

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19399

研究課題名(和文)新規スクリーニング法の開発による、中枢神経構成細胞の量的比率の決定機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism for the determination of the size of the central nervous system by developing a new screening method

研究代表者

笹井 紀明(SASAI, NORIAKI)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：80391960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：いかなる動物も、個体はそれぞれの種に特異的な大きさを持ち、また個体サイズに合ったサイズで器官が体に備わっている。さらにそこに含まれる、さまざまな機能を持った細胞は、ある一定の量比(細胞数の比率)をもって存在する。この現象から、各器官は細胞の比率を一定に保ちながら、器官の大きさが決まるといふ2つの機構を同時に満たしながら発生し、機能を獲得することが示唆される。

本研究では、近縁種であるニワトリとウズラ胚に着目し、その発生における遺伝子の差異を調べた。その結果、ほとんどの遺伝子の発現量が同等である一方で、神経分化や増殖に関する遺伝子の一部の発現量が異なっていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

器官サイズは個体のサイズに対応して決定されるものであるが、その決定のメカニズムは現在のところよく知られていない。本研究は脊椎動物における器官サイズの決定メカニズムの一端を明らかにしたものである。器官構築は、細胞の増殖と分化のバランスによって起きるが、そのバランスが崩壊すると腫瘍化や器官の形成不全を引き起こすものであるから、このメカニズムの理解は重要である。

研究成果の概要(英文)：Each animal has a size that is peculiar to each species, and the body has organs of a size that matches the size of the individual. Furthermore, the cells having various functions contained therein exist with a certain quantitative ratio (ratio of cell numbers). From this phenomenon, it has been suggested that each organ satisfies the following two mechanisms; determination of the organ size and keeping the cell ratio. In this study, we focused on chick and quail embryos, which are evolutionally close species, and investigated the differences in the gene expression during their development. As a result, we found that the expression levels of most genes were the same, but the expression levels of some of the genes involved in neural differentiation and proliferation were different.

研究分野：発生生物学

キーワード：神経管 ニワトリ胚 ウズラ胚 mRNAシーケンス法 増殖と分化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

いかなる動物も、個体はそれぞれの種に特異的な大きさを持ち、また個体サイズに合ったサイズで器官が体に備わっている。さらにそこに含まれる、さまざまな機能を持った細胞は、ある一定の量比(細胞数の比率)をもって存在する。この現象から、各器官は「細胞の比率を一定に保つ」つまりスケールリングと、「器官の大きさが決まる」というサイズセンシングの2つの機構を同時に満たしながら発生し、機能を維持することが示唆される。

脊椎動物において、「器官サイズ」を制御するシグナル因子で代表的なものは、Hippo/Yap と呼ばれる因子が仲介するものである。このシグナル経路の構成因子の発現を減弱または過剰にすると、器官に腫瘍が発生したり形成不全を起こしたりするため、いわゆるサイズ決定因子として知られている。しかし、この働きは器官特異的であり、個体全体において器官のサイズやスケールリングを調節する因子やメカニズムは他にも多数存在すると思われる。

植物やショウジョウバエでは、このような個体サイズを決める因子が、主に変異体スクリーニングによって探索され、単離された遺伝子の機能解析が進んでいる。しかし、脊椎動物を用いた変異体スクリーニングは現実的ではないため、スケールリングやサイズセンシングに関与する遺伝子を単離するためには、方法論的にも新規のスクリーニングが必要である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、種特異的な器官サイズを決定する遺伝子を単離し、その機能を明らかにすることである。器官サイズは、そこに含まれる細胞数とある程度相関があると思われるが、間葉系細胞を多く含む器官は細胞外マトリクスや結合組織も器官サイズに寄与するため、遺伝子発現や細胞動態から器官サイズを直接議論することが難しい。そこで、器官のほとんどが上皮系細胞からなり、強い細胞間相互作用が存在することが期待される中枢神経系をモデルに、その器官サイズが決まるメカニズムを明らかにしようと考えた。

### 3. 研究の方法

上記のように、脊椎動物で変異体スクリーニングを実行し、サイズの異なる胚や個体を見つけることは難しい。そこで、ニワトリと、その近縁種であるウズラの発生を比較することにした。ニワトリとウズラはいずれも鳥類でゲノム配列が酷似しており、その発生や胚の形態は互いに類似性が高い。その一方、成鳥ではニワトリは体高が60cm、体重が2kg以上になるのに対し、ウズラはそれぞれ15cm、100g程度と、大きく異なる。この違いは、ゲノム構造や胚発生から予測すると、ゲノム構造や胚発生上の根本的な違いというよりは、比較的小さな違い(遺伝子の発現レベルや制御ネットワークの違い)によるところが大きいと考えられる。そこで、両種の神経管の発生を詳細に比較し、サイズ変化が起こり始める時期に発現する遺伝子の発現量を比較することによってサイズ制御のメカニズムを探ることにした。

評価の方法は、主に脊髄レベルの神経管の断面における抗体染色法と、RNAシーケンス法による網羅的発現解析によった。

なおこれらの実験は、学内倫理委員会ならびに関係法令を遵守し、倫理的かつ安全に最大限配慮して行った。組換えDNA実験は、遺伝子組み換え実験計画が学長より承認されており(承認番号311「モデル動物を使用した神経発生学に関する研究」)、「遺伝子組換え生物等安全管理規程」により実験が進められた。また動物実験は、学内委員会に申請・承認された実験内容(第1636号「鳥類胚を用いた、神経発生に関与する遺伝子の解析」)を「動物実験等の実施に関する規程」に則って倫理的に行った。

