

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K06990

研究課題名(和文) 大脳発生過程における脳室面からの細胞離脱制御

研究課題名(英文) Molecular mechanisms that control neuronal delamination in the developing neocortex

研究代表者

川口 綾乃 (KAWAGUCHI, Ayano)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90360528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の大脳ができる過程では、神経前駆細胞と呼ばれる未分化細胞が分裂を繰り返して多くの細胞を生み出していく。これらの分裂の多くは脳室面で行われ、誕生した細胞のうちニューロンに分化する細胞は、すみやかに離脱し外側へと移動する。この離脱は3次元的な脳形成に重要な現象であるが、その実行役となる分子の詳細は明らかとなっていなかった。本研究では、分化細胞の脳室面からのすみやかな離脱を制御している分子としてLzts1を同定し、Lzts1がどのようにして細胞離脱を惹起しているかを明らかとした。また本分子がouter radial gliaとよばれる種類の神経前駆細胞の誕生も共通して制御していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、哺乳類の脳がどのようにしてできるのかを知ろうとする基礎研究である。本研究によって、分化細胞の速やかな脳室面からの離脱、移動開始を保証している分子機構が明らかとなった。また、outer radial gliaは大脳にしわのある生物種で特に多いことが知られている。本研究は、outer radial gliaの誕生の仕組みを初めて明らかとするとともに、実はそれが分化細胞の移動開始という脳の発生過程でみられる基本的現象と共通の分子によって制御されていることを示した。

研究成果の概要(英文)：In the developing central nervous system, cell departure from the apical surface is the initial and fundamental step in the formation of the 3-dimensional, organized architecture. In addition to the delamination of differentiating cells, repositioning of progenitors to generate outer radial glial cells (oRGs) contributes to mammalian neocortical expansion; however, a comprehensive understanding of the mechanisms underlying these cell departures is lacking. In this study, we demonstrate that Lzts1 positively regulates neuronal delamination, mitotic somal translocation (MST), and oblique apical RG (aRG) division to generate oRGs in an expression level-dependent manner. Our data supports the hypothesis that neuronal delamination and oRG generation, the two major cell behaviors for departure from the apical surface, are two aspects of the same process, continuously variable cellular dynamics controlled by Lzts1.

研究分野：神経発生学

キーワード：神経前駆細胞 神経発生 アドヘレンスジャンクション 放射状グリア 細胞間接着 神経科学 細胞移動

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物種に応じた多様な形態を示す大脳も、もとは一層の未分化な神経前駆細胞（神経幹細胞）が分裂増殖をくりかえしつつ種々の細胞を生み出すことによって形成される。発生過程において通常の神経前駆細胞は放射状（radial）に長い形体をしており、脳室面、すなわち神経上皮としての apical 面で分裂することから、aRG (apical radial glia; あるいは apical progenitor cells, AP) と呼ばれる。

正しく機能的な脳組織構造が形成されるためには、前駆細胞の分裂によって生じた各種細胞が適切なタイミングで相応の場所に配置されなければならない。この意味において、脳室面での aRG の分裂によって生じた分化細胞（ニューロンあるいはニューロンしか生み出さない中間前駆細胞）がニューロン層を形成するために離脱する「脱上皮化」のタイミング制御は重要である（図 1）。この分化細胞の離脱開始には、上皮間葉転換やニューロン分化に関連する複数の転写因子が関与することが報告されている (Itoh et al., Nat Neurosci, 2013)。一方で、それらの下流で具体的に細胞離脱を引き起こすメカニズムには未解明な部分が多く、特に脳室帯にある細胞集団の中から分化細胞「だけ」を、その誕生から数時間のうちに速やかに脳室面から離脱させる分子機構は不明であった。

研究代表者はこれまで、単一細胞の網羅的な遺伝子発現プロファイルに基づいて神経系の前駆細胞を分類し (Kawaguchi et al., Development, 2008) さらに RG の経時的な個性の変遷と細胞周期進行との関係について明らかとしてきた (Okamoto et al., Nat Commun, 2016)。その過程で、RG の分化に伴い極めて早期の段階で発現開始する遺伝子の一つとして新たに同定したのが Lzts1 (leucine zipper putative tumor suppressor 1, 図 1) である。本課題研究の開始時点までに研究代表者は、マウス胎児大脳原基に *in vivo* (生体内) エレクトロポレーションにより Lzts1 を過剰発現させると、過剰発現された細胞はほぼ全て、脳室側の突起のみを退縮させ、脳室面から離脱するという現象を観察していた。このことから、Lzts1 は分化細胞の脳室面からの早期離脱に関与しているのではないかと考えた。

