

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19378

研究課題名(和文) 成熟した大脳皮質神経細胞のサブタイプを生体内で人為的に転換させる試み

研究課題名(英文) Subtype conversion of mature neurons in cerebral cortex

研究代表者

仲嶋 一範 (NAKAJIMA, Kazunori)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：90280734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳の中には多くのサブタイプの神経細胞があり、それぞれ特有の形態と機能を有している。我々は、神経細胞が未熟な時期には細胞外環境の影響によって最終的に分化するサブタイプが変わりうることを発見したが、一般に成熟神経細胞のサブタイプは決して変化しない。本研究では、成熟神経細胞のサブタイプを人為的に転換させることに挑戦し、転写因子及びエピジェネティック因子の人為的制御によって少なくとも一部の表現型については転換できる可能性を示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成熟神経細胞のサブタイプそのものについては一生変わらないとするのが現在の常識である。本研究の結果から、成熟神経細胞であっても、少なくとも特定の条件下においてはそのサブタイプ分化またはその維持にある程度の可塑性が存在する可能性が示された。成熟神経細胞の運命転換が可能になれば、in vivoで所望のサブタイプの神経細胞を作り出すことが可能になるかも知れず、将来的な波及効果や社会に与えるインパクト・貢献は多大であると期待される。

研究成果の概要(英文)：Brain comprises hundreds of different neuronal subtypes that differ in cell morphology and function. Although increasing evidence has begun to reveal the plasticity of subtype specification in immature neurons, it is known that fate conversion does not occur in mature neurons. In this study, we have tried to convert subtypes of mature neurons by modulating transcription and epigenetic factors and have succeeded in obtaining some phenotype conversion.

研究分野：発生神経生物学

キーワード：神経細胞 分化 大脳皮質

1. 研究開始当初の背景

脳の中には多くのサブタイプの神経細胞があり、それぞれ特有の線維連絡をしている。それらは、神経前駆細胞が時間経過とともに次第にその分化ポテンシャルを変化させ産生されると考えられてきた。しかしながら我々は、少なくともある種の細胞については、神経細胞として生まれて未熟な時期にはまだその後どのようなサブタイプに分化するかは特異化されておらず、その神経細胞が最終的に配置された場所の細胞外環境の影響によって最終的に分化するサブタイプが変わりうることを発見した。この知見から、成熟した神経細胞においてもサブタイプ転換が起こる可能性が想起されたが、通常では成熟神経細胞のサブタイプは決して変化しない。実際、深層神経細胞の運命決定を制御する転写因子 **Fezf2** を浅層神経細胞で強制発現させると、浅層サブタイプから深層サブタイプの神経細胞へと分化転換するが、この分化転換が起こるのは出生直後までに限られ、成熟後の神経細胞は分化転換しないことが報告されていた。

一方、我々は発生過程におけるサブタイプ決定が、転写因子とエピジェネティック因子という複数の因子の組み合わせによって達成されることも発見しており、複合的な因子の制御によって成熟神経細胞のサブタイプ転換が達成される可能性を着想するに至った。

2. 研究の目的

過去の報告及び独自のデータから、成熟神経細胞の分化状態が、転写因子による制御のみならずエピジェネティックな制御によって強固に維持されている可能性を着想した。そして、その両者を人為的に変化させることによって、成熟神経細胞のサブタイプを転換させることができるのではないかと考えた。

そこで本研究では、転写環境やエピジェネティック環境を複合的に操作し、生体内で成熟神経細胞を分化転換させ、サブタイプを人為的に変換させるという挑戦的な目的を立てて研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 転写因子 **Fezf2** による未成熟神経細胞の効率的な分化転換

これまで、転写因子 **Fezf2** を未熟な浅層神経細胞で強制発現させると、浅層サブタイプから深層サブタイプの神経細胞へと分化転換することが報告されていた。しかしながら我々は、**Fezf2** による分化転換の効率が著しく低いことに気づいた。そこで、この分化転換を促進する因子の探索を行った。

