

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06893

研究課題名(和文) 大脳皮質形成における霊長類型の神経幹細胞産生に関わる遺伝子の網羅的探索

研究課題名(英文) Comprehensive analysis to identify genes involved in the production of outer subventricular zone progenitors

研究代表者

廣瀬 智威 (HIROSE, Tomonori)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：20381668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：終脳の発生過程では、適切な種類と数の神経細胞を産生するため、神経幹細胞・前駆細胞は発生初期には自己複製のみを行い、適切な時期に神経産生期に移行して自己複製と神経分化を行っている。しかし、この移行に関与する分子機構は未解明の点が多かった。本研究では、細胞極性制御因子PAR3の終脳特異的欠損マウスを中心に解析を進め、PAR3が正常なシリア形成を通じてSmoの局在制御に必須の機能を果たし、神経幹細胞・前駆細胞の増殖を促進するヘッジホッグ系の活性化を制限する役割を持つことを明らかにした。この機能によって、PAR3は神経幹細胞・前駆細胞が自己複製から神経分化へ移行する際に必須の働きを担うと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経幹細胞・前駆細胞が増幅期から神経産生期に移行するタイミングの制御は、最終的な神経細胞数を規定することになるため、大脳形成にとって極めて重要な局面である。しかし、この制御に関わる分子機構はほとんど理解が進んでいなかった。本研究によって、この制御機構では細胞極性制御因子PAR3によるヘッジホッグ系の制限が重要な働きを持つことを明らかにした。更に、高等哺乳類の大脳皮質形成に寄与していると考えられている脳室帯外神経幹細胞(OSVZCs)を含む神経産生機構において、ヘッジホッグ系の制限解除が寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：During brain development, neural precursor cells (NPCs) expand initially, and then switch to generating stage-specific neurons while maintaining self-renewal ability. However, the molecular mechanisms underlying this transition are poorly understood. In this study, we found that the telencephalon-specific loss of PAR3 before the start of neurogenesis leads to increased NPC proliferation at the expense of neurogenesis. These NPCs demonstrate hyperactivation of hedgehog signaling in a smoothed-dependent manner, as well as defects in primary cilia. Furthermore, loss of PAR3 enhanced ligand-independent ciliary accumulation of smoothed and an inhibitor of smoothed ameliorated the hyperproliferation of NPCs in the telencephalon. Thus, these findings support the idea that PAR3 has a crucial role in the transition of NPCs from the expansion phase to the neurogenic phase by restricting hedgehog signaling through the establishment of ciliary integrity.

研究分野：神経発生

キーワード：PAR3 (PARD3) 神経産生 終脳 ヘッジホッグ系 一次線毛 ノックアウトマウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳の高次機能を司る大脳皮質の構築には、適切な種類と数の神経細胞やグリア細胞を産生する必要がある。これらの細胞は多様な神経幹細胞に由来するので、それらの産生と自己複製による多様性のバランス制御は、各動物種に固有の大脳皮質形成に直結する (Martynoga et al. (2012), *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4:a008359)。近年のヒト胎児脳での新発見を契機に、霊長類を代表とする高等哺乳類の大脳皮質形成では、三種類の多様な神経幹細胞・前駆細胞 (neural precursor cells: NPCs) が相乗的に寄与することが明らかにされてきた (Hansen et al. (2010), *Nature*, 464:554-561; Dehay et al. (2015), *Neuron*, 85:683-694)。これらの細胞のなかでも、進化的に新しく増大した脳室帯外神経幹細胞 (OSVZCs) を含む神経産生機構は、特に大脳皮質の急速な増大や神経細胞の多様化に寄与していることが示唆された (LaMonica et al. (2012), *Curr Opin Neurobiol*, 22:747-753)。しかし、OSVZCs の産生機構は解明が始められたばかりで (Penisson et al. (2019), *Front Cell Neurosci*, 13:381)、大脳皮質形成機構の追究には、霊長類型神経幹細胞である OSVZCs の産生・増殖に関する分子機構の理解こそが鍵になると考えられた。