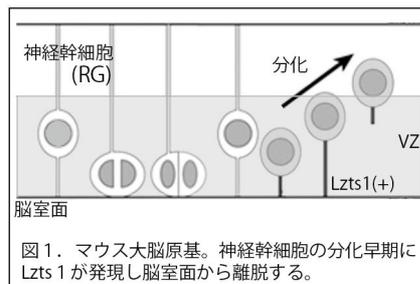


図 1. マウス大脳原基。神経幹細胞の分化早期に Lzts1 が発現し脳室面から離脱する。

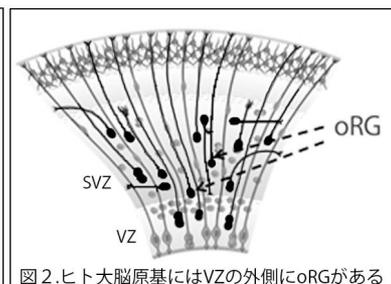


図 2. ヒト大脳原基には VZ の外側に oRG がある

一方、特にヒト、サルやフェレットなど脳回を有し複雑な大脳組織構造を持つ生物種の脳では、脳室に面した脳室帯 (VZ) よりもさらに外側の領域である脳室下帯 (SVZ) で、未分化性を保ったまま分裂増殖する別のタイプの神経前駆細胞が存在する。これらは脳室面で分裂する aRG に対して oRG (outer radial glia) と呼ばれる (図 2)。マウスのように脳回を有さない、よりシンプルな大脳を持つ生物種でも oRG は存在するが、その数や増殖能は限られている。そのため脳の進化という観点では、脳の発生過程で oRG が誕生し前駆細胞自身の増殖と多数のニューロン産生を果たすことが大脳皮質の巨大化に貢献しているものと考えられる。それゆえ 2010 年に Hansen らがヒト大脳原基内でその存在を報告して以来 (Hansen et al., Nature, 2010)、oRG の増殖や分化を制御する機構の解析は大脳発生研究におけるホットトピックの一つとなってきた。特に海外研究グループを中心として、セルソーターで分離したヒト oRG や (Florio et al., Science, 2015)、単一細胞レベルでのヒト oRG の大規模トランスクリプトーム解析 (Pollen et al., Cell, 2015) が行われ、oRG の増殖制御に特徴的なシグナル経路が明らかとされてきてい

る。しかしその一方で、そもそも個体発生の過程で oRG がどのようにして誕生するのか、「脳室面での aRG 分裂による oRG の誕生」を制御する分子機構は十分に解明されていなかった。また、細胞が脳室面から離れて移動する、という意味において、「oRG 誕生」と「分化細胞の離脱」には共通点があるものの、それらが生物学的に共通の枠組みで解釈されることはなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Lzts1 の機能を切り口とした細胞離脱の制御機構の解明である。合わせて、本分子が oRG 誕生に関与しているかについても注目した解析を行った。

3. 研究の方法

モデル動物としてマウスおよびフェレットを用いた。まず免疫電顕を含む免疫組織化学的手法によって詳細な Lzts1 局在の解析を行った。次に *in vivo* エレクトロポレーション法による大脳原基への遺伝子強制発現、siRNA によるノックダウン (KD)、CRISPR/Cas9 システムを利用した組織内細胞レベルでの *in vivo* ノックアウト (KO) 操作を行い、Lzts1 の発現レベルを人為的に変化させた場合の変化を観察することで Lzts1 の機能を検討した。必要に応じて阻害薬剤存在下での *in vitro* 実験を併用している。原子間力顕微鏡 AFM を用いた細胞の硬さ (Stiffness) 測定は研究協力者である長坂新氏 (名古屋大学: 当時) の協力のもと行い、また KO 下での脳室面からの aRG 分裂のライブ観察とフェレットを用いた *in vivo* エレクトロポレーションによる KO 実験は、理化学研究所生命機能科学研究センターとの共同研究として行った (研究協力者: 松崎文雄 チームリーダー、下向敦範 専門職研究員)。