具体的には、子宮内エレクトロポレーション法によって、浅層サブタイプの神経細胞が生み出されるマウス 14 日目胚の脳に遺伝子導入を行い、生後 1 週齢の脳の解析を行った。導入する遺伝子には、**Fezf2** とともに分化転換を促進すると予想された候補因子を用いた。サブタイプの同定は、軸索の投射パターン（浅層・深層サブタイプはそれぞれ皮質内・皮質下に投射する）とサブタイプ特異的マーカーを用いて行った。

(2) 成熟浅層神経細胞の深層サブタイプへの分化転換

Fezf2 による分化転換が起こるのは出生直後までの神経細胞に限られ、成熟した神経細胞は分化転換しない。そこで本研究では、成熟神経細胞での分化転換抵抗機構を下記の方法で人為的に解除し、成熟神経細胞を分化転換させることに挑戦した。

① エピジェネティック制御因子による **Fezf2** の機能増強

我々は、あるエピジェネティック因子の機能抑制が **Fezf2** の効果を著しく促進することを過去に見出したため（未発表）、この遺伝子の発現抑制を行った上で成熟浅層神経細胞に **Fezf2** を発現誘導し、深層サブタイプへの分化転換の有無を検討した。

② 浅層神経細胞の分化制御因子の除去による分化転換の促進

成熟神経細胞での分化転換抵抗機構として、本来のサブタイプである浅層神経細胞としての性質を維持しようとする機構の関与が考えられた。そこで、浅層神経細胞の分化を制御する因子の発現を抑制した上で成熟神経細胞に **Fezf2** を発現誘導し、深層サブタイプへの分化転換の有無を検討した。

4. 研究成果

(1) 転写因子 **Fezf2** による未成熟神経細胞の効率的な分化転換

Fezf2 による分化転換現象の効率を最大化するために、未成熟神経細胞を用いて **Fezf2** の機能を強化する因子の探索を行った。その結果、深層神経細胞に発現する転写因子 **Deep Layer Transcription Factor 1 (DLTF1)** が **Fezf2** の分化転換効果を著しく促進することを見出した（図 1）。

次にこの組み合わせ（**Fezf2+DLTF1**）によって、成熟浅層神経細胞の分化転換を試みた。しかしながら、軸索投射パターンやサブタイプマーカーの発現に変化は見られなかった。したがって、成熟神経細胞には分化転換に抵抗する強力なメカニズムが存在する可能性が示唆された。

