

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19369

研究課題名（和文）核小体タンパク質Neproネットワークによる神経幹細胞の初期化

研究課題名（英文）Nepro network and reprogramming of neural stem cells

研究代表者

齋藤 哲一郎（Saito, Tetsuichiro）

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00202078

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：大脳新皮質形成の初期の神経幹細胞は、多くの種類の細胞を生み出すポテンシャルを有するが、その機構には不明な点が多い。研究代表者らが初期神経幹細胞で発見したNeproを中心にマウス胎仔の大脳形成の過程を独自の遺伝子導入法やタイムラプス培養系などを用い詳細に解析した結果、核小体の微細構造ダイナミクスが初期神経幹細胞の細胞周期で大きく変化し、そのダイナミクスと神経幹細胞のポテンシャルにはNeproが必須であることが初めて明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳新皮質の初期神経幹細胞は大きなポテンシャルを有し、成体の神経幹細胞を発生初期の状態へ若返らせることができれば、画期的な治療応用に道を開くことにつながると期待される。本研究では、初期神経幹細胞で発現するNeproの局在と役割を研究代表者ら独自の実験系で詳細に解析し、初期神経幹細胞のポテンシャルと核小体の機能やダイナミクスとの関連を初めて明らかにすることに成功した。

研究成果の概要（英文）：Early neural stem cells (NSCs) have potential to give rise to many cell types in the mammalian forebrain, but the potential gradually decreases during embryonic development. The mechanism to confer the multipotential on early NSCs is largely unknown. Nepro, which encodes a unique protein, is expressed in and essential for maintaining early NSCs. We examined the function of Nepro in early NSCs by using exo utero electroporation in the forebrain of the early mouse embryo and confocal time-lapse imaging of organ cultures of the electroporated forebrain. Nepro is specifically localized in the nucleolus of early NSCs in the S phase, and its expression oscillates during their cell division, in which the morphology of the nucleolus dynamically changes. Moreover, the dynamics of the nucleolus also requires the function of Nepro, suggesting the relationship between the dynamics of the nucleolus and the multipotential of early NSCs.

研究分野：神経科学

キーワード：神経幹細胞 大脳新皮質 核小体 遺伝子 発現制御 電気穿孔法 発生・分化 細胞・組織

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の大脳新皮質の神経幹細胞は、新皮質形成の初期には多くの種類の神経細胞を生み出す能力を有するが、その能力は新皮質の形成過程で減衰する。中期以降の神経幹細胞の研究は多いが、初期の神経幹細胞は、研究の困難さもあり不明な点が多い。また、成体の神経幹細胞から作り出された神経細胞では不十分であるが、胎子の神経細胞であれば、成体の新皮質に移植後に生着し機能する (*Nature* 539, 248-253 (2016))。そこで、成体の神経幹細胞を初期の神経幹細胞へ若返らせることができれば、全く新しい視点で神経幹細胞の研究が可能になるとともに、脳障害の治療に向けて患者本人の神経幹細胞を利用する画期的な治療応用に道を開くことにつながると期待される。

新皮質形成の中期以降では、神経幹細胞のクロマチン修飾などが変化し神経細胞やグリア細胞の生産が制御されることがポリコム遺伝子などの解析で示されている (*Nat Rev Neurosci* 17, 537-549 (2016))。しかし、初期の神経幹細胞は多くの種類の細胞を作り出せる多能性ゆえに大きな注目を集めながら、形成初期の大脳新皮質が微小であるとともに、特異的マーカーの欠如もあり、解析は容易ではない。

研究代表者らは、大脳新皮質の形成初期に神経幹細胞の細胞核内で働いている機構に焦点を絞り、初期の神経幹細胞で発現する核タンパク質の遺伝子を多数同定した。同定した 28 種類の遺伝子を研究代表者が開発した電気穿孔法による微小マウス胎仔への遺伝子導入法を用いて胎仔脳で機能解析したところ、単独で神経幹細胞に明瞭な影響を与えた遺伝子は 1 つのみであり、*neural progenitor* に因み *Nepro* と名付けた (Muroyama & Saito, *Development* 136, 3889-3893 (2009))。

