

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06253

研究課題名(和文) 哺乳動物の脳発生・脳進化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms underlying mammalian brain development and evolution

研究代表者

大塚 俊之(Ohtsuka, Toshiyuki)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：20324709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経幹細胞・前駆細胞でShhまたは活性型Smoothenedを高発現するトランスジェニックマウスにおいて、神経幹細胞の増殖促進、脳室・脳室周囲帯の拡大、脳表面積の顕著な拡大、脳表の皺状構造を認めた。更にHes遺伝子を共発現させることにより表現型の増強を認めた。また、TransthyretinプロモーターおよびF3Fugu0tx2プロモーターを用いて、脈絡叢特異的に遺伝子発現するマウスを作製し、脈絡叢上皮細胞から任意の液性因子を分泌可能であることを示した。脈絡叢特異的にShhを強制発現するマウスでは、脈絡叢上皮細胞の増殖促進による脈絡叢サイズの増大と、大脳皮質神経幹細胞の増殖促進効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では神経幹細胞・前駆細胞における遺伝子発現を任意に制御可能な各種トランスジェニックマウスを作製し、大脳皮質形成への影響を解析した。Hes遺伝子による神経幹細胞の未分化性維持とShhシグナルによる細胞増殖促進効果を組み合わせることにより、大脳皮質表面積の顕著な拡大がもたらされ、哺乳動物の脳の進化(大脳新皮質の拡大=大脳化)メカニズムの一端を担う可能性が示唆された。また、脈絡叢特異的に遺伝子発現を制御するシステムを構築し、脈絡叢から任意の液性因子の分泌が可能であること、Shhシグナルにより脈絡叢サイズの増大がもたらされることを明らかにし、脳進化過程における脈絡叢の発達の意義の一端を示した。

研究成果の概要(英文)：We observed a promoted proliferation of neural stem cells (NSCs), expansion of ventricles and the ventricular zone, marked expansion of the brain surface area, and foldings on the brain surface in the transgenic (Tg) mice in which high levels of Shh or constitutively active form of Smoothened were expressed by NSCs and neural progenitors. Furthermore, we observed that co-overexpression of Hes genes could enhance those phenotypes. In addition, we showed that the secretion of soluble factors from the choroid plexus epithelial cells (CPECs) could be achieved in the Tg mice in which choroid plexus-specific gene expression was manipulated by using the promoters of Transthyretin or F3Fugu0tx2. The Tg mice showing a choroid plexus-specific Shh expression exhibited an increase in the size of choroid plexus owing to an enhanced proliferation of CPECs, in addition to a promoted proliferation of NSCs in the neocortical area.

研究分野：発生生物学

キーワード：脳発生 脳進化 神経発生 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

幹細胞の維持・分化制御メカニズムの理解は、発生学、再生・修復医学や癌研究分野など、広汎な領域において重要な課題である。また、初期哺乳類から霊長類に至る脳の進化(大脳新皮質の拡大=大脳化)のメカニズムを解明する上でも重要である。

我々のこれまでの研究により、哺乳動物の中樞神経系において bHLH 型転写因子である Hes が Notch シグナルの下流因子としてニューロンへの分化を抑制すること (Ohtsuka et al. 1999)、Hes が神経幹細胞の維持に関与していることが示された (Ohtsuka et al. 2001)。この Notch-Hes シグナル経路の活性を制御することにより、幹細胞の維持と分化制御が可能になると考えられる。そこで Hes の発現制御が脳の発生と形態形成にどのような影響を及ぼすかを更に詳細に解析するために、Tet-On system を用いたトランスジェニック(Tg)マウスを作製し、脳の神経幹細胞において任意の時期に目的の遺伝子を発現させ、脳形態形成への影響を解析した (Bansod et al. 2017) (図 1)。その結果、Hes1, Hes5 を高発現する Tg マウスでは神経幹細胞が維持され、脳室および脳室周囲帯の拡大を認めた。しかし Hes1, Hes5 の高発現により細胞増殖は抑制され、大脳皮質ニューロンの増加は認められず、脳のサイズは野生型と比較して小さくなっていた。初期哺乳類から霊長類に至る脳の進化過程(大脳新皮質の拡大=大脳化)を再現するためには、増加した神経幹細胞の活発な増殖を維持し、長期にわたってニューロン産生を続ける必要があると考えられた。