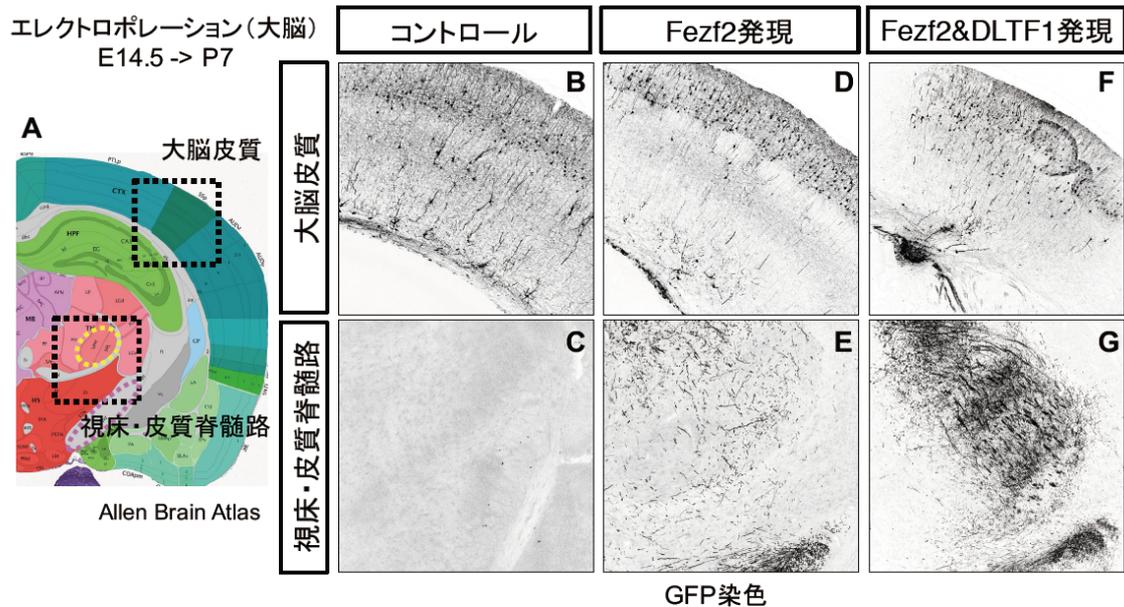


図1. Fezf2 と DLTF1 の異所的発現による発生期神経細胞のサブタイプ転換
(A) 脳の観察部位を示した。皮質脊髄路をマゼンタ点線で、背側視床に含まれる後腹側核を黄点線で示した。(B-G) 各種発現ベクターを胎生 14.5 日目の大脳に導入し、生後 7 日目の脳を観察した。B, D, F は大脳皮質の GFP 陽性細胞を示し、エレクトロポレーションの効率を示した。C では軸索が見られないのに対し、E では少しの、G では多くの軸索が見られた。

(2) 成熟浅層神経細胞の深層サブタイプへの分化転換

上記のように、成熟した神経細胞では強力な分化転換活性を持つ転写因子の組み合わせ (Fezf2+DLTF1) でも分化転換しなかった。そこで、成熟神経細胞における分化転換抵抗機構を人為的に解除し、成熟神経細胞を分化転換させることに挑戦した。

① エピジェネティック制御因子による Fezf2 の機能増強

発生期に各種神経サブタイプを産出する際にエピジェネティック制御が重要であることが明らかになっており、成熟神経細胞が分化転換に抵抗性を獲得する上でもエピジェネティック因子による制御が関わっているのではないかと考えた。我々は、出生前後の未成熟神経細胞において、エピジェネティック因子 (Epigenetic Factor1, EpGF1) の機能抑制が Fezf2 の効果を著しく促進することを見出した (未発表)。そこで、EpGF1 の発現を発生期から抑制した上で成熟浅層神経細胞に Fezf2 を発現誘導し、深層サブタイプへの分化転換が起こるか検討した。その結果、深層サブタイプのマーカーである Foxp2 の発現が誘導されることが明らかになった (図 2)。しかしながら、Fezf2 発現誘導細胞の軸索投射パターンに変化は見られなかった。

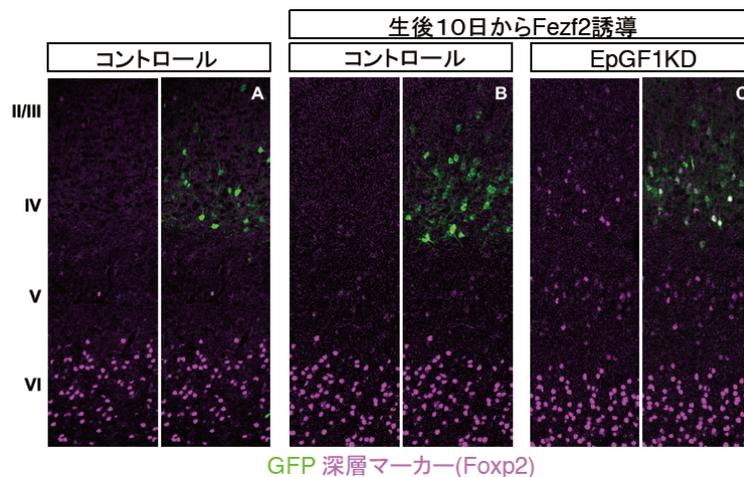


図2. 成熟神経細胞における Fezf2 によるサブタイプ転換
コントロールベクター(A)、発現誘導型 Fezf2 発現ベクター単独(B)、Fezf2 と EpGF1 ノックダウンベクター(C)を胎生 14.5 日目の大脳に導入し、生後 10 日目に Fezf2 の発現を誘導した。EpGF1 を抑制し Fezf2 を発現誘導した場合のみ深層マーカー Foxp2 の発現 (マゼンタ) が観察された。