*Nepro* タンパク質は、核移行シグナル以外のモチーフを有さず、無脊椎動物にホモログが存在しないなど、多くのユニークな特徴を有し、初期の神経幹細胞の維持に必須である。さらに、研究代表者らが作製した *Nepro* ノックアウトマウスの詳細な解析により、*Nepro* は受精直後の初期胚にも必要であり、*Nepro* がないと p53 が異常にミトコンドリアに蓄積するとともに細胞質のチトクロム c の量が増大し細胞死が誘導され胚盤胞が正常に形成されないことが示された。また、大腸菌で発現させた *Nepro* を抗原としてウサギを免疫し、*Nepro* に特異的な抗体を作製することに成功した。この抗体を用い、*Nepro* は受精後の 4 細胞期から胚盤胞の核小体と核小体の前駆体のみにも局在することが明らかになった。*Nepro* ノックアウトマウスの胚では、正常な大きな核小体が構築されず、小さな核小体の前駆体の状態で止まり、リボソームの合成に異常を来すことも初めて示された (Hashimoto, Sato, Muroyama, Fujimura, Hatano & Saito, *Dev Growth Diff* 57, 529-538 (2015))。

核小体は rRNA の合成などリボソーム形成に重要な場であり、がん細胞などの細胞分裂が盛んな細胞では大きく、細胞分裂との関連性は 100 年以上前から知られている。CX-5461 などの rRNA 合成阻害剤を用いて p53 を駆動させがん細胞を殺す治療法なども考案されている。また、核小体のタンパク質は、パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患にも関与することが示唆されている (*Trends Cell Biol* 23, 168-174 (2013))。しかし、核小体と神経幹細胞の関連は全く不明である。

### 2. 研究の目的

未だに不明な点が多い初期神経幹細胞が有する多能性の機構を分子レベルで明らかにし、発生過程でポテンシャルを消失してしまう生体内の神経幹細胞を若返らせる新しい方法を見つけ出すことを目的とする。特に、研究代表者らが発見した *Nepro* を中心とした核小体ネットワークを軸として、研究代表者らが作製した抗 *Nepro* 抗体などの独自の材料と、微小マウス胎仔への遺伝子導入法などの独自の実験系を用い、初期神経幹細胞の多分化能とクロマチンダイナミクスの両面から総合的に解析し、新皮質の高次機能を生み出す初期神経幹細胞の多能性システムを新しい方向から解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

初期神経幹細胞のポテンシャルを調べるために、研究代表者らが開発した電気穿孔法を利用した微小マウス胎仔への遺伝子導入法 (Saito, *Nature Protocols* 1, 1552-1558 (2006); Saito, *Methods Enz* 477, 37-50 (2010); Saito, *Neuromethods* 102, 21-31 (2015) など) とテトラサイクリン遺伝子発現誘導法 (Sato, Muroyama, Saito, *J Neurosci Methods* 214, 170-176 (2013); *Neuromethods* 102, 187-195 (2015)) などの独自の実験系を用いマウスの個体発生の時期特異的に様々な遺伝子の発現を制御するとともに、遺伝子導入後の胎仔脳を器官培養シタイムラプス共焦点顕微鏡で観察することにより初期神経幹細胞の核小体ダイナミクスを詳細に解析する。また、研究代表者らが発見した初期神経幹細胞に特異的な遺伝子群と *Nepro* がいかに神経幹細胞の制御で協働的に機能するのかを上記の遺伝子導入法等を用い、マウス個体のレベルで詳細に解析する。

## 4. 研究成果

### (1) マウス大脳新皮質の初期神経幹細胞における核小体ダイナミクス

マウスの大脳新皮質形成初期の胎生 11.5 日に、研究代表者の微小マウス胎仔遺伝子導入法を用い、Nepro と赤色蛍光タンパク質 mCherry の融合タンパク質とともに、黄色蛍光タンパク質 EYFP の遺伝子を導入し、大脳新皮質の切片を器官培養下、タイムラプス共焦点顕微鏡で詳細に観察した。黄色の蛍光で標識された遺伝子導入細胞において、赤の蛍光を発する Nepro 融合タンパク質は、神経幹細胞の核小体に局在し、神経幹細胞のエレベーター運動と同調して Nepro 融合タンパク質の発現がダイナミックに変化することが示された。具体的には、神経幹細胞が脳室直下に位置する細胞分裂の M 期では Nepro 融合タンパク質が消失し、軟膜側に移動を開始後の S 期では、核小体に局在し M 期に向かって発現量が增大するオンオフを繰り返していた。この蛍光のオンオフは、研究代表者らが作製した Nepro に特異的な抗体を用いて、形成初期の大脳新皮質の固定切片で得られたスナップショットの免疫染色結果と整合しており、Nepro の発現と局在が、神経幹細胞の細胞周期で大きく変化することが初めて明らかになった。一方、Nepro と異なりどの細胞の核小体にも存在する NPM1 (nucleophosmin 1) は、M 期では細胞質に散在し S 期に核小体に集合するサイクルを繰り返していた。また、初期神経幹細胞の核小体における Nepro と NPM1 の局在も時期特異的に異なり、初期神経幹細胞の細胞周期における核小体の微細構造ダイナミクスが初めて明らかになった。

