

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03179

研究課題名(和文) 神経幹細胞の増殖期からニューロン分化期への移行メカニズムの包括的解明

研究課題名(英文) The mechanisms for the transition from expansion to neurogenic phase in neural stem cells

研究代表者

岸 雄介 (Kishi, Yusuke)

東京大学・定量生命科学研究所・准教授

研究者番号：00645236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、発生初期において神経幹細胞が自己増殖を繰り返す増殖期から、ニューロンを産生するニューロン分化期に移行するメカニズムの解明を目指した。その結果、ポリコム群タンパク質による適切な遺伝子発現の抑制が適切なニューロン分化に重要なことなど、神経幹細胞の運命制御に重要なエピジェネティクス基盤を明らかにすることができた。また、胎児脳から神経幹細胞からニューロンまで分化段階ごとに細胞を適切に回収する手法を確立し、この分野の発展に貢献することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発生初期の神経幹細胞の運命制御の異常は、様々な神経発達障害の原因となることが示唆されている。そのため、本研究で確立した神経細胞の適切な分取方法は、神経発生を理解するためのみならず、ヒトの神経疾患を理解するために重要である。さらに、いくつかの神経発達障害ではニューロンの興奮と抑制のバランスの異常が原因であると考えられている。ポリコム群タンパク質は興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの産み分けに必須の役割を果たすことを見出しており、神経発達障害での興奮と抑制のバランス異常の原因を調べる上でも重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the mechanism for the transition of neural stem cells transition from the transition phase, during which they self-renew, to the neurogenic phase, during which they produce neurons. As a result, we were able to elucidate the epigenetic basis for the regulation of neural stem cell fate, including the importance of suppression of target gene expression by Polycomb group proteins for neuronal differentiation. In addition, we were able to contribute to the development of this field by establishing a method for the appropriate isolation of cells from the embryonic brain at each stage of differentiation to neural stem cells to neurons.

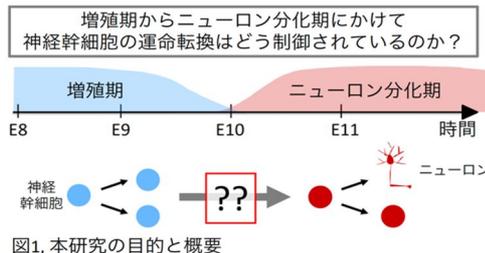
研究分野：分子生物学

キーワード：神経幹細胞 エピジェネティクス ポリコム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳の高次機能をつかさどる大脳新皮質の幹細胞である神経幹細胞は、発生早期においては盛んに増殖を繰り返すことで神経幹細胞の数を増やし(増殖期)、発生中期にはニューロンを産生する(ニューロン分化期)。この神経幹細胞の運命転換のタイミングは厳密に制御される必要があり、例えば増殖期からニューロン分化期への移行が遅くなると、神経幹細胞の数が過剰になって脳は異常に大きくなる可能性がある。実際に種間での脳の大きさの違いの原因の1つが神経幹細胞の増殖期の長さだと考えられており、マウスでは2-3日で終わってしまうのに対してヒトでは2-3週間も続くことがわかっている。また、この増殖期の長さの制御は認知機能とも関連があると考えられており、増殖期の異常と自閉症などの精神疾患の関連を示唆する研究もある。しかし、現在までに神経幹細胞の増殖期からニューロン分化期への移行メカニズムはほとんど明らかにされていない。



2. 研究の目的

本研究では、神経幹細胞の増殖期からニューロン分化期への運命転換を制御する因子を同定し、神経幹細胞の形質の変化を包括的に理解することを目指した(図1)。

3. 研究の方法

哺乳類神経幹細胞のモデル動物としてマウスを用いた。野生型および遺伝子改変マウスの胎児の脳から神経幹細胞やニューロンを分取し、細胞培養や生化学実験を行い、また固定して免疫組織染色を行うことで研究を遂行した。

4. 研究成果

(1) 胎児脳から神経幹細胞と各分化段階のニューロンを回収する手法の確立 (Kishi and Gotoh, STAR protocol, 2021)

生体脳で起きる実際のニューロン分化過程を理解するためには、ニューロンを産生する神経幹細胞から各分化段階のニューロンを適切に回収する必要がある。しかしながら、これまでにそのような手法は確立されていなかった。

そこで我々は、胎児脳を分散したのちに神経幹細胞の表面抗原マーカーCD133 と分化したニューロンの表面抗原マーカーCD24 で染色し、FACSにて細胞を分取する手法を確立した(図2AB)。これにより分取した細胞の遺伝子発現パターンをRT-qPCRにて確認したところ、CD133

