

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 6月20日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21627

研究課題名(和文) 発生期大脳皮質を織り成す神経幹細胞の形態と配置

研究課題名(英文) Structural organization of neural stem cells in the development of cerebral cortex

研究代表者

藤田 生水 (Fujita, Ikumi)

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・基礎科学特別研究員

研究者番号：80615138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、哺乳類大脳皮質発生において、神経幹細胞radial glia(RG)の上皮極性を持った特徴的な形態が、分裂によってどのように維持されているのか、またその形態を維持する機能に変化が生じることによって組織構造にどのような影響を及ぼすのかということについて解析した。RGは増殖期において柔軟な形態的自己複製能を有しており、分裂面の角度を擾乱して頂端面を失う分裂を誘導しても、頂端面を再形成する性質を持つということが明らかになった。この性質は神経産生期には減弱しており、それによりRGが脳室帯から離脱することができ、脳室帯外の新たな幹細胞層の形成につながることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanism of morphological self-renewability of radial glia (RG) during the development of the mammalian cerebral cortex, and the importance of this ability on the tissue architecture. We found that RG has the ability to regenerate the apical endfoot, even if it is lost by the perturbation of the spindle orientation, at the proliferative stage of the brain development. We also found that this morphological robustness is reduced at the neurogenic stage, suggesting that the change in morphological self-renewability is a key to understand the mechanism of the generation of outer RG, which forms an additional proliferation zone, OSVZ, at the late stage of the neurogenesis.

研究分野：発生生物学

キーワード：神経幹細胞の対称分裂 大脳新皮質発生 接着結合 ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の大脳新皮質発生において、神経細胞を産み出す神経幹細胞である radial glia (RG) は、厚いシート状の大脳皮質の頂端-基底両面を橋渡しするような上皮極性を持ち、構造的な秩序を保ちながら分裂を繰り返す。大脳皮質発生初期にあたる増殖期において RG は自己複製的な対称分裂を行い、大脳皮質の面積を拡大させる。この際、対称分裂によって生み出される二つの娘細胞は、特徴的な細長い上皮構造を保存する。一方、発生が進んで神経産生期に入ると、RG は一つの RG と一つの分化する細胞を生み出す非対称分裂を行う。非対称分裂によって生み出される RG は、形態を保存しつつ非対称分裂を繰り返して、様々な神経細胞を順次産生する (Noctor, 2001; Miyata, 2001)。

RG の上皮形態は、脳を建築する際の足場として欠かすことができない。RG から生み出された神経細胞が皮質の外縁部に積層する際、新生神経細胞は RG を伝って遊走し、適切な場所に配置される。また、RG の基底側に伸びる突起は、RG の自己複製能と強く関連し、幹細胞性を維持するために極めて重要な機能を持つと考えられている (Konno, 2008; Shitamukai, 2011)。さらに、無数の紐のような神経幹細胞が組織の頂端、基底両面を橋渡しする構造は、組織に特徴的な物性を付与し、組織の発達に伴う形態変化や細胞の移動様式に影響を及ぼすことが想定される。このように、大脳皮質の発生を理解する上で RG の形態維持は極めて重要な要素であるにもかかわらず、そのメカニズムや性質については詳細に分かっていなかった。また組織全体のなかで、RG 同士がどのように配列し、発生に伴ってその配列を変化させるのかについては、理解が進んでいなかった。

2. 研究の目的

本研究は大脳皮質の発生期における RG の形態的な変化を詳細に明らかにし、組織の構造的な恒常性が保たれる機構の解明を目指した。本研究の開始時においては、RG の振る舞いについて注目すべき点は複数存在し、組織の構造的な恒常性維持において本質的な要素は必ずしも明確ではなかったが、研究の進展に伴って頂端側構造の維持機構を解明することが哺乳類の大脳皮質発生を理解する上で極めて重要な意義を持つことが判明し、主に以下に記す点について詳細に明らかにすることを目指した。

(1) RG が対称・非対称分裂を行う際に、その

細長い上皮性の形態がどのように維持され、または変化するのか

先行研究において、RG は非対称分裂を行う際に紡錘体を頂端面に対して概ね水平方向に形成することが判明しており、これによって頂端面を二分するように分裂面を形成し、二つの娘細胞に頂端面を受け継がせることができることが分かっていた (Konno, 2008)。つまり、RG の頂端側構造は、紡錘体の角度を水平に維持する機構によって保障されていると言える。しかしながらこの機構は紡錘体角度のゆらぎに対して脆弱であり、実際に紡錘体角度が大きくゆらぐ *LGN* 変異体においては、多数の RG が神経産生期に頂端側構造を失うことで頂端面から離れ、脳室帯の外側に異所的な幹細胞 (outer RG, oRG) の層を形成することが分かっていた。この outer RG は、野生型マウスではあまり見られないが、ヒトを含む大きくシワのある脳を持つ哺乳類では、大脳皮質発生の後期に多数見られるようになり、外脳室下帯という増殖層を形成することが明らかになっている (Smart, 2002; Hansen, 2010; Fietz, 2010)。

