イベントまで明らかにした。

4. 研究成果

神経幹細胞は発生の進行に伴い、深層ニューロン→上層ニューロンをこの順序で産生する。我々は、この深層/上層ニューロン産生切り替え時期に上層ニューロンの分化を開始させる POU 転写因子 Brn2 の発現パターンが細胞質から核内に変化することを免疫組織染色法により見出したことから、Brn2 の核内移行が深層から上層ニューロン産生へと切り替えるスイッチとして働いていると考えた。次に Brn2 の細胞質から細胞核への移行を阻害する因子 Karyopherin Alpha2 (KPNA2) と深層/上層ニューロン産生切り替えについて解析を行った。まず、KPNA2 は Brn2 が細胞質に局在している深層ニューロン産生時期の神経幹細胞で発現が高く、Brn2 が核内局在する上層ニューロン産生時期では発現が低下することを見出した。そして、この発現低下を阻止することで深層/上層ニューロン産生切り替え時期が遅れること、逆に KPNA2 の早期の発現抑制によって上層ニューロン産生を誘導できることを見出した。これらの結果から KPNA2 の発現抑制時期が深層/上層ニューロン産生切り替えを制御していると考えられた。さらに、この KPNA2-Brn2 経路と細胞間シグナルの関連性を調べるために、細胞間シグナル源である深層ニューロンを除去すると、KPNA2 の発現抑制が阻止され、深層/上層ニューロン産生切り替えが遅れることを見出した。これらの結果から、ニューロン-幹細胞間シグナルは KPNA2 の発現抑制を介して上層ニューロン産生を開始させているという細胞間シグナルの下流機構が明らかになった。

次に細胞間シグナルを担うシグナル分子について解析を進めた。まず、シグナルの特性を明らかにするために、神経幹細胞と深層ニューロンの共培養実験を行った。その結果、神経幹細胞と深層ニューロンを接触培養した時のみ早期の上層ニューロンの分化が誘導できることを見出した。この結果は、細胞間シグナルが細胞接触依存性シグナルであることを示している。実際の発生において、

神経幹細胞と深層ニューロンが接触しているのかを調べるために、Cre 組み換え酵素依存的レポーター発現マウスの大脳皮質に、子宮内電気穿孔法にて Cre 発現プラスミドを導入すると、神経幹細胞と深層ニューロンは分化後も接触を維持していることがわかった。

そして、細胞接触依存的に作動する細胞間シグナルを担うシグナル分子を同定するため、*in vitro* で生体内で起こる神経幹細胞の深層→上層ニューロン分化をミミックできるモデルを作成し、そこに阻害剤を添加することで、分化タイミングに影響を与える、つまり細胞間シグナル伝達に影響がある因子をスクリーニングした。その結果、*ephrin-Eph* 経路を構成する *EphA4* の特異的阻害剤 *KYL* を添加すると、深層ニューロン産生が増加し、上層ニューロン産生が低下することを見出した。つまり、*EphA4* シグナルは上層ニューロン分化を開始させる細胞間シグナル分子であることがわかった。

さらに、まだ上層ニューロンの分化が開始していない深層ニューロン産生期の神経幹細胞に、強制的に活性化型 *EphA4* を子宮内電気穿孔法により導入し早期に上層ニューロン分化を誘導できるか確認した。その結果、*EphA4* 経路の早期活性化によって、早期の上層ニューロン分化を誘導できることを見出した。

これらの結果から、大脳皮質発生における細胞間シグナル伝達機構として、次のような仮説を現在考えている。まず神経幹細胞は、大脳皮質発生の適切な時期に深層ニューロンを産生する。分化した深層ニューロンは神経幹細胞に *EphA4* を介した細胞接触性シグナルを活性化し、*KPNA2* 発現抑制を行う。その結果、上層ニューロン分化関連因子である *Brn2* の細胞内局在が細胞質から細胞核に変化し、上層ニューロンの産生を開始する。

このような細胞内在性因子のみならず、細胞間シグナルによる細胞外の状況のフィードバック機構を分化決定に用いることで、胎生期が異なるマウスとヒトの発生でも同様の機構で正しい時期に正しいニューロンを分化させることができる柔軟なシステムを構築していると推測される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 當麻憲一、花嶋かりな、大脳皮質層ニューロンの分化と統合メカニズム、*生体の科学* 68: 19-23 (2017) 査読なし
doi: <https://doi.org/10.11477/mf.2425200567>
- ② Toma, K., Wang, TC., Hanashima, C. Encoding and decoding time in neural development. *Development, Growth and Differentiation* 58(1): 59-72

(2016) 査読あり

doi: 10.1111/dgd.12257

- ③ Toma, K., Hanashima, C. Switching modes in corticogenesis: mechanisms of neuronal subtype transitions and integration in the cerebral cortex. *Frontiers in Neuroscience* 9: 274 (2015) 査読あり
doi: 10.3389/fnins.2015.00274

[学会発表] (計 8 件)

- ① Toma, K., Hanashima, C. Mechanisms that balance neuronal subtype production in the cerebral cortex. The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, July 20-23, 2017, Chiba, Japan.
- ② Toma, K., Hanashima, C. Mechanisms that balance neuronal subtype production in the cerebral cortex. The 69th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, June 13-15, 2017, Sendai, Japan. *Invited Talk*
- ③ 當麻憲一、花嶋かりな、細胞間シグナル伝達を介した神経幹細胞の運命決定機構、文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域『脳構築における発生時計と場の連携』第二回領域班会議 2017 年
- ④ Kenichi Toma, Carina Hanashima, Mechanisms that balance neuronal subtype production in the developing neocortex. Neuroscience 2016, SfN's 46th annual meeting, November 12-16, 2016, San Diego, CA, USA
- ⑤ Kenichi Toma, Carina Hanashima, Mechanisms that balance neuronal subtype production in the cerebral cortex. Neuroscience2016, The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, July 20-22, 2016, Yokohama, Japan
- ⑥ Kenichi Toma, Carina Hanashima, Mechanisms that balance neuronal subtype production in the cerebral cortex. CDB symposium 2016, March 28-30, 2016, Kobe, Japan
- ⑦ Kenichi Toma, Carina Hanashima, Mechanisms that balance neuronal subtype production in the cerebral cortex. Neocortical Organization III, February 11-12, 2016, Tokyo, Japan
- ⑧ Kenichi Toma, Takuma Kumamoto, Carina Hanashima, A two-step regulatory mechanism determine the timing of upper-layer neurogenesis in the cerebral cortex. Neuroscience2015, The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, July 28-31, 2015, Kobe, Japan

〔その他〕

花嶋研究室ウェブページ

<https://hanashima-lab.wixsite.com/waseda>

文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域
『脳構築における発生時計と場の連携』ウェブページ

<http://www.time.icems.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

當麻 憲一 (Kenichi Toma)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・大脳皮質発生研究チーム・研究員

研究者番号：30749205