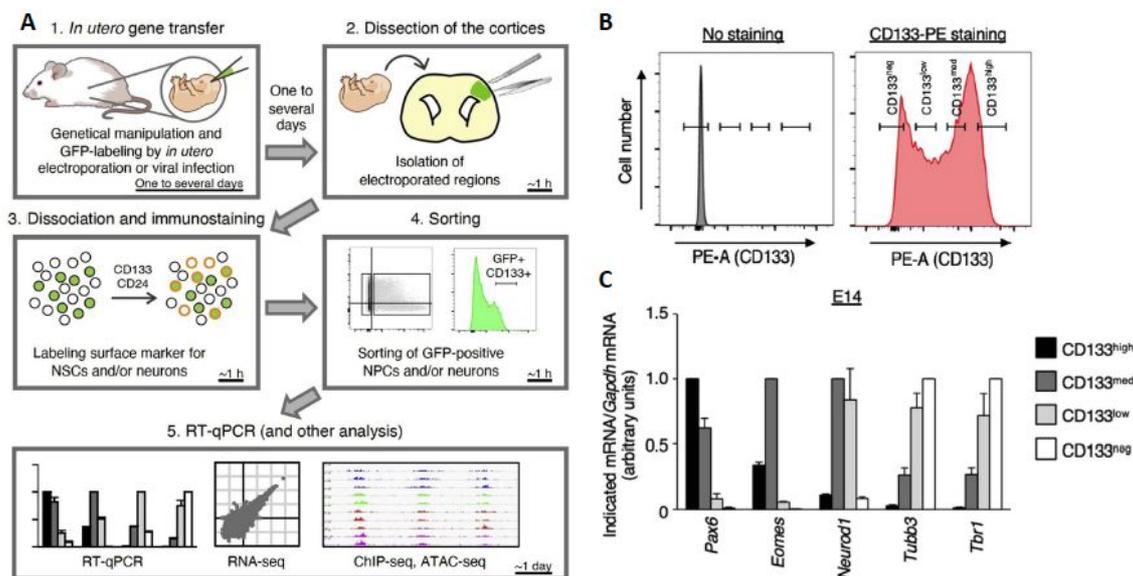


図2. 胎児脳から神経幹細胞と各分化段階のニューロンを回収する手法の確立

- A. 確立したプロトコルの概要
- B. マウス胎児脳から分散した細胞をCD133で染色しFACSでソートした
- C. 胎生14日目(E14)の大脳新皮質から分取した細胞を用いて、神経幹細胞マーカーPax6、中間分化マーカーEomes, Neurod1、分化ニューロンマーカーTubb3, Tbr1のRT-qPCRを行った。

Kishi and Gotoh, STAR protocol, 2021より転載

高発現細胞、CD133 低発現細胞、CD133 陰性細胞の順に、神経幹細胞マーカーの Pax6、ニュー

ロン中間分化細胞マーカーの *Eomes* や *NeuroD1*、そしてニューロン分化マーカーの *Tubb3* や *Tbr1* が発現していく推移を観察することができた (図 2C)。

また、ニューロン分化における分子メカニズムを明らかにするためには、研究対象の遺伝子を過剰発現あるいはノックダウンした上で、神経幹細胞や各分化段階のニューロンを回収して解析することが必要である。我々は、子宮内電気穿孔法 (in utero electroporation) にて GFP を遺伝子導入した胎児脳から、CD133・GFP 共陽性細胞を回収することで、神経幹細胞特異的に遺伝子導入の効果調べること成功している。

(2) 興奮性ニューロンと抑制性ニューロンが適切に産生されるためのエピジェネティクス基盤の解明 (Eto et al., *Nat. Commun.*, 2020)

大脳の背側に位置する大脳皮質と腹側に位置する大脳基底核は、認知機能や運動調節などを連携しながら制御する重要な部位である。脳が発生する際には、背腹軸に沿ってそれぞれの部位に存在する神経幹細胞が異なる種類のニューロンやグリア細胞を生むことで部位特有の機能の獲得に貢献する。例えばニューロンには大きく分類して興奮性ニューロンと抑制性ニューロンが存在するが、大脳においてこれらは発生時に背側と腹側の神経幹細胞からそれぞれ産み出される。この脳の背腹軸という位置の情報に従った神経幹細胞の形成においては、大脳の最も背側の領域(背側正中線)から分泌されるモルフォゲンの BMP と Wnt が神経幹細胞を「背側化」し、一方最も腹側の領域から分泌される Shh が「腹側化」に貢献することがわかってきた。しかし、どのようにして特定の場所の神経幹細胞からのみ BMP、Wnt、Shh が発現するのかは不明であった。