② 浅層神経細胞の分化制御因子の除去による分化転換の促進

成熟神経細胞における分化転換抵抗機構として、本来のサブタイプである浅層神経細胞としての性質を維持しようとする機構が関与しているのではないかと予想した。転写因子 **SLTF1** (**Superficial Layer Transcription Factor 1**)は浅層神経細胞に高いレベルで発現しており、その分化決定に重要な因子である。したがって、**SLTF1** が **Fezf2** に対して拮抗的に働く可能性が考えられた。そこで、**SLTF1** の発現を発生期から抑制した上で成熟浅層神経細胞に **Fezf2** および **DLTF1** を発現誘導し、深層サブタイプへの分化転換が起こるか検討した。その結果、**SLTF1** を抑制し **Fezf2+DLTF1** を発現させたとき、深層サブタイプのマーカーである **Crym** の発現が強く誘導されることが明らかになった (図 3)。またこのとき、皮質脊髄路に多くの軸索が観察された (図 3)。したがって、出生後の神経細胞の運命転換が生じた可能性が強く示唆されるが、軸索の伸長・分岐の亢進が軸索増加の主要因である可能性もあるため、さらなる解析が必要である。

Fezf2&DLTF1誘導(生後2日) -> 解析(生後15日)

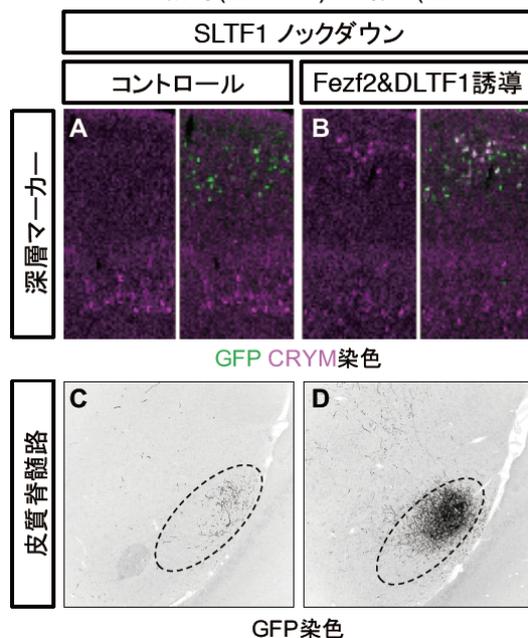


図 3. Fezf2 と DLTF1 の異所的発現による出生後の神経細胞のサブタイプ転換
SLTF1 ノックダウンベクターを胎生 14.5 日目の大脳に導入の後、生後 2 日目に Fezf2&DLTF1 の発現を誘導し、生後 15 日脳を観察した。(A,B) 深層マーカー-CRYM の発現を示した。(C,D) 皮質脊髄路を黒点線で示した。

近年の研究で成熟神経細胞は大きな可塑性を有することが判明しているが、その可塑性はシナプス形成等に関わる部分が主であり、分裂能を持たない成熟神経細胞のサブタイプそのものについては一生変わらないとするのが常識であった。本研究の結果から、エピジェネティック因子や浅層転写因子などの分化転換抵抗因子の除去という特殊な状況下ではあるが、成熟神経細胞であっても、そのサブタイプ分化またはその維持にある程度の可塑性が存在することが示された。本研究では、分化転換抵抗因子を発生期から抑制しているため、すべての人為的操作を成熟神経細胞で行い分化転換を誘導することが残された課題である。また、神経軸索の投射パターンなど、変化が誘導されにくい事象もあり、成熟神経細胞の分化状態が多層的なメカニズムによって維持されている可能性が示唆された。