一方代表者は、これまでに上皮細胞の極性制御機構における PAR3-aPKC 分子複合体の機能解析を続け、その過程で独自に樹立した終脳特異的 PAR3 欠損マウス (*Par3* cKO マウス) の胎児脳では、OSVZCs 様細胞が過剰産生される可能性を見出していた。これらの細胞とヒト OSVZCs は、幹細胞マーカーの発現、細胞形態、分裂装置の配置、大脳皮質内分布の何れもが共通しており、OSVZCs の産生機構を解明する上で、新しいモデル動物としての高い有用性が期待された。

以上から、本研究計画では OSVZCs の産生機構を解明すべく、既存の実験系と共に独自のモデルマウスを応用することで欠点を補完し合い、発達した大脳皮質の形成基盤となる神経幹細胞産生の分子機構の理解拡大を目指した。

2. 研究の目的

OSVZCs の産生機構を追求するにはモデル動物・モデル培養細胞の応用が重要だが、OSVZCs はマウスでは殆ど産生されないため、フェレットやマーモセットの胎児大脳、ヒト iPS 細胞のオルガノイド培養法などが利用されてきた (Reillo et al. (2011), *Cereb Cortex*, 21:1674-1694; Homman-Ludiye & Bourne (2016), *Dev Neurobiol*, 77:263-272; Lancaster et al. (2013), *Nature*, 501:373-379; Di Lullo & Kriegstein (2017), *Nat Rev Neurosci*, 18:573-584)。しかし、これらの実験系には汎用性・再現性などの点で欠点も多く、それぞれの課題に直面して研究は難航している。一方、*Par3* cKO マウスの胎児脳では OSVZCs 様細胞が過剰産生されている可能性があるため、既存の実験系の欠点を補い得ると考え、特に OSVZCs 産生の初期段階の分子機構を解明を目指した。

更に、OSVZCs を含む大脳の各種 NPCs は、それぞれの自己複製能の違いに応じた特徴的なアピカル-ベール細胞極性を有し、自己複製と神経分化への移行に伴って細胞極性を変化させている (Haubensak et al. (2004), *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:3196-3201.; Miyata et al. (2004), *Development*, 131:3133-3145; Taverna et al. (2014), *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30:465-502)。この移行のタイミングを制御することは最終的な神経細胞数を規定することになるため、大脳形成にとって極めて重要な局面である (Rakic (1995), *Trends Neurosci*, 18:383-388)。これまでにマウス大脳の NPCs の自己複製と神経分化のそれぞれにおいて、PAR3-aPKC 分子複合体の各因子の機能解析が進められてきた (Imai et al. (2006), *Development*, 133:1735-1744.; Costa et al. (2008), *Development*, 135:11-22; Bultje et al. (2008), *Neuron*, 63:189-202)。しかし、NPCs が自己複製から神経分化へ移行するための分子機構と細胞極性制御との関連性は未解明の点が多かった。*Par3* cKO マウスの胎児脳ではこの移行に遅延がある可能性が示唆されたので、この異常を分子レベルで解析し、NPCs の分化開始制御における細胞極性制御の役割を追求することにした。

3. 研究の方法

OSVZCs 様細胞を中心に、*Par3* cKO マウスの胎児脳で異所性に増殖亢進が認められる NPCs (図 1) について、以下の方法でコントロールと比較しながら解析した。特に、これらの細胞が自己複製期から神経産生期に移行するタイミングに注目して研究を進めた。