4. 研究成果

本研究課題推進によって下記(1)-(4)が明らかとなった。

(1) Lzts1 はニューロン分化細胞の AJ に局在する

マウス単一細胞レベルでの遺伝子発現情報をもとに、aRG の分裂によって誕生するニューロンに分化する細胞が、その誕生後の早いタイミングで発現を上昇させる遺伝子の一つとして Lzts1 を同定した。Lzts1 は微小管の重合を阻害する作用があると報告される分子である。本研究では、まず Lzts1 の発現場所を調べるため免疫組織染色を行った。その結果から、Lzts1 はこれから脳室面から離脱しようとする幼若な分化細胞の、特に脳室面に面した突起の足先に局在するという極めて特徴的な発現パターンを示すことを見出した。また、電子顕微鏡を用いてより詳細に発現場所を調べたところ、ベルト状の細胞接着構造 (Adherens junction belt, AJ belt) の細胞の内側にその局在が観察されたことから、Lzts1 は分化細胞の細胞接着帯からの離脱に関係しているのではないかと考えられた。

(2) Lzts1 は分化細胞の離脱と MST を引き起こす

そこで、*in vivo* エレクトロポレーション法を用いて Lzts1 を発生期のマウス大脳へ強制的に発現させる実験を行った。結果、Lzts1 は細胞の分化状態そのものには直接的な影響をあたえない一方、Lzts1 を発現させたほぼ全ての細胞が脳室面から離脱すること、このとき多くの細胞が MST (mitotic somal translocation) と呼ばれる特徴的な分裂直前の素早い細胞体の動きを示すことを観察した。

分化細胞が離脱する過程では、細胞突起の足先を束ねているリング状の細胞接着構造物 (AJ

ring) がアクチン系系の活性化により収縮することが知られている。Lzts1 強制発現はこの AJ ring の収縮を強く促すとともに、その部位にある細胞を接着する分子 N-カドヘリンの発現も低下させていた。また、逆に、Lzts1 の発現を阻害する実験を行うと、分化細胞の脳室面からのすみやかな離脱と移動開始が損なわれることも明らかとなった。Lzts1 発現がアクチン系系の活性化作用を有することは、原子間力顕微鏡(AFM)を用いた培養細胞の細胞硬度測定によっても確認した。

これらの結果から、Lzts1 はこれから脳室面を離脱しようとする幼若な分化細胞の突起の足先に発現し、すみやかな離脱を促す実行役の分子として機能していることが明らかとなった(図3左)。

(3) 低レベルに発現する Lzts 1 により「斜め分裂」がおこる

次に、aRG における Lzts1 の機能に注目した。単一細胞レベルでの発現情報から、脳室面で分裂する神経前駆細胞 aRG の一部も Lzts1 を弱く発現しているものと予想された。そこで Lzts1 を低レベルで aRG に発現させる実験を行ったところ、多くの aRG が脳室面での分裂時に斜め分裂をするようになった。逆に、Lzts1 発現を阻害した aRG の分裂の様子を顕微鏡でライブ観察したところ、斜め分裂の頻度は明らかに減少していた。このことから、通常の発生過程でも Lzts1 の弱い発現が aRG の斜め分裂を引き起こしていることが明らかとなった。



(4) Lzts1 は外側放射状グリア(oRG)の誕生をもたらす

これまでの国内外の研究によって、MST や斜め分裂は外側放射状グリアの誕生を特徴づける細胞挙動であることが知られている。そこで、発生期のマウス脳で Lzts1 発現を阻害して外側放射状グリア様細胞の誕生を調べたところ、その割合は減少していた。oRG は発生期のマウス脳にはそれほど多くなく、一方で、大脳にシワを持つ生物種であるフェレット脳には豊富に存在することが知られている。このことから、さらに発生期のフェレット脳内で *in vivo* エレクトロポレーション法による CRISPR/Cas9 システムを用いた細胞レベルでの Lzts1 ノックアウト実験を行ったところ、確かに誕生する oRG の数が減少した。これらの一連の実験から、Lzts1 はニューロンに分化する細胞の脳室面からの離脱のみならず、aRG の斜め分裂を介した新たな oRG 誕生ももたらしていることが明らかとなった(図3右)。Lzts1 は微小管の重合を負に制御すると報告される分子である。さらに(2)で示したように Lzts1 は分化細胞内でアクチン系系を活性化する作用を有する。したがって、Lzts1 はこれら細胞骨格系の制御を介して、分裂期 aRG 内での中心体の側方への固定を減弱させることと、分裂期細胞の apical ring を狭めるという両者の作用によって aRG の斜め分裂を惹起しているものと推察された。

また、Lzts1 は霊長類であるマーモセットの脳組織でもマウスと似た発現パターンを示すこと、ヒトの oRG でも発現していることなどから、本研究で明らかとなった Lzts1 の機能はマウスからヒトまで保存されているものと予想された。

