

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590169

研究課題名 (和文) 前脳形態形成におけるシグナル分子の役割の解明

研究課題名 (英文) Roles of signaling molecules in forebrain morphogenesis

研究代表者 石橋 誠 (ISHIBASHI MAKOTO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：30232341

研究成果の概要 (和文)：

Shh シグナルの前脳形成における役割を調べるため、Shh および Smo コンディショナルノックアウトマウスを作成し、解析した。大脳皮質原基においては *Emx1-Cre* マウスを用い、眼原基においては *Fgf15-Cre* マウスを用いた。前者においては神経幹細胞の増殖低下と分化したニューロンの移動異常が観察された。後者においては眼原基近位部形成不全、眼杯腹側部形成不全、眼杯背側部の変性が見られた。以上の結果から、Shh シグナルは前脳において神経幹細胞増殖の促進、パターン形成、形成後の細胞生存維持に関与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Sonic hedgehog (Shh) function is essential for patterning and cell fate specification, particularly in ventral regions of the central nervous system. It is also a crucial mitogen for cerebellar granule neuron precursors and is important in maintenance of the stem cell niche in the postnatal telencephalon. Although it has been reported that Shh is expressed in the developing dorsal telencephalon, functions of Shh in this region are unclear, and detailed characterization of Shh mRNA transcripts *in situ* has not been demonstrated. To clarify the roles of Shh signaling in dorsal pallium (neocortex primordium) development, we have knocked out the Shh and Smo genes specifically in the early developing dorsal telencephalon by using *Emx1cre* mice. The mutants showed a smaller dorsal telencephalon at E18.5, which was caused by cell cycle kinetics defects of the neural progenitor/stem cells. The cell cycle length of the progenitor/stem cells was prolonged, and the number of cycle-exiting cells and neurogenesis were decreased. Birth-date analysis revealed abnormal positioning of neurons in the mutants. The characteristics of the subventricular zone, ventricular zone and subplate cells were also affected. Weak immunoreactivity of Shh was detected in the dorsal telencephalon of wild types. Reduced Shh immunoreactivity in mutant dorsal telencephalons supports the above phenotypes. Our data indicate that Shh signaling plays an important role in development of the neocortex.

Accumulating evidence suggests that Sonic hedgehog (Shh) signaling plays a crucial role in eye vesicle patterning in vertebrates. Shh promotes expression of Pax2 in the optic stalk and represses expression of Pax6 in the optic cup. Shh signaling contributes to establishment of both proximal-distal and dorsal-ventral axes by activating Vax1, Vax2, and Pax2. In the dorsal part of the developing retina, Bmp4 is expressed and antagonizes the ventralizing effects of Shh signaling through the activation of Tbx5 expression in chick and *Xenopus*. To examine the roles of Shh signaling in optic cup formation and optic stalk development, we utilized the Smoothened (Smo) conditional knockout (CKO) mouse line. Smo is a membrane protein which mediates Shh signaling into inside of cells. Cre expression was driven by *Fgf15* enhancer. The ventral evagination of the optic cup deteriorated from E10 in the Smo-CKO, whereas the dorsal optic cup and optic stalk develop normally until E11. We analyzed expression of various genes such as Pax family (Pax2/Pax6), Vax family (Vax1/Vax2) and Bmp4.

Bmp4 expression was greatly upregulated in the optic vesicle by the 21-somite stage. Then Vax1/2 expression was decreased at the 20- to 24-somite stages. Pax2/6 expression was affected at the 27- to 32-somite stages. Our data suggest that the effects of the absence of Shh signaling on Vax1/Vax2 are mediated through increased Bmp4 expression throughout the optic cup. Also unchanged patterns of Raldh2 and Raldh3 suggest that retinoic acid is not the downstream to Shh signaling to control the ventral optic cup morphology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
H20年度	1,500,000	450,000	1,950,000
H21年度	1,100,000	330,000	1,430,000
H22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般

キーワード：前脳形態形成、シグナル分子、Sonic hedgehog,

#### 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系はヒトを含む脊椎動物の中で最も複雑な構造を有し、その機能も多様である。これまでの研究により、この器官の高度で複雑な構造と機能は多種類のニューロンのネットワークによって営まれることが分かっている。このネットワークが正確に形成されることが複雑な情報処理を行う基盤となっている。