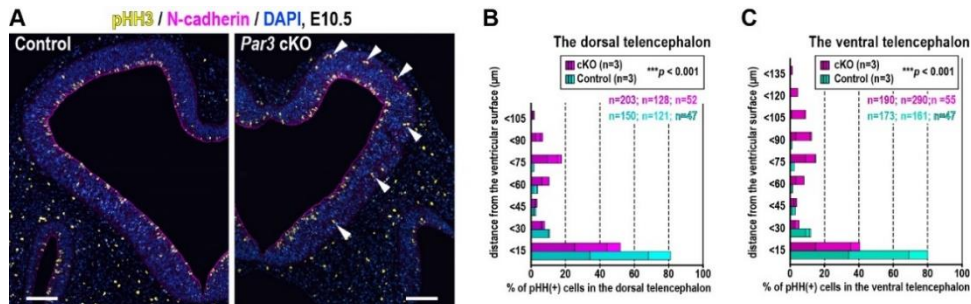


図 1. *Par3* cKO マウスの終脳では、神経幹細胞・前駆細胞が異所性に増殖充進している。(A) 10.5 日胚の終脳冠状断の免疫蛍光染色像。異所性に分裂する神経幹細胞・前駆細胞 (pHH3 陽性) を矢尻で示す。(B,C) 分裂像の脳室面からの距離を終脳背側(B)・腹側(C)に分けて定量解析したグラフ。*Par3* cKO マウスとコントロールマウスを 3 個体ずつ用い、解析した細胞数はグラフ中に示した。

- (1) 増殖充進を認めた上記の細胞の形態学的特徴を捉えるため、特に細胞極性や細胞間接着装置に注目し、各種マーカー (細胞極性 = Pericentrin、p-Vimentin、他; 細胞間接着装置 = β -catenin、N-cadherin、他) の免疫蛍光染色によって形態学的に分析した。
- (2) 上記の細胞の自己複製と神経分化のバランスを分析するため、妊娠 10.5 日目のマウスに対してチミジンアナログ (BrdU) のパルスラベルを行い、BrdU 投与 8 時間後に胎児をサンプリングした。得られた胎児終脳で幹細胞マーカーと神経分化マーカーの免疫蛍光染色を行い、BrdU 陽性細胞について上記のバランスを定量的に分析した。
- (3) これらの細胞の自己複製制御に関連する各種のシグナル伝達系に着目し、それぞれを代表するタンパク質や遺伝子の発現状況を RT-qPCR 法やウエスタンブロット法で分析した。
- (4) 前述のシグナル伝達系のうち、異常活性化を認めたヘッジホッグ系に対する阻害剤を利用し、ニューロスフェア法による初代培養神経幹細胞での阻害効果を RT-qPCR 法で分析した。
- (5) PAR3 の欠損がヘッジホッグ系のどの部分に異常を引き起こすのかを明らかにするため、まずヘッジホッグ系を調節する場であるシリアに注目し、超解像顕微鏡や走査型電子顕微鏡による超微細形態解析を行った。更に、モデル培養細胞を利用した *Par3* RNAi や *Par3* cKO マウスの胎児脳を用い、シリアの形態やヘッジホッグ系の主要調節因子 (Smo、Ptch1) のシリア局在を免疫蛍光染色で定量的に分析した。
- (6) 妊娠中の母体にヘッジホッグ系の阻害剤を投与し、実際に *Par3* cKO マウスの胎児脳で生ずる NPCs の異常増殖を抑制できるのか、細胞増殖への影響を定量的に分析した。

4. 研究成果

- (1) *Par3* cKO マウスで認められる異所性の増殖細胞は、NPCs マーカー陽性 (Sox2 陽性、活性型 Notch ICD 陽性、Pax6 陽性、Ascl1/Mash1 陽性) であり、異所性のアピカルドメイン (図 2E,G、矢尻) を囲むように神経ロゼットを形成するものや、アピカルドメインを失って脳膜側だけに突起を伸ばす OSVZCs 様の形態を示すもの (図 2H、矢印) を多数認めた。以上から、終脳の正常な組織構築には、NPCs が PAR3 依存的な細胞極性制御を受ける必要があることが示唆された。また、PAR3 の欠損により、マウスでもヒト OSVZCs 様の細胞が多数産生されるようになることが示唆された。

