

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03413

研究課題名（和文）異所性灰白質病態と脳進化に関わる脳室下帯の形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of subventricular zone formation in heterotopia pathology and brain evolution

研究代表者

川口 綾乃（Kawaguchi, Ayano）

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：90360528

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：中枢神経系が正常な生理的機能を果たすためには正しく形成された脳組織構造が必要である。本研究の目的は発生期脳の脳室下帯（SVZ）に存在する前駆細胞誕生の分子機構を明らかにし脳組織複雑化のメカニズムを理解することである。発生時刻の進行にともない発現上昇する転写因子Tox3に注目し、マウスとフェレットでの発現を検証し、マウスin vivo強制発現実験とライブイメージング、下流の遺伝子発現の解析ならびにloss-of-function実験を行った。これらの結果から、本分子がSVZ前駆細胞を誕生させ脳組織複雑化に貢献していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、Tox3が脳発生において脳を構成する様々な細胞を生み出す前駆細胞の「集団移動」に重要な役割を果たしていることが確認された。また、これらの前駆細胞の集団移動とニューロン分化に伴う細胞移動が共通の分子機構で制御されていることが示された。マウスとフェレットモデルを用いた比較研究の結果は、進化に伴う哺乳類の脳の複雑化を理解するうえでも興味深い成果である。正常な脳発生の理解が深まり、将来的には神経発生異常やニューロン移動障害など関連する疾患の病態理解につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：To ensure the proper physiological functions of the central nervous system, a correctly formed brain structure is necessary. This study aims to elucidate the molecular mechanisms generating progenitor cells in the subventricular zone (SVZ) of the developing brain. Focusing on the transcription factor Tox3, which increases its expression in neural progenitors along with development goes, we validated its expression in mice and ferrets. Through in vivo forced expression experiments in mice, live imaging, analysis of downstream gene expression and loss-of-function experiments, we demonstrated that Tox3 induces the repositioning of ventricular zone progenitor cells to become SVZ progenitors.

研究分野：発生神経科学

キーワード：神経幹細胞 神経前駆細胞 大脳形成 脳進化

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系が正常な生理的機能を果たすためには正しく形成された脳組織構造が必要である。哺乳類の脳組織の形成過程では、脳室面近くの脳室帯(VZ)に細胞体をもつ神経前駆細胞がいわゆる神経幹細胞として多くの細胞を生み出していく。神経前駆細胞から生まれたニューロン(あるいは中間前駆細胞 intermediate progenitor cell, IP=ニューロンを2個生じる分化細胞)は、神経前駆細胞の放射状ファイバーに沿ってVZ上端まで移動したのち、SVZ(脳室下帯)で多極性に形態を変えて多方向に向けた細胞移動を行い、外層へ向けて移動し大脳皮質を形成する。一方、フェレットやヒトなど、脳回を有するより生物ではSVZはより肥厚化し明瞭な層を形成している。そこには別のタイプの未分化な神経幹細胞である外放射状グリア(outer radial glia, =oRG)が多数存在し、分裂を繰り返して大量のニューロンを産生することで、脳組織の複雑化・巨大化に貢献している。マウスではSVZに存在する前駆細胞の多くは分化しつつあるIPであるが、少数のoRGも存在していることが知られている。oRG 誕生の制御機構を明らかにすることは、ヒトの複雑な脳組織形成を理解することに繋がると考えられる(図1)。

ヒト脳組織の複雑化に貢献するとしてoRGが注目を浴びる中、oRGがVZの神経前駆細胞集団から誕生する分子機構は、代表者らが世界に先駆けて報告した(文献1)。oRGは発生のある一時期のみ、VZの神経前駆細胞の一部が脳室面に対して斜めに分裂することによって誕生する。単一細胞トランスクリプトーム解析のデータを利用し機能的スクリーニングにより同定したLzts1(Leucine zipper putative tumor suppressor 1)は、マウス脳内で、神経前駆細胞の斜め分裂を介したoRG誕生をもたらすとともに、ニューロンに分化する細胞の脳室面からの速やかな離脱に働いていた。Lzts1は微小管系とアクチオン系の両者に作用し斜め分裂および細胞突起の離脱を惹起する、いわば実行役の分子である。