2. 研究の目的

大脳皮質ニューロン数の増加および大脳皮質表面積の拡大を目的として、Hes によって発現が抑制される細胞周期関連因子 (Ccn1/Cdk4 等) を Hes と同時に発現させ、増殖抑制を解除することにより、脳のサイズの増大が誘導されるか検討する。また、大脳皮質領域における神経前駆細胞の増殖を促進することが知られている Shh (Sonic hedgehog) または Shh シグナルのエフェクターである Smoothened (Smo) の活性型 (human SmoM2 (hSmoM2)) を発現する Tg マウスを作製し、神経幹細胞・前駆細胞の増殖促進、脳室および脳室周囲帯の拡大、大脳皮質表面積の拡大に与える影響を解析する。更に Hes 強制発現マウスとの掛け合わせにより、神経幹細胞・前駆細胞の未分化性を維持しながら増殖を促し、より多くの大脳皮質ニューロンが産生され大脳皮質表面積が拡大する条件を検討し、哺乳動物の脳の進化メカニズムの解明に繋げる。

齧歯類(マウス・ラット)の胎児脳と比較して霊長類(サル・ヒト)の胎児脳では脈絡叢の発達が著明であり、脈絡叢からの分泌因子が大脳化に寄与している可能性がある。そこで、rtTA および他の候補遺伝子を脈絡叢特異的に発現させるための発現制御領域(エンハンサーおよびプロモーター:単独あるいは複数の組み合わせ)を検討し、Tet-On Tg マウスの作製等により、脈絡叢特異的な遺伝子発現が誘導可能か検討する。また、このシステムを用いて候補因子(分泌因子)を脈絡叢から脳脊髄液(CSF)中に分泌させることで、脳形態形成における各因子の機能を解析する。更に Notch シグナル・Shh シグナルの増強等により、脈絡叢前駆細胞の増殖促進および脈絡叢サイズの増大が可能か検討し、脈絡叢の発達および脈絡叢から分泌される液性因子が、霊長類脳における神経幹細胞の増加と脳のサイズの増大に寄与した可能性について検討する。

3. 研究の方法

Tet-On システムを用いて神経幹細胞・前駆細胞における遺伝子発現を任意に制御可能な各種トランスジェニックマウスを作製し解析した。また、脈絡叢特異的プロモーターを探索し、脈絡叢特異的な遺伝子発現を制御可能か、また脈絡叢から任意の液性因子を分泌させることが可能か検討した。

(1) 生後および成体の Hes1 強制発現マウスの脳室下帯において、多数の神経幹細胞が維持されていたが、胎生期から生後にかけて細胞分裂回数が少ない神経幹細胞が成体神経幹細胞として維持されると報告されている。そこで胎生期に EdU を投与し、EdU ラベルを維持した細胞と Hes1 の発現量の相関を解析した。

(2) Hes1 強制発現マウスでは神経幹細胞・前駆細胞の増殖が抑制されており、大脳皮質ニューロンの数は減少し、脳のサイズは野生型と比べて小さくなる。そこで、Hes1 によって発現が抑制される細胞周期関連因子(Ccn1/Cdk4)を神経幹細胞において Hes1 と同時に発現させる Tg マウスを作製し、大脳皮質形成における影響の解析を行った。

(3) Tet-On システムを用いて、Shh または Shh シグナルのエフェクターである Smoothed (Smo) の活性型 (human SmoM2 (hSmoM2)) を発現する Tg マウスを作製し、大脳皮質形成および脳表の皺状構造について解析を行った。

(4) 脈絡叢特異的に rtTA を発現させるため、マウス Transthyretin (Ttr) プロモーターおよび Fug0tx2 プロモーターと F3 転写制御領域をつないだ F3Fugu0tx2 プロモーターを用いて Tg マウスを作製し、脈絡叢特異的な遺伝子発現が誘導できているか、またこれにより Shh 等の液性因子を脈絡叢から分泌させることで、脳形態形成に影響を及ぼすことが可能か検討した。

4 . 研究成果

(1) Hes1 の高発現を維持したマウスでは、成体脳の脳室下帯においてより多くの EdU ラベル保持細胞が認められ、これがニューロン分化能を持った神経幹細胞の増加に繋がることが示唆された。一方、野生型マウスの終脳背腹境界および腹側の脳室下帯における EdU ラベル保持細胞と Hes1 発現量においては明らかな相関が認められなかった (Ohtsuka et al., 2021)。

(2) Ccnd1/Cdk4 強制発現マウスにおいては Hes1 の高発現による細胞増殖能の低下が抑制されたが、大脳皮質の顕著な増大は認めなかった。

(3) Shh および hSmoM2 強制発現マウスにおいて Doxycycline (Dox) 投与量と投与タイミングの最適化により、神経幹細胞・前駆細胞の増殖が促進され、胎児脳における脳室および脳室周囲帯の拡大、脳表面積の顕著な拡大が認められた (Shqirat et al., 2021 および投稿準備中)。また Hes (mouse Hes1, human HES4 or mouse Hes5) と hSmoM2 をダブルで強制発現することにより、これらの表現型の増強を認めた。