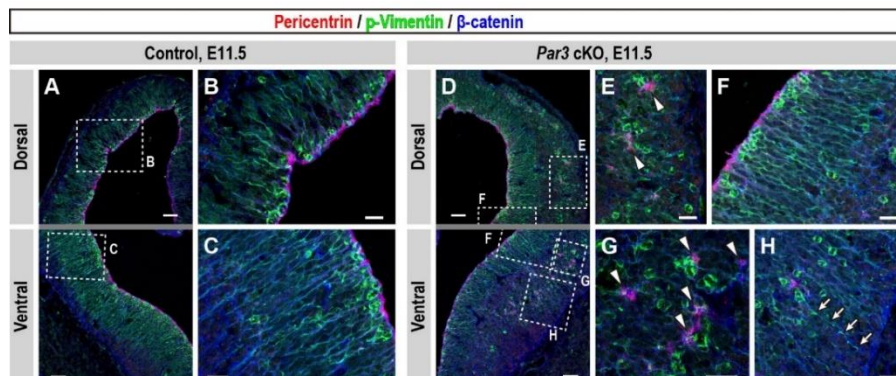


図 2. *Par3* cKO マウスの終脳では、正常な組織構築が阻害される。

(A-H) 胎生 11.5 日胚の終脳冠状断の免疫蛍光染色像。点線で囲んだ領域を拡大して並列に示した。

- (2) 図 3A に示す方法で BrdU 陽性細胞の分化率を定量的に解析し (図 3B,C)、*Par3* cKO マウスの腹側終脳では、増殖亢進した NPCs の神経分化率が有意に低下していることを明らかにした (*Par3* cKO マウス 6.6%, $n=3$ v.s. コントロール 9.9%, $n=4$)。この時期の正常終脳は、NPCs が自己複製を制限して神経産生期に移行するタイミングに相当する。よって、PAR3 は NPCs が適切な時期に神経産生期に移行するために必須の機能を担うことが明らかになった。

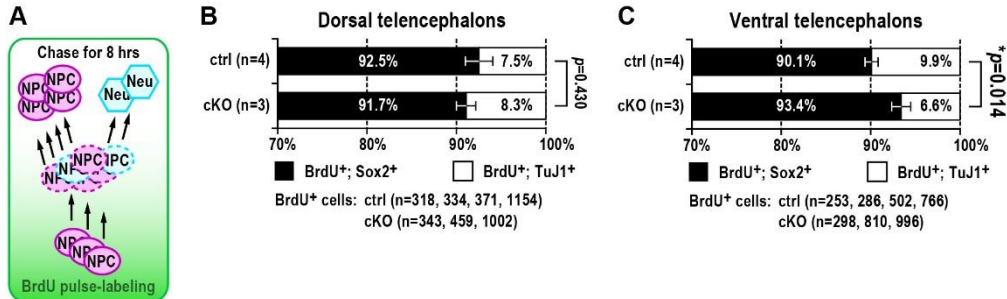


図 3. *Par3* cKO マウスの腹側終脳では、神経分化率が有意に低下する。

(A) 実験概要を示した図。NPC は神経幹細胞・前駆細胞、Neu は神経細胞を表わす。
(B,C) 免疫蛍光染色像を終脳背側(B)・腹側(C)に分けて定量解析したグラフ。*Par3* cKO マウス 3 個体とコントロールマウス 4 個体を用い、解析細胞数はグラフ中に示した。

- (3) PAR3 の欠損によって自己複製の制限が不十分になっている NPCs で、どのような分子機構に異常が生じているかを RT-qPCR 法やウエスタンブロット法で分析した (図 4)。その結果、*Par3* cKO マウスの終脳では、ヘッジホッグ系が有意に亢進していることが明らかになった。これまでも、ヘッジホッグ系の強制亢進により、マウスやフェレットの終脳で OSVZCs 様細胞の産生が増加することが示されており (Wang et al. (2016), *Nat Neurosci*, 19:888-896; Matsumoto et al. (2020), *eLIFE*, 9:e54873)、*Par3* cKO マウスの終脳で観察される表現型の分子機構としても矛盾の無い結果と考えられる。