### 4. 研究成果

(1) ニワトリとウズラの胚ならびに神経管は相似性を保って発生する。

まず、そもそもニワトリとウズラの胚が同等、または類似の過程を経て発生するかを検証するため、発生2日目から4日目までの各種の脊髄レベルの神経管の断面を調製し、神経管に発現する遺伝子のパターンと細胞数の変化を解析した。その結果、発生2日目では事実上両種の胚の大きさや発現遺伝子の違いを見出すことはできず、両種の初期胚の大きさや遺伝子発現は、少なくとも神経発生においては違いがないことが明らかになった。その一方、発生3日目から胚の大きさに違いが見られるようになり、4日ではニワトリ胚の体長がウズラに比べて1.5倍程度、体積レベルでは3倍以上変化していた。発生の進行としては、ニワトリがウズラに比べてステージが1つ進むのに2倍程度かかることになり、緩やかになることが明らかになった。ただし、同等のステージで両種の神経管を比較すると、そのパターンはスケールリングの関係になっていることがわかり、発生自体は両種で共通することが明らかになった。

(2) ニワトリとウズラの胚では、神経管における前駆細胞の増殖と神経分化の比率が異なる。

次に、発生3日目に両種で胚の大きさが異なり始める時期について解析を行った。神経管は、発生2日目に形成された後、3日目までは前駆細胞が活発に増殖するが、3日目からは、前駆細胞の増殖に加えて神経分化(機能を獲得する過程)が起きる。前駆細胞は増殖を続ける一方、分化した細胞は増殖せず、神経管全体の細胞数はこの前駆細胞と分化細胞の合計数によって決定される。

そこで、この比率について調べるため、Sox2(前駆細胞)とp27(神経細胞)の割合を調べた

ところ、ニワトリ胚においては、神経分化が起こり始めるステージに達してから、p27 陽性細胞は増加するものの、Sox2 陽性細胞の増殖が続いていた。一方ウズラ胚においては、Sox2 陽性細胞が早く p27 陽性細胞に変化するという現象が見られた。したがって発生過程において、早く、小さい神経管が形成されることが明らかになった。

これらの結果から、ニワトリとウズラ胚の神経発生においては、神経管の前駆細胞の増殖と文化の比率の違いによって起きることが明らかになった。

(3) ニワトリとウズラの胚では、サイクリン関連遺伝子の発現量が異なり、これが神経管の増殖効率を変更させる一因になっているらしい。

上記の結果から、神経管の発生において、神経分化が始まる時期から遺伝子の発現量が変化し、それが神経管のサイズに変化をもたらすことが示唆された。そこで、神経分化が始まる時期に発現する遺伝子に発現量の違いを明らかにするため、このステージにおけるニワトリ、ウズラ胚のそれぞれから神経管を単離し、その神経管の両者で発現量を mRNA シーケンス法によって明らかにすることにした。

それぞれ 10 個の胚から RNA を単離し、各々 2 マイクログラム程度の RNA を回収した。この RNA に対して、mRNA シーケンス法を実施し、遺伝子発現の比較を行った。その結果、95% 以上の遺伝子は発現量が同等であったが、300 程度の遺伝子に関しては発現が見られなかった。予想したように、分化に関与する遺伝子はウズラの方が高く、増殖に関与する遺伝子の発現量はニワトリの方が高かった。この中で、ニワトリ胚に発現する遺伝子 CyclinD1 は、これまで細胞増殖に関与することが明らかになっているものである。また、Wnt やソニック・ヘッジホッグシグナルによって発現が誘導される遺伝子としても知られている。そこで、ウズラ胚にこの遺伝子を導入したところ、たしかに前駆細胞の増殖が亢進し、神経分化が一部抑制される結果となった。

このことから、発現量の異なる遺伝子が細胞増殖を制御し、それが器官サイズに関与するというメカニズムの一端が明らかになった。

現在、CyclinD1 に上流制御系を解析し、Wnt やソニック・ヘッジホッグシグナルの発現量が同一である一方で CyclinD1 の発現量が異なる理由について検討している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 笹井紀明	4. 巻 -
2. 論文標題 神経誘導	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 脳科学辞典	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14931/bsd.2114	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 笹井紀明	4. 巻 -
2. 論文標題 ソニック・ヘッジホッグ	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 脳科学辞典	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14931/bsd.7348	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 Sasai N, Toriyama M, Kondo T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Hedgehog Signal and Genetic Disorders.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 1103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fgene.2019.01103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kadoya M, Sasai N.	4. 巻 13
2. 論文標題 Negative Regulation of mTOR Signaling Restricts Cell Proliferation in the Floor Plate.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1022
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2019.01022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yatsuzuka A, Hori A, Kadoya M, Matsuo-Takasaki M, Kondo T, Sasai N.	4. 巻 146
2. 論文標題 GPR17 is an essential regulator for the temporal adaptation of sonic hedgehog signalling in neural tube development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev.176784
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.176784.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 笹井 紀明、吉鷹 玲奈
2. 発表標題 脊椎動物の神経管サイズを決定する分子メカニズム
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉鷹 玲奈、笹井 紀明
2. 発表標題 生物種に特有の神経管サイズを制御する分子メカニズム
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八塚 敦輝
2. 発表標題 GPR17によるソニックヘッジホッグシグナルの負のフィードバック制御機構が与える神経管パターン形成への影響
3. 学会等名 ConBio 2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----