ヒトも含む複雑脳でもLzts1はoRG誕生の鍵となっていると考えられ、実際、マウスよりもフェレットやヒトのほうが斜め分裂の頻度が高い。Lzts1は全てのニューロン分化細胞で強く発現するのに加え、VZの神経前駆細胞集団内では一部の細胞だけに低レベルで発現する。したがって、神経前駆細胞集団内でのLzts1陽性細胞の頻度が増加することが、脳の進化の過程で観察されるoRG誕生の増加、ひいてはヒトの複雑脳形成に貢献しているものと推察された。Lzts1はproneural遺伝子であるNeurogeninの下流で発現上昇するが(文献1)、一部VZの神経前駆細胞内でLzts1が発現する機構は不明である。

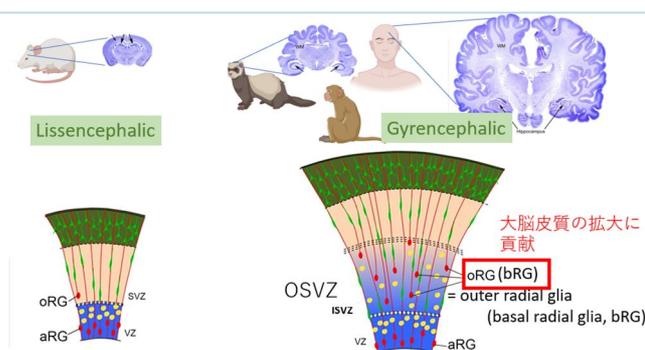


図1 oRGはSVZにある別のタイプの神経幹細胞(神経前駆細胞)である

2. 研究の目的

本研究の目的は、哺乳類の脳発生における外放射状グリア(oRG)の誕生数を制御する上流の分子メカニズムを明らかにし、SVZの形成過程を詳細に理解することである。具体的には、以下の2点に焦点を当てた:

- (1) マウス発生時期の脳原基に注目し、発生時期に応じたoRGや中間前駆細胞(IP)の誕生を制御する分子機構を明らかにする。

(2) マウスおよびフェレットをモデル動物として用い両者を比較することで、進化に伴う脳構造の複雑化に關与するメカニズムを理解する

この研究により、SVZ の形成に關与する分子メカニズムを解明するとともに、神経発生異常や關連する疾患の病態理解にも寄与することを目指した。

3 . 研究の方法

予備的実験の結果から、胎生初期から中期にかけて神経前駆細胞内で発現上昇する転写因子 Tox および Tox3 (文献2) の關与が疑われたため、in vivo における機能解析を中心に研究を推進した。具体的な方法は以下の通り：

(1) 遺伝子発現操作：in vivo 子宮内エレクトロポレーション法(IUE)を用いて、マウス大脳原基内での Tox および Tox3 遺伝子の過剰発現およびノックダウン操作を行った。

(2) Tox と Tox3 の同時 loss-of-function 解析：Tox ノックアウトマウスを iGONAD 法(文献3)によるゲノム編集で新たに作成し、これに Tox3 siRNA によるノックダウンを行った。

組織学的解析：エレクトロポレーション後の脳組織を固定し、免疫染色や in situ hybridization を用いて、神経前駆細胞や分化細胞の分布と形態を解析した。フェレット胎仔脳での解析も同様に行った。

(3) ライブイメージング：スライス培養を用いて、神経前駆細胞の分裂パターンと移動のリアルタイム観察を行った。観察にはレーザー共焦点顕微鏡(FV3000,Evident; CV1000, Yokogawa)を使用した。

(4) 遺伝子発現変化の定量的解析：Tox3 強制発現により発現変化する候補遺伝子の mRNA 発現レベルについて定量的解析を行った。

4 . 研究成果

本研究により、SVZ 形成における中間前駆細胞(IP)および外放射状グリア(oRG)の誕生が特定の転写因子 Tox3 の発現によって制御されることが明らかとなった。