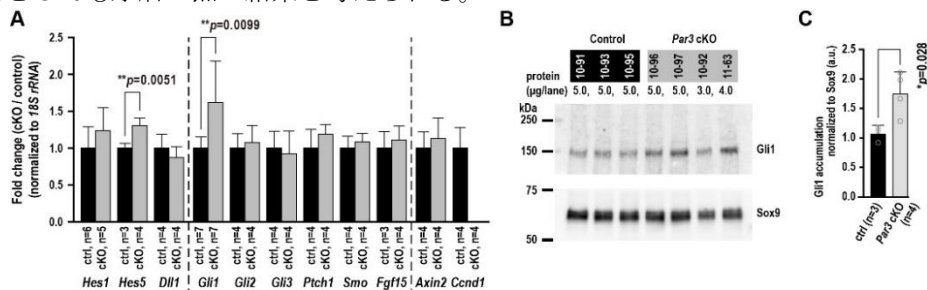


図 4. *Par3* cKO マウスの終脳では、ヘッジホッグ系が異常亢進している。

(A) 胎生 10.5 日の終脳を用いた RT-qPCR 法による各種 mRNA の定量的発現解析の結果。
(B,C) 胎生 11.5 日の各個体から採取した終脳を用い、ウエスタンブロット法で Gli1 タンパク質の蓄積量を適量的に分析した。

- (4) *Par3* cKO マウスの終脳から初代培養で得られたニューロスフェアでも、RT-qPCR 法によってヘッジホッグ系の有意な異常活性化が確認できた。更に、低濃度のヘッジホッグ系に対する阻害剤 (SANT-1) により、この異常活性化が十分に抑制できることも確認した。以上から、*Par3* cKO マウスの NPCs では、Smo 依存的にヘッジホッグ系が異常活性化していることが明らかになった。

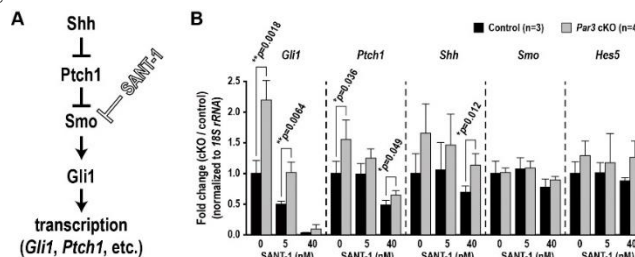


図 5. *Par3* cKO マウスの終脳では、*Smo* 依存的にヘッジホッグ系が異常活性化している。
(A) SANT-1 は、*Smo* に結合することによりヘッジホッグ系を阻害する。**(B)** 11.5 日胚のマウスから初代培養したニューロスフェアに対し、グラフ中に示した濃度の SANT-1 や DMSO を含む培地で 24 時間培養後、各 mRNA の蓄積量を RT-qPCR 法で分析した。