更に、発生後期から出生時において Dox の投与を中止することにより、生後および成体脳において一部皺状の構造が認められた。Dox を胎生 11.5~12.5 日目から投与した際に再現性良く脳の皺状の構造が認められ、その形成パターンにも共通性が認められた。そこで皺状構造と大脳皮質層構造との関連および脳領野との関連を調べるため各層のニューロンのマーカーを用いて免疫組織染色を行ったところ、皺状構造を境界として大脳皮質層構造の違いが観察され、皺状構造と層構造および脳領野との関連が示唆された。

(4) pTtr-rtTA Tg および F3Fugu0tx2-rtTA プロモーターを用いて、脈絡叢上皮の前駆細胞特異的に遺伝子発現を誘導できることを確認した。pTtr-rtTA Tg マウスを用いて脈絡叢特異的に Shh を強制発現するマウスにおいて、脈絡叢上皮細胞の増殖促進による脈絡叢サイズの増大と、神経幹細胞・前駆細胞における Shh 強制発現マウスと同様な表現型 (神経幹細胞・前駆細胞の増殖促進、脳室および脳室周囲帯の拡大、脳表面積の顕著な拡大) が認められ、任意の液性因子を脈絡叢から分泌させて脳形態形成に影響を及ぼすことが可能であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Tadanobu Matsuzaki, Toru Yoshihara, Toshiyuki Ohtsuka, Ryoichiro Kageyama | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Hes1 expression in mature neurons in the adult mouse brain is required for normal behaviors | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 8251 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-44698-y | 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 Toshiyuki Ohtsuka, Ryoichiro Kageyama | 4. 巻 95 |
| 2. 論文標題 Regulation of temporal properties of neural stem cells and transition timing of neurogenesis and gliogenesis during mammalian neocortical development | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Seminars in Cell & Developmental Biology | 6. 最初と最後の頁 4-11 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.semcd.2019.01.007 | 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 Ando Mitsushige, Goto Masanori, Hojo Masato, Kita Aya, Kitagawa Masashi, Ohtsuka Toshiyuki, Kageyama Ryoichiro, Miyamoto Susumu | 4. 巻 61 |
| 2. 論文標題 The proneural bHLH genes Mash1, Math3 and NeuroD are required for pituitary development | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Molecular Endocrinology | 6. 最初と最後の頁 127 ~ 138 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/JME-18-0090 | 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 Kageyama Ryoichiro, Shimojo Hiromi, Ohtsuka Toshiyuki | 4. 巻 138 |
| 2. 論文標題 Dynamic control of neural stem cells by bHLH factors | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Neuroscience Research | 6. 最初と最後の頁 12 ~ 18 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2018.09.005 | 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 Ohtsuka Toshiyuki, Kageyama Ryoichiro | 4. 巻 148 |
| 2. 論文標題 Hes1 overexpression leads to expansion of embryonic neural stem cell pool and stem cell reservoir in the postnatal brain | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Development | 6. 最初と最後の頁 189191 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.189191 | 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 Shqirat Mohammed, Kinoshita Akira, Kageyama Ryoichiro, Ohtsuka Toshiyuki | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Sonic hedgehog expands neural stem cells in the neocortical region leading to an expanded and wrinkled neocortical surface | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Genes to Cells | 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) 10.1111/gtc.12847 | 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 0件 / うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Toshiyuki Ohtsuka, Ryoichiro Kageyama |
| 2. 発表標題 Overexpression of Hes1 leads to prolonged neocortical neurogenesis and expansion of neural stem cell reservoir in postnatal brain |
| 3. 学会等名 ISDN 2018 (Nara, Japan) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大塚 俊之 |
| 2. 発表標題 Embryonic neural stem cells with high levels of Hes1 expression proliferate less frequently and remain as neural stem cells in the postnatal brain |
| 3. 学会等名 新学術領域研究「脳構築における発生時計と場の連携」第3回領域班会議 (ネオオリエンタルリゾートハヶ岳高原、山梨県北杜市) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 大塚 俊之、影山 龍一郎 |
| 2. 発表標題 神経幹細胞制御による脳形態形成の改変 |
| 3. 学会等名 神経発達・再生研究会（名古屋市立大学、名古屋） |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|------------------------------------|
| 1. 著者名 影山龍一郎、大塚俊之、下條博美 | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 羊土社（東京） | 5. 総ページ数 Vol.36 No.12 1986-1992 |
| 3. 書名 実験医学（増刊号）脳神経回路と高次脳機能 榎本和生、岡部繁男編 | |

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|