ところが、より発生の早いステージである増殖期においては、*LGN* 変異体によって紡錘体角度が擾乱されても outer RG が出現せず、紡錘体角度に依存せずに頂端側構造を維持する仕組みが存在することが示唆されていた。本研究では、この現象の詳細を調べることで RG の形態維持機構を解明できると考え、解析を行った。

(2) 発生の進行にしたがって RG の形態維持機構はどのように変化し、組織構築や発生様式に影響を与えるのか

上記の予備的な観察結果は、発生の時期に応じた RG の細胞形態を維持する機能が次第に失われてゆくことを示唆していた。そのような形態的な恒常性維持機構の喪失は、脳の発生においてどのような意義を持つのか、という点に関して、実験的に検証を行った。

3. 研究の方法

(1) 増殖期のマウス大脳皮質の培養観察技術の確立

RG の分裂に伴って引き起こされる形態変化を、大脳皮質発生の増殖期において詳細に明らかにするため、二光子顕微鏡を用いたタイムラプスイメージングにより、組織を培養しながら細胞動態を詳細に解析することを試みた。そのために、これまで非常に困難であった増殖期大脳皮質のスライス培養法の条件検討を行った。

次に頂端側構造の観察に適した蛍光マーカー並びに観察法の検討を行った。蛍光マーカーとして用いるトランスジェニックマウスの使用に関しては、理研 CLST 動物資源開発室の協力を得た。

(2) 増殖期大脳皮質における頂端面動態の定量的解析

RG の頂端側構造がどのように維持されているのかについては、頂端面の動態を追跡することで推定することができる。上記で確立したスライス培養観察技術を用いて、増殖期から神経産生期に至る複数の発生ステージの組織を観察し、頂端面の分裂や喪失、再形成等の現象について定量的に解析した。この際、紡錘体角度に依存しない頂端面の維持機構を顕在化させるため、LGN 変異体を用いることで紡錘体角度を擾乱させた。

また、LGN 変異体の組織において見出した特徴的な細胞構造について、その構成因子や動態について解析を行った。

(3) 頂端側構造の維持機構の発生における意義の解析

マウスにおいては、神経発生後期に RG が頂端側構造を失うと、脳室帯から離れて outer RG になることが示されていた (Konno, 2008; Shitamukai, 2011; Wang, 2011)。したがって、一度失われた頂端側構造を維持しようとする性質は、outer RG を生み出す時期には消失しているのではないかと推察された。通常のマウスの脳発生過程においては outer RG はわずかしこ出現しないが、マウスと比べてより大きくシワのある脳を形成するフェレットにおいては、発生期に多数の outer RG が出現することが分かっている。そこで、子宮内電気穿孔法によって胎仔脳への遺伝子導入が可能であるフェレットを用いて、outer RG が生み出される時期に頂端側構造の再形成能を活性化する実験を行った。Notch シグナルの活性化が、神経幹細胞の自己複製的対称分裂を促進すると同時に上皮構造の再形成を促進することが示唆されていたので、Notch シグナルを強制的に活性化させる Notch intracellular domain (NICD) をフェレット胎仔脳に導入して、outer RG の形成効率を解析した。

4. 研究成果

マウス胎仔脳組織のスライス培養法の条件検討を行い、RG の対称分裂がまだ盛んに見られる脳発生初期の組織を、組織構造や細胞分裂能を良好に保ったまま長時間培養できる系を構築した。さらに、頂端面の動態と細

胞形態の変化を詳細に追跡するための蛍光マーカーを発現するトランスジェニック・マウスの系統を検討し、タイムラプスイメージングの実験系を確立した。

増殖期の組織を一定時間観察すると、9 割以上の頂端面が分裂によって数を増やしている様子が捉えられた。この際、一部の頂端面は、頂端面から離れた位置から細胞が細い突起を伸張して陥入することで新規に形成されていることが見出された。

次に、RG の分裂面の角度を擾乱するために、LGN 変異体を用いて解析した。RG の紡錘体角度は、野生型においては増殖期から神経発生後期に到るまで頂端面に対してほぼ水平方向であったが、LGN 変異体においてはほぼランダムとみなせる程度にゆらいていることを確認した (Konno, 2008)。頂端面の動態をタイムラプスイメージングによって解析したところ、頂端面を非対称に受け継ぐ分裂は野生型では数%しか観察されなかったが、LGN 変異体においてはいずれの発生ステージにおいても 4 割ほどに増加していた。すなわち、LGN 変異体においては、RG の分裂によって生み出される娘細胞のうち、およそ 2 割ほどの細胞が頂端面を一度は失うことが分かった。

