

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18957

研究課題名(和文) 大脳における領域バウンダリーの形成機構の解明

研究課題名(英文) The boundary formation in the telencephalon

研究代表者

那須 信 (Nasu, Makoto)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：80634790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、大脳に形成される領域の形成機構を統合的に理解することを目的とした。各領域分化の定量解析を行った結果、外側基底核原基と内側基底核原基は同時期のシグナルの濃度勾配によって運命決定されるのではなく、先に内側基底核原基、続いて内側基底核原基のように異なる時期に運命決定されることが分かった。バウンダリーを形成する2つの領域が必ずしも同時期に形成されるわけではないことが明らかとなった。大脳の組織形成は二段階の分化段階を経て達成され、これによって大脳は劇的なサイズ成長を伴いながら領域分化が達成されると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we investigated how progenitor specification occurs under spatiotemporally changing conditions using a three-dimensional (3D) in vitro differentiation method. We observed that the timing of signal exposure for efficient induction is specific to each lineage. Furthermore, early and late progenitors possess different Shh signal response capacities. Taken together, the current study reveals novel developmental mechanisms for telencephalon patterning based on the interplay of dose and time dependence, including a time lag for specification and a temporal shift in cellular competence. This delayed fate choice allows tissues with marked size expansion, such as the telencephalon, to compensate for the changing dynamics of patterning cues.

研究分野：神経発生学

キーワード：大脳 パターニング ES細胞 分化培養 分化メカニズム

### 1. 研究開始当初の背景

バウンダリー（領域境界）とは、異なる性質を持つ細胞種が互いに接しながら互いが交じり合うことがないよう厳密に制御される境界部のことを言う。バウンダリーは、個体発生の過程で特殊な機能を担うことが知られる。大脳においても、Cajal-Retzius 細胞を代表とする遊走性の高い細胞が生まれ、さらに Wnt、BMP、FGF、EGF、Wnt 修飾物質など複数の分泌性タンパク質が産生される (Arai and Pierani, 2014, review)。すなわち、バウンダリーは分化した組織の領域化に働くとともに、周辺の分化運命を動的に変化させ得る場としての重要な機能をも担う。バウンダリー形成は、正常な個体発生のために欠かせない発生プログラムの一つであると言える。

多細胞動物の神経上皮組織は、当初均一な性質のものから発生が進むにつれ徐々に異なる性質を持ち始め、別の領域に分かれて複雑化する。初期に隣り合っていた細胞は、いかなる違いによって異なる領域形質を獲得したのか、互いのバウンダリーはいかなる機構によって維持されるのかについては未だ不明な点が多い。これまでにバウンダリーの形成機構にはいくつかの仮説が提唱されており (Dahmann et al., 2011, review)、異なる仮説は検証し排除または互いに統合していくことが求められている。近年、ハエの翅原基のバウンダリー形成において従来のモデルを見直す動きが見られ始めている一方 (Alexandre et al., 2014; Roy et al., 2014)、脊椎動物の脊髄においては従来のモデルに基づくアプローチが新しい知見の発見も加えながら、一定の成果を挙げている (Dessaud et al., 2010; Oosterveen et al., 2012; Kicheva et al., 2014)。バウンダリーの種類によって主要な機構が異なる可能性も考えられ、各バウンダリーについて主要な機構を明らかにすることも今後の研究課題である。

大脳のバウンダリーにおいては、Shh シグナルの活性化と抑制化による濃度勾配によって領域が形成されるフレンチフラッグモデルが支持されているが (Rallu et al., 2002, review)、実際にその決定的な証拠を挙げた例はなく直接的な検証実験による証明が必要である。また、Wnt や BMP も関与すると考えられるが、互いの寄与と関係性は不明である。

過去の研究において、三次元 *in vitro* 分化培養技術を用いてマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) から大脳神経細胞を分化培養する中で、*in vivo* の大脳に観察されるバウンダリーが *in vitro* にも再現し得ることを発見し報告していた (Nasu et al., PLoS ONE, 2012)。すなわち、大脳背側-腹側バウンダリーに当たる PSB (pallial-subpallial boundary) と大脳背内側-背外側バウンダリーに当たる HCB (hem-cortex boundary) の二つのバウンダリー

である。また大脳腹側にある二つの隆起の境界部 (inter-ganglionic eminence, inter-GE) の再現性も示唆していた。当時の報告は、主題として解析していたものの副産物として得られたものとしてのバウンダリーの存在を記述するに留まった。しかし、*in vitro* に一定の割合で観察されるバウンダリーは、限定的な環境においても再現性のある何らかの自己組織化プロセスに依存していることを示唆しており、バウンダリー形成の謎を解決する課題が残されていた。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、大脳に形成される3つのバウンダリー (PSB, HCB, inter-GE) の形成機構を統合的に理解することを目的とする。これまで脳の発生メカニズムはモルフォゲン濃度勾配モデルが中心であったが、想定する状況は静的である。個体の発生は時間軸の中でサイズ変更を伴って進行するものであり、近年、時間的環境変化に対応しながら分化を進める分子メカニズムの存在が想定されている (Sanger and Briscoe, 2017)。時空間的制御機構の存在を想定しながら、様々なシグナル経路の関与と寄与を調べることを課題とする。

### 3. 研究の方法

バウンダリーを形成する領域の分化条件の検討

*in vivo* においてバウンダリーで隣り合わせる2つの領域が *in vitro* においても同じ細胞塊の中に形成される条件を探索する。それぞれの系列への分化最適条件について、過去の報告を参照しながら、再度適当な時期・量を検討する。HCB の誘導には、大脳の背側化因子が関係することが考えられることから、BMP シグナルや Wnt シグナルを用いた条件を検討する。interGE の誘導は、腹側化因子である Shh シグナルを検討する。PSB の誘導は、上記シグナルの活性および抑制を検討する。