我々は、様々な組織の発生や幹細胞の制御に重要なエピゲノムであるポリコム群タンパク質に注目して解析を進めた。まず、PcG の必須構成因子である Ring1 タンパク質を神経系で欠損したマウスを作成して、胎生早期大脳における背側・腹側神経幹細胞の分化を解析した。すると興味深いことに、Ring1 KO マウスでは腹側領域に存在する神経幹細胞において、背側の神経幹細胞の運命決定に関わる因子 (*Pax6*) を発現するようになった一方、腹側の神経幹細胞の運命決定に関わる因子 (*Nkx2.1* や *Gsx2*) の発現が減少することがわかった (図 3C)。このとき、大脳腹側領域では興奮性ニューロンのマスター制御因子である *Neurog1* の発現が増加し、抑制性ニューロンのマスター制御因子である *Ascl1* の発現が低下していた。つまり、腹側神経幹細胞の分

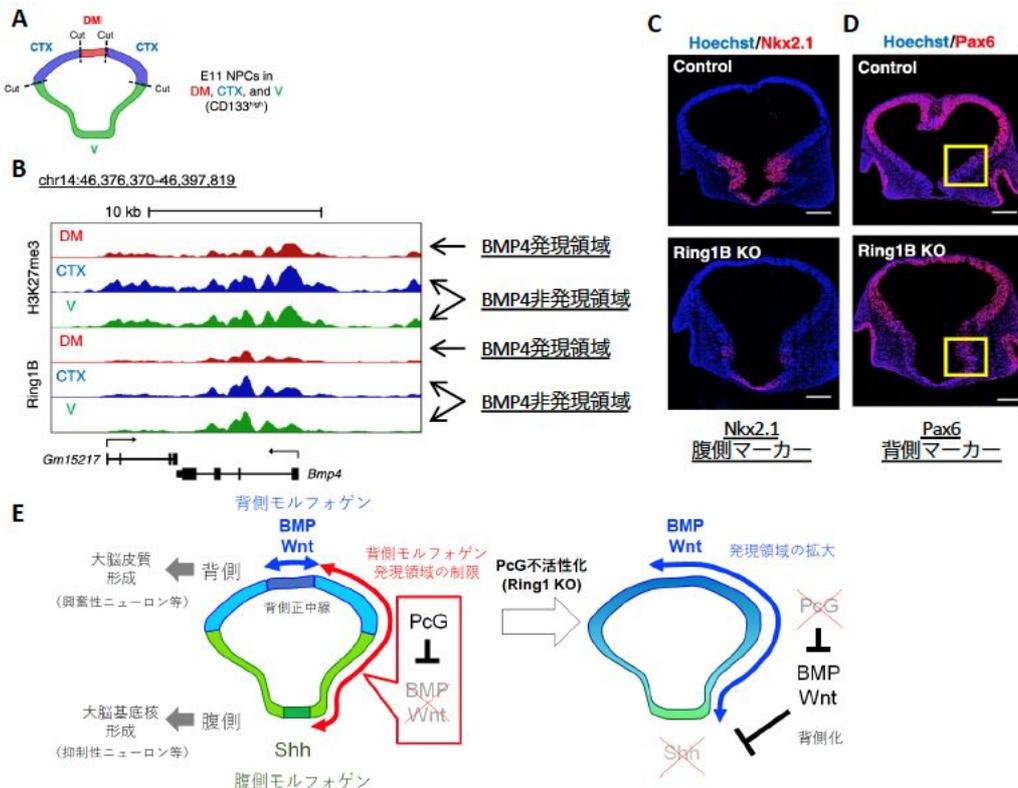


図3. 興奮性ニューロンと抑制性ニューロンが適切に産生されるためのエピジェネティクス基盤の解明

- A. 背側正中線 (DM)、背側 (CTX)、腹側 (V) の神経幹細胞を用いてH3K27me3を調べた
- B. *BMP4*遺伝子座において、発現領域 (DM) で特異的にH3K27me3が減少している
- C. PcGの必須構成因子Ring1Bのノックアウトにより腹側マーカー*Nkx2.1*の発現が減弱した
- D. PcGの必須構成因子Ring1Bのノックアウトにより腹側マーカー*Pax6*の発現が亢進した
- E. 本研究の仮説: PcGによって背側モルフォゲンの発現領域が限定されることが背腹軸形成に重要