- (5) 胎生 10.5 日のマウスの終脳を用い、超解像顕微鏡でシリアの長さを定量的に解析したところ、*Par3* cKO マウスではコントロールより有意にシリアが短縮していることが明らかになった（中央値 1.01 μm , $n=211$ v.s. 1.12 μm , $n=152$ ）。この形態異常は走査型電子顕微鏡でも確認され、*Par3* cKO マウスでは弾丸状の異常形態を呈するものも認められた。これらの観察により、*Par3* cKO マウスではシリアの異常によってヘッジホッグ系の活性調節が攪乱されていることが示唆された。更に、ヘッジホッグ系の調整因子のうちどの因子に異常が生じているのか、Ptch1-YFP または YFP-Smo の安定発現 NIH3T3 細胞株に対する *Par3* RNAi を組み合わせて定量的に解析した結果、PAR3 の減少によって YFP-Smo がシリアに過剰蓄積することが明らかになった。以上の結果から、PAR3 は正常なシリア形成を通じて、ヘッジホッグ系の活性化を制限する役割を持つ可能性が示唆された。
- (6) *Par3* cKO マウスの終脳脳室面で内在性 *Smo* の局在を超解像顕微鏡で観察してそのシグナル強度を定量的に解析した結果、*in vivo* でも PAR3 の欠損による *Smo* の有意なシリア局在亢進を認めた（**図 6A,B**）。更に、ヘッジホッグ系の異常活性化が *Par3* cKO マウスの NPCs の増殖亢進に寄与している可能性を確認するため、妊娠 9.5 日目のマウスに対して *Smo* 阻害剤（cyclopamine）を投与し、24 時間後に胎児をサンプリングした。得られた胎児終脳で細胞分裂マーカー（pHH3）を免疫蛍光染色して NPCs の増殖性を定量的に解析した結果、*Par3* cKO マウスの NPCs で亢進していた増殖性は、コントロールと同レベルにまで回復した（**図 6C,D**）。
- 以上を総合して終脳での PAR3 の役割をまとめる。胎生 8.5~10.5 日にわたって自己複製による増幅期にあった NPCs が神経産生期に移行する。この移行に呼応して、高レベルだったヘッジホッグ系の活性は制限されていく。ここで PAR3 は、正常なシリア形成を通じて *Smo* の局在制御に寄与することにより、ヘッジホッグ系の活性化を制限する役割を持つと考えられる。