(1) Tox3 の強制発現実験

Tox3 は、胚発生の初期から中期にかけて神経前駆細胞で発現が増加する転写因子である。IUE により胎生初期の大脳壁へ強制発現するとニューロン分化が誘導された。一方、胎生中期に発現させた場合には明確なニューロン分化誘導作用は観察されなかった。詳細な解析を行った結果、胎生中期においては強制発現によって SVZ で分裂する前駆細胞が増加すること、これらの多くが誕生直後の中間前駆細胞の特徴を有することが確認された。

(2) ライブイメージング

Lzts1 強制発現時で観察される特徴的な基底膜側への細胞の動きを含め、SVZ の前駆細胞増加に關係する細胞挙動が頻繁に観察された。

(3) Tox3 の loss-of-function 実験

Tox3 の family 分子である Tox も胎生期脳で同様の発現パターンを示す(文献2)。Tox3 および Tox の単独ノックダウンでは SVZ 分裂細胞の数について明確な表現型が観察されなかった。そこで Tox のノックアウトマウスを作成し、Tox^{-/-}マウス胎仔に対して Tox3 の IUE を行ったところ、SVZ 分裂細胞の減少が観察された。

(4) 遺伝子発現変化の半定量的解析

Tox3 強制発現により発現変化する候補遺伝子の mRNA 発現レベルについて高感度 FISH デジタルデータの定量的解析を行い、ニューロン分化に關係する複数の遺伝子の発現レベルが変化したことを確認した。

(5) フェレットモデルでの検証

フェレットを用いた実験で Tox3 の発現パターンを確認しマウスと比較した。両者における発現パターンの違いが、SVZ の形成と神経前駆細胞の分化に役割を果たしている可能性が示唆された。

これにより、Tox3 によって SVZ 内での神経前駆細胞の位置変化と oRG の誕生が制御されることが明らかになった。胎生初期から中期にかけて神経前駆細胞内で Tox3 発現レベルが上昇することを考えると、この上昇が発生の時間軸に沿った IP と oRG の誕生増加に貢献していることが示唆される。また、Tox3 発現上昇によりニューロン分化に関係する複数の遺伝子の発現が変化することから、SVZ 前駆細胞誕生とニューロン分化に伴う細胞移動の分子メカニズムがシェアされていることが示唆された（図2）。これは、フェレット VZ での Tox3 発現パターンと合わせ、複雑な大脳組織構造を持つ生物主でなぜ oRG が多いのかということ考察するうえで興味深い点である。

これらの研究成果は国内外の学会・シンポジウム等で発表され、学術論文として投稿準備中である。得られた成果により、正常な脳発生の理解が深まり、将来的には神経発生異常やニューロン移動障害（ヘテロトピア、異所性灰白質症）など関連する疾患の治療法開発に寄与する可能性がある。

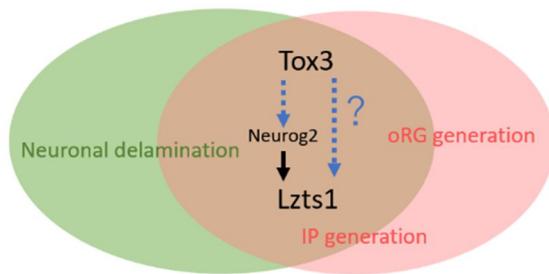


図2 ニューロン分化に伴う細胞離脱と前駆細胞の SVZ への移動の分子メカニズム

参考文献

- 1) Kawaue T et al., Nat Commun,10:2780, 2019.
- 2) Artegiani et al., EMBO J, 34(7):896-910,2015
- 3) Otsuka and Sato, Dev Growth Differ, 61(5):306-315, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Hatsuda Akane, Kurisu Junko, Fujishima Kazuto, Kawaguchi Ayano, Ohno Nobuhiko, Kengaku Mineko	4. 巻 150
2. 論文標題 Calcium signals tune AMPK activity and mitochondrial homeostasis in dendrites of developing neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development	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） 10.1242/dev.201930	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 Yang Chen, Shitamukai Atsunori, Yang Shucai, Kawaguchi Ayano	4. 巻 24
2. 論文標題 Advanced Techniques Using In Vivo Electroporation to Study the Molecular Mechanisms of Cerebral Development Disorders	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 14128 ~ 14128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms241814128	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 該当する
1. 著者名 Kawaguchi Ayano	4. 巻 135
2. 論文標題 形態学の視点でとらえる神経前駆細胞の運命決定	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Okayama Igakkai Zasshi (Journal of Okayama Medical Association)	6. 最初と最後の頁 12 ~ 17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4044/joma.135.12	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 下向敦範, Chen Yang, 川口綾乃	4. 巻 55
2. 論文標題 Regulation of neural stem cell morphology in brain development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 月間「細胞」	6. 最初と最後の頁 850 ~ 853
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する