大脳の各領域分化効率の定量的解析

Foxg1::venus ES 細胞 (Eiraku et al., 2008) を用いることで大脳細胞への分化をモニターする。大脳内の各領域への分化は、免疫組織化学染色によるマーカー標識によって定量的に判定する。大脳最背側部である dorsal midline tissues は Lmx1a+/Foxg1-として、大脳背側部である大脳皮質は Pax6+/Foxg1+として、大脳腹側部の背側寄り組織である大脳外側基底核原基 (LGE) は Gsx2+/Foxg1+として、大脳腹側部の最腹側組織である大脳内側基底核原基 (MGE) は Nkx2-1+/Foxg1+として判別する。標識された細胞の割合を画像解析により算出し、分化に適当な時期・量を決定する。

#### 4. 研究成果

先行研究では、シグナル曝露の開始時期や量を検討した報告はあるが、曝露期間はこれまで検討されてこなかった。一方、曝露時期の最適条件検討のためには、開始時期に加え曝露期間も重要な要素となる。そこで始めに、各領域分化に働くシグナル情報の必要な期間を探った。シグナルが有効になると考えられる培養5日目以降、分化が確定する10日目までの間に様々なタイムウィンドウを取り、各領域マーカーの出現頻度を定量的に解析した。その結果、いずれの系列の領域分化においても2日程度の曝露期間で十分であることが分かった。同時に、分化誘導に適した曝露時期を検討したところ、外側基底核原基を除いた、大脳正中組織、大脳皮質、内側基底核原基の各組織は培養5日目と比較的早い時期のシグナル曝露が有効であった。一方、外側基底核原基は7日目以降の遅い時期のシグナル曝露が有効であることが分かった。外側基底核原基と内側基底核原基はともに大脳の腹側組織としてShhシグナルによって分化誘導されることは共通であったが、分化のタイミングが異なることを意味する。このことは、従来のモルフォゲン濃度勾配に基づく分化モデルとは異なるメカニズムが存在することを示唆する。

そこで次に、外側基底核原基と内側基底核原基分化誘導における時間的制御と濃度依存的制御の関連を調べるため、早い時期と遅い時期の2つのタイムウィンドウにおいてシグナル量を様々に取り、各領域分化の定量解析を行った。その結果、内側基底核原基の分化要件として、早い時期の高濃度シグナルが必要であることが分かり、これは従来考えられてきたことと一致する結果であった。外側基底核原基は、従来では低濃度シグナルによって分化誘導されると考えられてきたが、本解析の結果から遅い時期のシグナルが必要であり、濃度には非依存的であることが分かった。

外側基底核原基と内側基底核原基は同時期のシグナルの濃度勾配によって運命決定されるのではなく、先に内側基底核原基、続いて内側基底核原基のように異なる時期に運命決定される。共通のシグナルだが異なる時期のシグナルによって共通の神経前駆細胞は異なる反応を示すことが言え、前駆細胞は培養5日目時点と7日目時点でその細胞性質を時間依存的に変化させていることが分かる。当初、領域バウンダリーの形成機構を探ることを目的に開始した研究であったが、バウンダリーを形成する2つの領域が必ずしも同時期に形成されるわけではないことが明らかとなった。

ここで、大脳組織の中で一部の領域だけ分化時期が遅れていることの利点を考えてみたい。従来考えられてきた脳の発生メカニズムであるモルフォゲン濃度勾配モデルは、ある

一時期の濃度勾配を想定する。個体の発生は時間軸の中でサイズ変更を伴って進行するものであり、別の時期を想定すると濃度勾配が異なる可能性が考えられ、この場合、組織は異なる濃度勾配を読み取るためのメカニズム、もしくは異なる濃度勾配を補正して解釈するメカニズムが必要となる。そこで本研究結果を踏まえ、大脳の組織形成は二段階の分化段階を経て達成されるモデルを考えた。大脳の外側にある領域はモルフォゲンの分泌センターにも近い。第一段階として、外側の組織である背側正中組織やそれに近い大脳皮質、および腹側基底核原基の分化が進む。この時期を概要決定期と表現する。この時、大脳組織の中でも中寄りの組織は分化運命未決定の状態となる。その後、組織がある程度大きくなった第二段階においてシグナルの曝露を受けることで外側基底核原基に、またはシグナルの曝露を受けないことで大脳皮質の一部に分化する。この時期を洗練期と表現する。この二段階決定機構の根底には従来のモルフォゲン濃度勾配モデルによって支持されるメカニズムが働いているものと思われる。これによって大脳は劇的なサイズ成長を伴いながら領域分化が達成されると考えられる。

本研究の途中経過および最終的にまとめた結果は学会においてポスターや口頭で発表してきた。また科学雑誌に投稿しているところである。

#### 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)

[学会発表](計 3件)

那須信、江角重行、玉巻伸章

大脳の分化運命決定における時間的変化への適応メカニズム

第123回日本解剖学会総会・学術集会 2018年3月28日(口頭)

Makoto Nasu, Shigeyuki Esumi, Nobuaki Tamamaki

Temporal shift of signal dependence for progenitor specification in telencephalon from mouse embryonic stem cells

KEY FORUM 2018 2018年1月11日(ポスター)

那須信、玉巻伸章

大脳発生のパターン形成時における背腹軸と時間軸とシグナル分子の関係

第122回日本解剖学会総会・学術集会 2017年3月28日(ポスター)

[その他]

ホームページ等

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/department/morneuro/policy.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

那須 信 (Makoto Nasu)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：80634790

### (4)研究協力者

玉巻 伸章 (Nobuaki Tamamaki)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：20155253

江角 重行 (Shigeyuki Esumi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：90404334