成熟神経細胞の運命転換が可能になれば、*in vivo* で所望のサブタイプの神経細胞を作り出すことが可能になるかも知れない。例えば、筋萎縮性側索硬化症(ALS)では大脳皮質第 5 層の神経細胞が脱落するが、周囲の層の神経細胞を直接に分化転換することでこれを補完できる可能性がある。このような細胞を用いた治療の研究では、iPS 細胞などの幹細胞が注目を集めているが、移植細胞の定着率の低さやがん化のリスクなど課題も多い。神経細胞は基本的な性質は異なるサブタイプでも共通であるため、周囲の神経細胞を直接分化転換できれば、その機能的な有効性・安全性はより高いと想像される。成功すれば、将来的な波及効果や社会に与えるインパクト・貢献は多大であると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kazunori Nakajima
2. 発表標題 Neuronal migration and layer formation in the developing cerebral neocortex
3. 学会等名 EMBO Workshop “Emerging Concepts of the Neuronal Cytoskeleton 5th Edition”（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大石康二、仲嶋一範
2. 発表標題 皮質下投射ニューロンの分化決定における転写制御機構 (Reciprocal interaction of transcription factors to specify the identity of subcortical projection neurons)
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会合同大会 (Neuro2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仲嶋一範
2. 発表標題 大脳皮質の形成機構
3. 学会等名 東京慈恵会医科大学大学院「脳・神経科学研究法概論」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仲嶋一範
2. 発表標題 大脳皮質の形成機構
3. 学会等名 山口大学医学部特別専門講義（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉永怜史、本田岳夫、根本愛子、長谷川紘之、大石康二、久保健一郎、仲嶋一範
2. 発表標題 i-Gonad法を用いて、発生期大脳皮質の細胞外環境が細胞に与える影響を効率的に解析する
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 大石康二、仲嶋一範
2. 発表標題 皮質下投射ニューロンへの分化リプログラミング時における転写制御機構 (Transcriptional networks to specify subcortical projection neurons in subtype reprogramming)
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川紘之、大石康二、山本亘彦、仲嶋一範
2. 発表標題 大脳新皮質第4層ニューロンのサブタイプ特異的分化に寄与する細胞外シグナルの解析 (Analysis of extrinsic signals for layer 4 subtype specification in the neocortex)
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koji Oishi and Kazunori Nakajima
2. 発表標題 Subtype specification of cortical neurons by the extracellular environment
3. 学会等名 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (ISDN2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koji Oishi and Kazunori Nakajima
2. 発表標題 In vivo reprogramming of postmitotic neocortical neurons into different neuronal subtypes
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会 (Asia-Pacific Developmental Biology Network共催)、Symposium: “Developmental Biology in Stem Cell Research and Regenerative Medicine” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koji Oishi and Kazunori Nakajima
2. 発表標題 Subtype specification and reprogramming of cortical neurons in progenitor cells and postmitotic immature neurons
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学学会大会合同年会、Symposium: “Mechanisms of neuronal production and differentiation in the cerebral cortex” (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石康二、仲嶋一範
2. 発表標題 未成熟・成熟大脳皮質ニューロンにおけるサブタイプ転換 (Fate Conversion of Subtypes in Immature and Mature Cortical Neurons)
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会、ワークショップ: “脳発生プログラムの複雑化と、その進化” (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仲嶋一範
2. 発表標題 大脳皮質層構造の形成機構
3. 学会等名 名古屋大学医学部神経解剖学特別講義 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仲嶋一範
2. 発表標題 大脳新皮質の形成機構
3. 学会等名 名古屋大学大学院医学系研究科医学特論（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>アウトリーチ活動：</p> <p>2018年11月3日 第41回四谷祭（慶應義塾大学信濃町キャンパス学園祭）にて一般向け研究室ツアーを合計4回開催し、本研究の成果を含めて紹介した。各回3グループずつに分かれて見学し、合わせて43名参加。</p> <p>2019年10月19日 第42回四谷祭（慶應義塾大学信濃町キャンパス学園祭）にて一般向け研究室ツアーを合計2回開催し、本研究の成果を含めて紹介した。各回3グループずつに分かれて見学し、合わせて21名参加。</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	大石 康二 (OISHI Koji)		