1. 著者名 Yuki Hattori , Daisuke Kato , Futoshi Murayama , Sota Koike , Hisa Asai , Ayato Yamasaki , Yu Naito , Ayano Kawaguchi , Hiroyuki Konishi , Marco Prinz , Takahiro Masuda , Hiroaki Wake , Takaki Miyata	4. 巻 42
2. 論文標題 CD206+ macrophages transventricularly infiltrate the early embryonic cerebral wall to differentiate into microglia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112092	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 Ayano Kawaguchi	4. 巻 8
2. 論文標題 Neuronal Delamination and Outer Radial Glia Generation in Neocortical Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front. Cell Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 623573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.623573	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 川口綾乃	4. 巻 92
2. 論文標題 細胞離脱の実行役分子Lzts1による大脳形成制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Biochemical Society	6. 最初と最後の頁 817-821
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920817	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 Yuki Hattori , Yu Naito , Yoji Tsugawa , Shigenori Nonaka , Hiroaki Wake , Takashi Nagasawa , Ayano Kawaguchi , Takaki Miyata	4. 巻 11
2. 論文標題 Transient microglial absence assists postmigratory cortical neurons in proper differentiation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15409-3	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10件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 川口綾乃
2. 発表標題 上皮構造からの細胞離脱による器官形成制御
3. 学会等名 JST創発的研究支援事業「融合の場」第1回公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayano Kawaguchi
2. 発表標題 Generation of outer radial glial cells that contribute to evolutionary expansion of the cerebral cortex
3. 学会等名 Neuro2022 第45回日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 城航平、川口綾乃、宮田卓樹
2. 発表標題 TOX3によるouter radial gliaの誕生の制御
3. 学会等名 第82回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayano Kawaguchi
2. 発表標題 Mechanisms regulating neuronal delamination and repositioning of neural progenitor cells in cerebral development
3. 学会等名 International Symposium on Neural Development and Diseases（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川口綾乃
2. 発表標題 発生期の神経幹細胞の挙動の制御機構とその脳形成への貢献
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayano Kawaguchi
2. 発表標題 Neuronal delamination and outer radial glia generation in neocortical development
3. 学会等名 The International Symposium on Development and Plasticity of Neural Systems（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川口綾乃
2. 発表標題 上皮構造からの細胞離脱による器官形成制御
3. 学会等名 新学術領域「脳構築における発生時計と場の連携」領域班会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川口綾乃
2. 発表標題 発生時刻進行に伴い神経前駆細胞内で発現上昇する遺伝子のin vivo 機能解析
3. 学会等名 新学術領域「脳構築における発生時計と場の連携」領域班会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川口綾乃
2. 発表標題 脳発生におけるニューロン移動開始の鍵分子 Lzts1の機能からみる大脳組織形成の仕組み
3. 学会等名 第63回神経化学学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下向敦範、間瀬俊、末次妙子、川口綾乃、松崎文雄
2. 発表標題 神経幹細胞と外界シグナルをつなぐ細胞形態
3. 学会等名 第129回 日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023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
研究分担者	岡本 麻友美 (Okamoto Mayumi) (30551965)	奈良女子大学・自然科学系・准教授 (14602)	
研究分担者	宮田 卓樹 (Miyata Takaki) (70311751)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	

	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	下向 敦範 (Shitamukai Atsunori) (00442971)	岡山大学・医歯薬学域・講師 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	小見山 高明 (Komiya Takaaki) (20884795)	岡山大学・歯学部・技術専門職員 (15301)	

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