中枢神経系は発生初期に *ectoderm* の一部が誘導されて生じる神経板として始まる。この神経板は一層の神経前駆/幹細胞から成る比較的単純な構造の上皮組織である。神経板は複雑な形態形成運動を経て神経管を形成し、後に前方が脳に、後方が脊髄となる。この過程においては神経上皮が成長しつつ、神経上皮内外におけるシグナリングセンターからの情報が各々の細胞に位置情報を提供してどのような種類のニューロンまたはグリアになるのかという運命決定を行う。またシグナリングセンターからの情報は増殖や生存・死も制御していると考えられる。これによって適切な場所に適切な種類の細胞が適切な数だけ生じ、その後のニューラルネットワークが形成される基礎となる。

我々は、中枢神経系の中でもより複雑な構造と機能を有する前脳の形態形成に着目し、その分子機構の解明を目指している。

前脳は初期には脳胞を形成しており、*p2* 神経節は視床に、*p3* は視床下核になる。視床は成体においては内部が 20 個以上の神経核（ニューロンの集塊）に分かれている。それぞれの神経核は中枢神経系の各部位と線維

連絡を有しており、異なる役割を果たしている。この各々の神経核が形成される分子機構は未だ明らかになっていない。視床原基辺りでシグナリングセンターとして機能していると考えられている部位は、(1)腹側の床板・底板、(2)視床原基内に存在する *zona limitans intrathalamica*(ZLI)(3)背側の蓋板等である。ZLI は *p2/p3* 境界部に存在し、視床原基に位置情報を供給していると予想される。ZLI においてはマウス胚胎生 10.5 日 (E10.5)以降、シグナル分子の一つである *Sonic hedgehog*(SHH)が発現しており、ZLI からの位置情報を担う分子として重要視されている。Shh はまた視床原基の腹側に隣接する底板にも発現しており、SHH 一種類の分子で前後軸、背腹軸の 2 軸に沿った位置情報を与えている可能性がある。ところがコンベンショナルな *Shh* ノックアウトマウスにおいては、早い段階で視床原基自体が低形成となってしまいうため、SHH の視床のパターン形成における役割を解析することが不可能である。この問題は、視床原基形成後に *Cre* 組換え酵素を発現するトランスジェニックマウスを作成し、*Shh* シグナルの受け手側細胞においてこのシグナルを伝達する *Smoothed* (*Smo*)をノックアウトすることで克服されることが考えられる。我々は *Fgf15* 遺伝子の調節領域の解析により、視床原基におけるこの遺伝子の発現を制御している領域を突き止めた(Saitou et al.,2005 *Dev Dyn*)。この領域を利用した *Cre* 組換え酵素発現トランスジェニックマウスを用いることで、視床原基形成後に *Shh* シグナルを遮断することが

できる。その視床の表現型を解析することによって、視床神経核形成における Shh シグナルの役割を明らかにすることが期待される。

他のシグナリングセンターと考えられる蓋板には Wnt, FGF 等が発現している。p1~3 神経節には Lhx family 等、脊髄において分化運命決定に重要な役割を果たすことが報告されている転写因子が特徴的な発現パターンを示している。これらの転写因子の発現パターンが Shh, Wnt, FGF シグナルによってどのように制御されているか、上記の実験に加えてニワトリ胚における異所性発現実験により、検証する。なお、上記のシグナル分子、転写因子の発現パターンはマウス・ニワトリ間で非常によく似ている。本研究の第一の目的は視床神経核パターン形成における上記シグナル分子およびそれによって制御を受ける Lhx family 等の役割を明らかにすることにある。

Shh は主として床板に発現し、神経管腹側のパターン形成に関与しているが、中枢神経系発生中期以降、中脳・小脳・大脳皮質原基で背側部にも発現し始める。これら3カ所に共通する特徴はニューロンが「層構造」を成していることである。Ruiz-i-Altaba 等は Shh が大脳皮質原基において脳室周囲層の神経前駆/幹細胞の増殖能の維持に関与していることを *in vitro* の実験により報告しているが、Shh が層構造形成に関与しているかどうかは、未だ明らかでない。また、大脳皮質原基における Shh の発現も RT-PCR で検出されているのみで、発現パターンの詳細は報告されていない。我々は最近、免疫染色法によって大脳皮質原基における Shh タンパクの局在を明らかにした（未発表）。また、皮質原基特異的に Cre を発現するマウスも入手済みである。本研究の第二の目的は Shh シグナルを皮質原基特異的にノックアウトすることによって、その層構造形成に関する役割を明らかにすることにある。