しかしながら、増殖期の LGN 変異体の組織学的解析から、大脳皮質の上皮構造は一見して正常に保たれており、異所的な分裂も観察されなかった。また、増殖期に分裂角度が異常になると非対称分裂を促進し、あるいは細胞死を誘導するという従来より提唱されていた説は、LGN 変異体の表現型と明らかに矛盾しており、本研究はこれらの説に疑問を提唱した。

LGN 変異体で頂端面を失う分裂が増加しているにも関わらず RG の上皮性が保たれている原因を明らかにするため、増殖期における頂端突起の由来をタイムラプスイメージングにより定量的に解析した。すると、LGN 変異体においては、頂端面に新規に侵入して形成された頂端突起が多く存在することが分かった。さらに神経産生期においても同様の解析を行ったところ、このような頂端面の新規形成は、稀にしか観察されなかった。細胞形態の観察等も踏まえ、増殖期にある LGN 変異体においては、一度頂端突起を失った RG が、頂端構造を再形成することで、元の形態を取り戻していると結論した。このような形態における恒常性維持機能が RG に存在することで、LGN 変異体で紡錘体角度が擾乱されても、増殖期には異所性の outer RG へと変

換することがないと推察された。頂端面を失う分裂の割合と、頂端面を新規形成する細胞の割合の定量的解析結果は、この解釈と非常によく整合していた。一方、本研究により、神経産生期になるとそのような RG の形態的な恒常性維持機能は減弱することも見出された。この事実によってもまた、LGN 変異体で神経産生期になると異所性の outer RG が観察されるようになることを説明できると考えられた。

以上のことから、頂端面再形成能は outer RG の産生に対して抑制的効果を持つと言うこともできるが、この性質は、マウスでは LGN 変異体においてはじめて顕在化するものであった。しかし元来 outer RG を発生期に生じることが知られるヒトを含むその他の哺乳類においては、より積極的な意味を持つと考えられた。そこで次に、マウスと比べると非常に大きく、シワのある脳を形成するフェレットを用いて、神経産生期の RG に形態的恒常性維持能を付与することが、outer RG の産生にどのような影響を及ぼすのかを調べた。NICD を子宮内電気穿孔法で導入して過剰発現させることで、RG の自己複製的対称分裂を促進し、形態維持機能を活性化させた。すると、NICD を導入した神経幹細胞のうち、脳室帯に留まる幹細胞の割合が上昇し、outer RG の割合が減少していた。これらのことから、哺乳類の大脳皮質発生において、RG は増殖期には上皮形態を積極的に維持しようとすることで組織構造の秩序を保つ一方、神経産生期にはその能力を減弱させることで outer RG 産生の効率を高め、外脳室下帯という新たな増殖の場を形成するという新たな視点を提唱した。

参考文献

Noctor, *et al.*, *Nature*, 2001
Miyata, *et al.*, *Neuron*, 2001
Konno, *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, 2008
Shitamukai, *et al.*, *J. Neurosci.*, 2011
Smart, *et al.*, *Cereb. Cortex*, 2002
Hansen, *et al.*, *Nature*, 2010
Fietz, *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 2010
Wang, *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 2011

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- ① 藤田 生水, 松崎 文雄, 哺乳類の発生期大脳における神経幹細胞の形態的恒常性, *細胞*, 査読無, Vol. 50, No. 7, 2018, pp. 375-378
- ② Yuji Tsunekawa, Raymod Kunikane

Terhune, Ikumi Fujita, Atsunori Shitamukai, Taeko Suetsugu, Fumio Matsuzaki, Developing a *de novo* targeted knock-in method based on *in utero* electroporation into the mammalian brain, *Development*, 査読有, Vol. 143, 2016, pp. 3216-3222, DOI:10.1242/dev.136325

〔学会発表〕(計3件)

- ① Ikumi Fujita, *et al.*, Induction of outer radial glia by the random spindle orientation causes severe microcephaly in the *Aspm* mutant mice, ASCB|EMBO 2017 Meeting, 2017年12月2日~2017年12月6日, Philadelphia (USA)
- ② Ikumi Fujita, *et al.*, Induction of outer radial glia by the random spindle orientation causes severe microcephaly in the *Aspm* mutant mice, EMBO Conference: Gene regulatory mechanisms of neural fate decisions, 2017年9月7日~2017年9月10日, San Juan de Alicante (Spain)
- ③ 藤田 生水 他, The loss of the *Aspm* function causes severe microcephaly in the mice with the induced outer subventricular zone progenitor-like cells, 分子生物学会第39回年会, 2016年11月30日~2016年12月2日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

〔その他〕

所属研究室ホームページ
<http://www.cdb.riken.jp/cas/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 生水 (FUJITA, Ikumi)

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・基礎科学特別研究員

研究者番号: 80615138