Eto et al., *Nat. Commun.*, 2020, プレスリリースより転載

化運命が背側化したことが示唆された。これらの結果から、PcG は腹側に位置する神経幹細胞が

腹側の性質を獲得するのに重要な役割を果たすことがわかった。

では、PcG はいかなるメカニズムを介して神経幹細胞の運命を制御しているのだろうか？ PcG はヒストン H3 のリジン 27 にトリメチル化 (H3K27me3) などによって遺伝子発現を抑制することが知られている。そこで PcG による遺伝子発現への影響を調べるために、Ring1 欠損細胞を用いて網羅的遺伝子発現解析を実施したところ、興味深いことに腹側神経幹細胞において BMP や Wnt の遺伝子の発現が増加していることがわかった。重要なことに、H3K27me3 や Ring1B のゲノム上の局在を調べたところ、背側正中線以外の領域で BMP や Wnt の遺伝子座に集積していることがわかった (図 3AB)。さらに BMP や Wnt が腹側神経幹細胞で異常に活性化すると、腹側モルフォゲン Shh の発現が抑制されてしまうことも明らかになった。これらの結果から、PcG は BMP や Wnt の背側正中線以外の領域での発現を抑制することで、腹側神経幹細胞の適切な分化を促していることがわかった。

本研究は、大脳皮質と大脳基底核という非常に重要な脳部位を決定する初めのステップを分子的に明らかにした点で大きな意義がある。また背側と腹側の大脳神経幹細胞からそれぞれ生み出される興奮性と抑制性ニューロンの正しいバランスは脳機能に重要であり、本研究はそのバランスが崩れて発症する精神発達障害の理解につながることを期待される。

#### < 引用文献 >

Isolation of genetically manipulated neural progenitors and immature neurons from embryonic mouse neocortex by FACS

Yusuke Kishi\* and Yukiko Gotoh (\*Correspondence)

*STAR protocol*, 2, 100540, 2021

The Polycomb group protein Ring1 regulates dorsoventral patterning of the mouse telencephalon.

Hikaru Eto#, Yusuke Kishi#\*, Nayuta Yakushiji-Kaminatsu, Hiroki Sugishita, Shun Utsunomiya, Haruhiko Koseki, and Yukiko Gotoh\* (#Equal contribution, \*Correspondence)

*Nature Communications*, 11, 5709, 2020

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Miho Koizumi, Hikaru Eto, Mai Saeki, Masahide Seki, Tsuyoshi, Fukushima, Shoichiro Mukai, Hisamitsu Ide, Yasuyuki Sera, Masayuki, Iwasaki, Yutaka Suzuki, Atsushi Tohei, Yusuke Kishi, and Hiroaki Honda	4. 巻 36
2. 論文標題 UTX deficiency in neural stem/progenitor cells results in impaired neural development, fetal ventriculomegaly, and postnatal death	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202201002rr	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 Tanita Frey, Tomonari Murakami, Koichiro Maki, Takumi Kawaue, Ayaka Sugai, Naotaka Nakazawa, Taiji Adachi, Mineko Kengaku, Kenichi Ohki, Yukiko Gotoh, Yusuke Kishi	4. 巻 -
2. 論文標題 Age-associated reduction of nuclear shape dynamics in excitatory neurons of the visual cortex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 504704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.08.22.504704	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 -
1. 著者名 Yusuke Kishi, Yurie Maeda, Naohiro Kuwayama, Yukiko Gotoh	4. 巻 -
2. 論文標題 A simple method for gene expression in endo- and ectodermal cells in mouse embryos before neural tube closure	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 86330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.05.14.086330	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 -
1. 著者名 Yusuke Kishi* and Yukiko Gotoh (*Correspondence)	4. 巻 2
2. 論文標題 Isolation of genetically manipulated neural progenitors and immature neurons from embryonic mouse neocortex by FACS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR protocol	6. 最初と最後の頁 100540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100540	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 Hikaru Eto and Yusuke Kishi* (*Correspondence)	4. 巻 43
2. 論文標題 Brain regionalization by Polycomb-group proteins and chromatin accessibility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioEssays	6. 最初と最後の頁 e2100155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bies.202100155, 2021	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 Eto Hikaru, Kishi Yusuke, Yakushiji-Kaminatsui Nayuta, Sugishita Hiroki, Utsunomiya Shun, Koseki Haruhiko, Gotoh Yukiko	4. 巻 11
2. 論文標題 The Polycomb group protein Ring1 regulates dorsoventral patterning of the mouse telencephalon	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-19556-5	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yusuke Kishi
2. 発表標題 The role of PcG in regionalization of the mouse telencephalon
3. 学会等名 The International Symposium on Development and PLASTICITY of NEURAL (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸雄介
2. 発表標題 ニューロンの発生・老化過程におけるクロマチン制御
3. 学会等名 第421回発生研セミナー (招待講演)
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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