ヒト全前脳胞症(HPE)の原因遺伝子として Shh シグナルに関与する遺伝子が多数報告されている。Shh は前脳だけでなく、脊髄や四肢のパターン形成にも関与しているが、ヒト HPE においては前脳以外に顕著な異常はみられない。最近、Cdo, Boc ノックアウトマウスが HPE モデル動物として適当であるとの報告がなされたが、Cdo, Boc の発現は *prechordal plate* に一過性に検出されるのみであり、その異常がどのようにして左右大脳半球分割不全につながるのか全く不明である。

## 2. 研究の目的

中枢神経系はヒトを含む脊椎動物の中で最も複雑な構造を有し、その機能も多様である。

これまでの研究により、この器官の高度で複雑な構造と機能は多種類のニューロンのネットワークによって営まれることが分かっている。このネットワークが正確に形成されることが複雑な情報処理を行う基盤となっている。

中枢神経系は発生初期に *ectoderm* の一部が誘導されて生じる神経板として始まる。この神経板は一層の神経前駆/幹細胞から成る比較的単純な構造の上皮組織である。神経板は複雑な形態形成運動を経て神経管を形成し、後に前方が脳に、後方が脊髄となる。この過程においては神経上皮が成長しつつ、神経上皮内外におけるシグナリングセンターからの情報が各々の細胞に位置情報を提供してどのような種類のニューロンまたはグリアになるのかという運命決定を行う。またシグナリングセンターからの情報は増殖や生存・死も制御していると考えられる。これによって適切な場所に適切な種類の細胞が適切な数だけ生じ、その後のニューラルネットワークが形成される基礎となる。

我々は、中枢神経系の中でもより複雑な構造と機能を有する前脳の形態形成に着目し、その分子機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

大脳皮質原基において特異的に Shh 遺伝子および Smo 遺伝子をノックアウトするために、これらの遺伝子のコンディショナルアレルを持つマウスと *Emx1-Cre* マウスを交配した。大脳皮質の形成を経時的に解析するため、胎生 10.5 日、13.5 日、15.5 日、18.5 日胎児を採取し、組織像・RNA *in situ* hybridization, 免疫染色等を行った。また細胞周期や Birth-date analysis のために BrdU/CldU/IldU 投与を行った。細胞周期関連の解析はこれらとともに、Ki67 免疫染色の結果から計算した。

眼原基特異的に Shh シグナルをノックアウトするため、*Fgf15-Cre* マウスを用いた。胎生 9.5 日、10.5 日、11.5 日、13.5 日から標本を採取し解析した。様々な遺伝子の RNA *in situ* hybridization とタンパクに対する免疫染色を行った。また BMP4 が *Vax1/2* を抑制することを示すため、眼原基の器官培養に組み換え BMP4 を添加して調べた。

## 4. 研究成果

本研究においては、中枢神経系の中でもより複雑な構造と高次な機能を有する前脳の形態形成に着目し、その分子機構の解明を目指した。特にこの過程において重要なソニックヘッジホッグ (Shh) を中心に調べた。コンベンショナルなノックアウトマウスでは初期から腹側半分が形成されず、従ってまた重要な Shh の供給源である床板も形成されな

め、比較的単純な形態を有する前脳胞形成後の形の変化の仕組みを調べることができない。そこで我々は、コンディショナルノックアウトマウスを利用して、前脳胞形成以後の Shh 等シグナルの役割の解明を目指した。この脳胞の後半部はのちに視床を含む間脳となる。この部位においては多くの異なる機能を担う神経核が形成されるが、その運命決定機構は不明である。Shh シグナルを細胞内に伝える Smo 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスを作成したところ、間脳全体が低形成となった。また間脳内の領域マーカーの発現を調べたところ、いくつかについては発現が低下したり、発現境界が不明瞭になっていた(胎生 12 日)。これ以降、細胞死が進むため、各神経核が完成するかどうかは不明である。②眼原基は間脳の一部が突出してでき始める。遠位端が眼球網膜等を形成し、近位部は視神経・視索となる。また網膜中でも背腹軸等に沿った領域化が見られる。眼杯形成期において、Shh は間脳腹側正中部に発現しており、ここから分泌された SHH タンパクが眼胞・眼杯へ到達すると考えられた。コンディショナルノックアウトマウスにおいては、近位部におけるマーカー遺伝子発現低下、眼胞腹側におけるマーカー遺伝子発現の低下とそれに続く細胞死によって、眼杯腹側部が形成されない。一方、眼胞背側部では Bmp4 の発現が上昇し、発現範囲も腹側部へと拡大していた。細胞死はこの Bmp4 の過剰発現によるものと推測された。Bmp4 発現が、腹側正中部からの Shh シグナルによってどのように制御されているかは未解決の興味深い問題である。