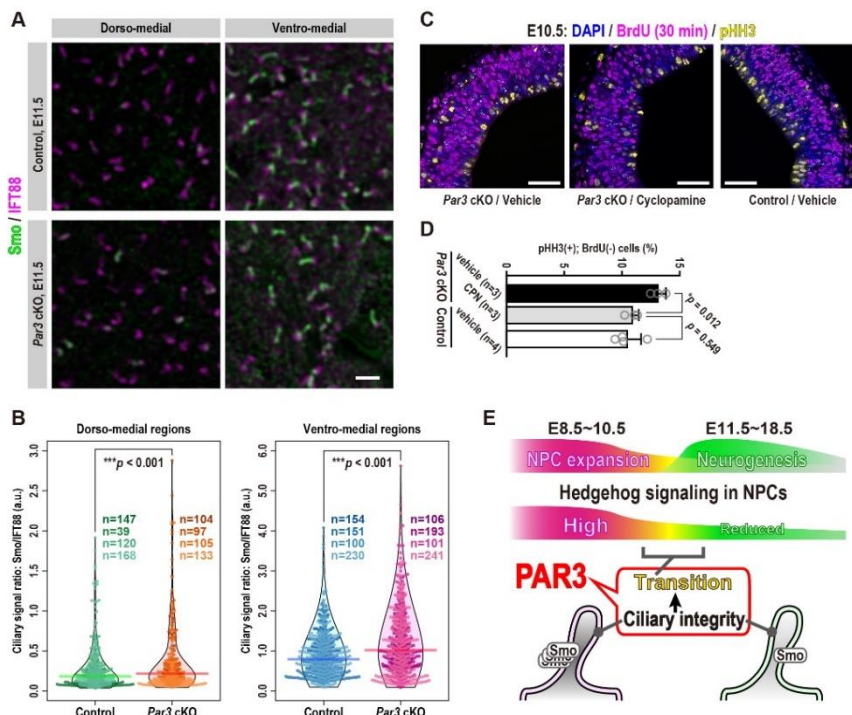


図 6. *Par3* cKO マウスの終脳では *Smo* の異常活性化によって NPCs の過剰増殖が起きる。
(A,B) 胎生 11.5 日胚の終脳脳室面のシリア (IFT88) に集積する *Smo* の超解像顕微鏡像と定量的解析の結果。スケールバーは 2 μm 。**(C,D)** 図に示した処理を行ったマウス終脳で免疫蛍光染色を行い、NPCs で増殖性を定量的に解析した。スケールバーは 50 μm 。**(E)** NPCs が増幅期から神経産生期に移行する上で PAR3 が果たす役割を示す模式図。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hirose Tomonori, Sugitani Yoshinobu, Kurihara Hidetake, Kazama Hiromi, Kusaka Chiho, Noda Tetsuo, Takahashi Hidehisa, Ohno Shigeo	4. 巻 149
2. 論文標題 PAR3 restricts the expansion of neural precursor cells by regulating hedgehog signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev199931
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.199931	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 Suzuki Hidefumi, Abe Ryota, Shimada Miho, Hirose Tomonori, Hirose Hiroko, Noguchi Keisuke, Ike Yoko, Yasui Nanami, Furugori Kazuki, Yamaguchi Yuki, Toyoda Atsushi, Suzuki Yutaka, Yamamoto Tatsuro, Saitoh Noriko, Sato Shigeo, Tomomori-Sato Chieri, Conaway Ronald C., Conaway Joan W., Takahashi Hidehisa	4. 巻 13
2. 論文標題 The 3 Pol II pausing at replication-dependent histone genes is regulated by Mediator through Cajal bodies' association with histone locus bodies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2905
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-30632-w	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 Miyatake Satoko, Kato Mitsuhiro, Kumamoto Takuma, Hirose Tomonori、他	4. 巻 7
2. 論文標題 De novo ATP1A3 variants cause polymicrogyria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabd2368
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abd2368	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 Yamashita Kazunari, Mizuno Keiko, Furukawa Kana, Hirose Hiroko, Sakurai Natsuki, Masuda-Hirata Maki, Amano Yoshiko, Hirose Tomonori, Suzuki Atsushi, Ohno Shigeo	4. 巻 133
2. 論文標題 Phosphorylation and dephosphorylation of Ser852 and Ser889 control the clustering, localization and function of PAR3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs244830
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.244830	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 Watanabe Mika, Kosumi Hideyuki, Osada Shin Ichi, Takashima Shota, Wang Yunan, Nishie Wataru, Oikawa Tsukasa, Hirose Tomonori, Shimizu Hiroshi, Natsuga Ken	4. 巻 30
2. 論文標題 Type XVII collagen interacts with the aPKC PAR complex and maintains epidermal cell polarity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Dermatology	6. 最初と最後の頁 62~67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/exd.14196	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 Tsukiyama Tadasuke, Zou Juqi, Kim Jihoon, Ogamino Shohei, Shino Yuki, Masuda Takamasa, Merenda Alessandra, Matsumoto Masaki, Fujioka Yoichiro, Hirose Tomonori, Terai Sayuri, Takahashi Hidehisa, Ishitani Tohru, Nakayama Keiichi I., Ohba Yusuke, Koo Bon-Kyoung, Hatakeyama Shigetsugu	4. 巻 11
2. 論文標題 A phospho-switch controls RNF43-mediated degradation of Wnt receptors to suppress tumorigenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18257-3	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3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tomonori Hirose, Yoshinobu Sugitani, Hidetake Kurihara, Hiromi Kazama, Chiho Kusaka, Tetsuo Noda, Hidehisa Takahashi, and Shigeo Ohno
2. 発表標題 PAR3 restricts the expansion of neural precursor cells by regulating hedgehog signaling
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬智威
2. 発表標題 様々な細胞の極性を制御する共通分子機構
3. 学会等名 第85回 日本皮膚科学会東京支部学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomonori Hirose, Yoshinobu Sugitani, Hidetake Kurihara, Hiromi Kazama, Chiho Kusaka, Tetsuo Noda, Hidehisa Takahashi, and Shigeo Ohno
2. 発表標題 PAR3 Restricts the Expansion of Neural Precursor Cells by Regulating Hedgehog Signaling
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

横浜市立大学・大学院医学研究科・分子生物学教室 https://ycu-molecularbiology.jp/ 横浜市立大学・大学院医学研究科・分子生物学教室 https://ycu-molecularbiology.jp/
--

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			
米国	St. Jude Children's Research Hospital			
米国	University of Pittsburgh			
イスラエル	Rambam Health Care Campus			
米国	Morsani School of Medicine	at the University of South Florida		
米国	The Feinberg School of Medicine	Northwestern University		