本研究成果の特徴は2つある。一つは、分化細胞の突起先端の AJ に特に強く局在する、脳室面からの離脱をもたらす実行役の分子を同定した点である。もう一つが、oRG 誕生と分化細胞（ニューロンおよび中間前駆細胞）の脳室面からの離脱という一見異なる2つの生命現象が、共通の分子機構で行われていることを示した点である。このことは結果として、脳の発生過程で「ニューロン産生能力を持った前駆細胞が脳室下帯 SVZ へ移動する」という現象を担保しているものと考えられる。

本課題研究の成果は研究代表者を責任著者として国際学術誌である Nature Communications 誌にて発表するとともに（Kawaue et al. Nat Commun, 2019）、国際学会やシンポジウム等で報告を行った。本論文は生物学・医学分野における重要論文として F1000Prime の推薦論文に選出されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kawaue T., Shitamukai A., Nagasaka A., Tsunekawa Y., Shinoda T., Saito K., Terada R., Bilgic M., Miyata T., Matsuzaki F., Kawaguchi A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Lzts1 controls both neuronal delamination and outer radial glial-like cell generation during mammalian cerebral development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2780
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-10730-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ayano Kawaguchi	4. 巻 138
2. 論文標題 Temporal patterning of neocortical progenitor cells: How do they know the right time?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 3~11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2018.09.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 K.Saito, R. Kawasoe, H. Sasaki, A. Kawaguchi and T. Miyata	4. 巻 43
2. 論文標題 Neural progenitor cells undergoing Yap/Tead-mediated enhanced self-renewal form heterotopias more easily in the diencephalon than in the telencephalon.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochem Res	6. 最初と最後の頁 171-180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1007/s11064-017-2390-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Arata Nagasaka, Tomoyasu Shinoda, Takumi Kawaue, Makoto Suzuki, Kazuaki Nagayama, Takeo Matsumoto, Naoto Ueno, Ayano Kawaguchi, Takaki Miyata	4. 巻 4
2. 論文標題 Differences in the mechanical properties of the developing cerebral cortical proliferative zone between mice and ferrets at both the tissue and single-cell levels.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Front.Cell Dev.Biol	6. 最初と最後の頁 139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2016.00139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 林祐希、宮田卓樹、川口綾乃
2. 発表標題 Lzts1による前駆細胞の位置移動が脳皮質ニューロンの運命に与える影響
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ayano Kawaguchi
2. 発表標題 Molecular mechanisms that control the generation of outer radial glia
3. 学会等名 German-Japanese Developmental Neuroscience Meeting 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ayano Kawaguchi
2. 発表標題 Molecular mechanism controlling generation of outer radial glia during cerebral development
3. 学会等名 52nd annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (JSDB)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口綾乃
2. 発表標題 大脳発生におけるouter radial glia誕生の制御機構
3. 学会等名 中部幹細胞クラブ シンポジウム2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林祐希、宮田卓樹、川口綾乃
2. 発表標題 Lzts1による前駆細胞の位置移動が大腦皮質ニューロンの運命に与える影響
3. 学会等名 第79回日本解剖学会中部支部学术集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayano Kawaguchi
2. 発表標題 Unified control of neuronal delamination and oRG generation by Lzts1.
3. 学会等名 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口綾乃
2. 発表標題 Unified control of neuronal delamination and outer radial glial generation during cerebral development.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口綾乃
2. 発表標題 大腦発生におけるニューロン分化に伴う脳室面からの細胞離脱とouter radial glia誕生を制御する共通の機構
3. 学会等名 「次世代脳」合同若手シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 A Kawaguchi
2. 発表標題 Cellular departure from the apical surface in the developing brain
3. 学会等名 International Young Scientists Workshop on Neural Development and Stem Cells 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>名古屋大学プレスリリース 「発生期の脳で分化細胞と未分化細胞の移動開始をもたらす共通の分子を明らかに～『脳のシワ』形成に貢献する外側放射状グリアはどのように誕生するか」 https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/research/pdf/Nat_Com_190625.pdf</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	川上 巧 (KAWAUE Takumi)		
研究協力者	松崎 文雄 (MATSUZAKI Fumio)		
研究協力者	下向 敦範 (SHITAMUKAI Atsunori)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	宮田 卓樹 (MIYATA Takaki)		
研究協力者	長坂 新 (NAGASAKA Arata)		