前脳形成における主要なシグナル分子 Shh に焦点をおいて、そのシグナルを細胞内に伝達する Smo 遺伝子のコンディショナルノックアウト (CKO) マウスを作成した。このマウスにおいては将来大脳皮質になる部分において Shh シグナルが機能しない。この CKO マウスでは、大脳皮質が野生型に比べ、その大きさが 75% しかなく小さい。また皮質層構造のマーカー発現にも若干ながら異常がみられた。このマウスの発生中の大脳においては "basal progenitor" のマーカーである Tbr2 陽性細胞の減少が観察された。一方で、エレクトロポレーション法により、Shh を過剰発現させると、Tbr2 陽性細胞は増加すると共に、その局在性が失われた。従って正常な大脳皮質の形成には適切に制御された Shh シグナルが必要であることが示唆された。

また、Smo を眼原基でノックアウトした場合、始めは腹側部のみが欠損するという異常がみられるが、後に背側部も脱落していき、最終的に無眼となる。この過程でいくつかの遺伝子発現を解析すると、背側部で Bmp4 発現が増加していることが明らかとなった。

Bmp4 は過剰発現によって神経系で細胞死を誘導することが知られており、上記 CKO マウス眼の背側部の脱落もこのことが原因と考えられている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Kimura S, Saitsu H, Schaumann BA, Shiota K, Matsumoto N, Ishibashi M.

Rudimentary claws and pigmented nail-like structures on the distal tips of the digits of Wnt7a mutant mice: Wnt7A suppresses nail-like structure development in mice. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2010 Jun;88(6):487-96. 査読有り

2. Zhao L, Saitsu H, Sun X, Shiota K, Ishibashi M.

Sonic hedgehog is involved in formation of the ventral optic cup by limiting Bmp4 expression to the dorsal domain. Mech Dev. 2010 Jan-Feb;127(1-2):62-72. 査読有り

3. Miura T, Hartmann D, Kinboshi M, Komada M, Ishibashi M., Shiota K.

The cyst-branch difference in developing chick lung results from a different morphogen diffusion coefficient. Mech Dev. 2009 Mar-Apr;126(3-4):160-72. 査読有り

4. Komada M, Saitsu H, Kinboshi M, Miura T, Shiota K, Ishibashi M.

Hedgehog signaling is involved in development of the neocortex. Development. 2008 Aug;135(16):2717-27. 査読有り

5. Komada M, Saitsu H, Shiota K, Ishibashi M.

Expression of Fgf15 is regulated by both activator and repressor forms of Gli2 in vitro. Biochem Biophys Res Commun. 2008 May 2;369(2):350-6. 査読有り

6. Sun X, Saitsu H, Shiota K, Ishibashi M. Expression dynamics of the LIM-homeobox genes, Lhx1 and Lhx9, in the diencephalon during chick development.

Int J Dev Biol. 2008;52(1):33-41. 査読有り

〔学会発表〕（計 3 件）

1. Ishibashi M.

Sonic hedgehog is involved in formation of the ventral optic cup and maintenance of the dorsal optic cup in mouse embryos  
The EMBO Meeting, 2010.9.5, Barcelona, Spain.

2. Makoto M., Zhao L, Saitsu H, Sun X, Shiota K.

Sonic hedgehog is involved in formation of the ventral optic cup and maintenance of the dorsal optic cup in mouse embryos  
ESDB, 2009.9.4, Hinxton, UK.

3. Komada M, Saitsu H, Kinboshi M, Miura T., Shiota K, Ishibashi M.

Hedgehog signaling is involved in development of the mammalian neocortex.  
Euro EvoDevo, 2008.7.31, Ghent, Belgium.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 誠 (ISHIBASHI MAKOTO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：30232341

(2) 研究分担者

三浦 岳 (MIURA TAKASHI)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：10324617