### (2) Nepro は初期神経幹細胞の核小体ダイナミクスに必須である

Nepro に特異的な siRNA を微小マウス胎仔遺伝子導入法で EYFP とともに胎生 11.5 日のマウス大脳新皮質に共導入し詳細に観察した。その結果、siRNA で Nepro の発現を抑えると核小体ダイナミクスのパターンが消失する事が示され、初期神経幹細胞の核小体ダイナミクスには Nepro が必須であることが初めて明らかになった。さらに、Nepro が機能しないと、マウス初期胚の細胞はミトコンドリアに蓄積した p53 により細胞死が誘導されるのに対し、初期神経幹細胞では p53 のネットワークが働かず細胞死を起こさずに直接的に神経細胞の分化へ向かう事が示され、Nepro の下流で働く機構は、初期胚と神経幹細胞では細胞と分子の両レベルで大きく異なることが示された。

### (3) Nepro と協働して神経幹細胞を制御する新しい機構

大脳新皮質の初期神経幹細胞に特異的な遺伝子として研究代表者らが発見した遺伝子の中で、Nepro を除く 27 個を、マウス胎仔の大脳新皮質に EYFP や Nepro とともに、研究代表者の微小マウス胎仔遺伝子導入法で共導入し、黄色の蛍光で標識された遺伝子導入細胞を指標に神経幹細胞のダイナミクスを詳細に調べた。Nepro 単独の強制発現では後期の神経幹細胞の分化を停止できないが、27 個の遺伝子を共に強制発現させると後期の神経幹細胞であっても分化を停止させることができ、27 個の遺伝子の中に Nepro と共役する遺伝子が存在することが示唆された。さらに、27 個から共導入する遺伝子を 1 つずつ減らし神経幹細胞のダイナミクスを解析したところ、11 個の遺伝子があれば神経分化を強力に抑制し、その中の 8 個の遺伝子である程度の分化を抑制できることが示され、Nepro と共役する遺伝子は複数あり、神経幹細胞の維持は、多段階の分子機構で制御されることが明らかになった。また、これらの共役遺伝子を Nepro とともに強制発現させた後では、神経幹細胞の分化能も共役遺伝子の数に応じて複数のレベルに変化することがわかり、神経幹細胞のポテンシャルを段階的に人為的に操作できる新しい手法の可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishida Kentaro, Saito Tetsuichiro, Mitsui Toshiyuki	4. 巻 61
2. 論文標題 Involvement of selective epithelial cell death in the formation of feather buds on a bioengineered skin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 141 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12593	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 Ishida Kentaro, Saito Tetsuichiro, Mitsui Toshiyuki	4. 巻 60
2. 論文標題 In vitro formation of the Merkel cell-neurite complex in embryonic mouse whiskers using organotypic co-cultures	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 291 ~ 299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12535	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 Saito Tetsuichiro	4. 巻 1218
2. 論文標題 A Nucleolar Protein, Nepro, Is Essential for the Maintenance of Early Neural Stem Cells and Preimplantation Embryos	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advances in Experimental Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 93 ~ 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-34436-8_6	査読の有無 無
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 Chuan Chie Chang, Hsiao Ying Kuo, Shih Yun Chen, Wan Ting Lin, Kuan Ming Lu, Tetsuichiro Saito, Fu Chin Liu	4. 巻 -
2. 論文標題 Developmental Characterization of Zswim5 Expression in the Progenitor Domains and Tangential Migration Pathways of Cortical Interneurons in the Mouse Forebrain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	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) <a href="https://doi.org/10.1002/cne.24900">https://doi.org/10.1002/cne.24900</a>	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 該当する

1. 著者名 Satoshi Fujimoto, Marcus N. Leiwe, Richi Sakaguchi, Yuko Muroyama, Reiko Kobayakawa, Ko Kobayakawa, Tetsuichiro Saito, Takeshi Imai	4. 巻 -
2. 論文標題 Spontaneous activity generated within the olfactory bulb establishes the discrete wiring of mitral cell dendrites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	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) <a href="http://dx.doi.org/10.1101/625616">http://dx.doi.org/10.1101/625616</a>	査読の有無 無
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2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tatsuya Sato, Takako Kikkawa, Tetsuichiro Saito, Keiichi Itoi, Noriko Osumi
2. 発表標題 Fgf8 regulates regionalization of the anterior telencephalon
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsuya Sato, Takako Kikkawa, Tetsuichiro Saito, Keiichi Itoi, Noriko Osumi
2. 発表標題 The role of Fgf8 for development of the anterior telencephalon
3. 学会等名 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学 大学院医学研究院 発生再生医学研究領域  
<https://www.m.chiba-u.ac.jp/class/dev/index.html>

## 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	石田 研太郎  (Ishida Kentaro)		