

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870030

研究課題名（和文） 脳形成における領域の違いをもたらす機構の解明

研究課題名（英文） Regulation of the balance between proliferation and differentiation of neural progenitors in different histogenesis of brain.

研究代表者

畠山 淳 (HATAKEYAMA JUN)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：90404350

研究成果の概要（和文）：本研究は、領域性獲得の機構解明を念頭に、神経幹細胞の増殖と分化のバランス制御の解明を目的とする。幼若ニューロンの突起が周囲の神経幹細胞と接着帯を形成する突起は、最終分裂後しばらくは保持されており、この突起の保持時間が神経幹細胞の増殖と分化のバランス調節に重要であることを明らかにした。突起の脱着で分化調節が成されているというのは、脳の領域性形成の1つの機構になり得る全く新しい概念である。

研究成果の概要（英文）：Development of the central nervous system (CNS) requires an exquisite balance between proliferation and differentiation of the neural progenitors. The balance must be important for forming regional histogenesis. However the mechanisms remain poorly understood. Our results indicated that the apical endfeet of nascent neurons are important for regulating the balance. We suggest that the apical endfeet of neurons serve as a switch for neurogenesis, thereby regulating histogenesis of the CNS tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：神経発生学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：神経幹細胞、増殖、分化、脳、領域性、Notch

## 1. 研究開始当初の背景

脳の発生過程において、正しい大きさ、形態、そして組織構造の脳を形成するためには、各領域に応じた神経幹細胞の適切な数の維持と、ニューロン・グリア細胞の適切な時期に適切な数の産生が重要である。神経幹細胞とニューロンの産生のバランスが重要であり、この過程に Notch シグナルが重要であることがわかっている。しかし、神経系全域で機能する Notch シグナルが

どのように調整されて、「領域による神経幹細胞の維持とニューロン産生のバランスの違い」を作り出しているのか不明である。さらに、各領域は、ニューロン産生の頻度の違いに加えて、細胞の配置（層や核構造）や組織の形（隆起や突出）が異なる。しかし、この違いを生じる過程の詳細は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、領域性獲得の機構解明を念頭に、領域特異性を産み出す神経幹細胞の増殖とニューロン産生のバランス調節の機構と、脳組織構造の違いをもたらす機構、さらに脳の形作りの機構の解明をめざす。

## 3. 研究の方法

(1)増殖と分化のバランス調節における、ニューロンと神経幹細胞のコミュニケーションの重要性を検討するため、コミュニケーションの場になっている接着帯の保持状態を人為的に操作し、バランスへの影響を検討する。具体的には、接着帯の構成因子である cadherin の変異体を用いる。ドミナントネガティブとして機能する DN-cadherin や、turn-over の時間が長くなり接着帯の構造が安定化する nE $\alpha$  などを用いる。

(2)同一神経幹細胞由来の細胞群を複数、色で区別できるマウスを用いて、様々なステージで細胞群の大きさと互いの位置関係を解析することで、形態形成における増殖率や細胞の動きを解析する。仕切りの役割をもった細胞群がいるのか、増殖率が場所により違うのか、どの方向へ細胞群は移動運動しているのか、などについて着目する。

## 4. 研究成果

(1)E11.5 で EdU を、その 24 時間後の E12.5 で BrdU を取り込ませ、さらにその 24 時間後に固定して、E11.5 で産生されたニューロン数の領域の違いを検討した。EdU+BrdU-の細胞を E11.5 から 24 時間以内に産まれたニューロンとし、BrdU+の細胞数で割ることでその領域のニューロン産生率を出した。すると、実際に領域によって大きく異なり、例えば、背側大脳では約 15%、腹側大脳では約 74%であった。このように、幹細胞の増殖と分化のバランスは実際に領域によって大きく異なることがわかった。

(2)誕生直後のニューロンの振る舞いを明らかにするために GFP などを用いて可視化し time laps による観察を行なった。まず、マウス胎令 13 日目の大脳皮質で観察し、少なくとも一部のニューロンでは、最終分裂後、皮質に移動する間平均約 12 時間は周囲の神経幹細胞と接着帯を保ったままであることを明らかにした。

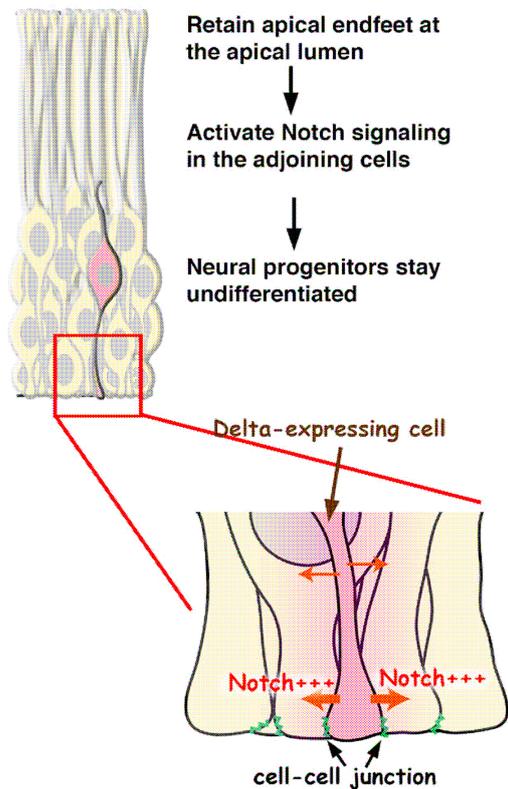
(3)接着帯付近の膜上に Notch シグナルのレセプターとリガンドがより多く存在して相互作用をしていることを電子顕微鏡や組織免疫染色、培養系で明らかにした。

(4)接着帯を利用した Notch シグナルの効率化は神経上皮に限ったことではなく、体節形成においても同じであることを明らかにした。体節は、脊椎動物の基本パターンである脊椎や肋骨を将来うみ出す胚の時期に現れる中胚葉系の規則正しい構造である。この体節をうみ出す未分節中胚葉においては Notch シグナルが重要な働きをしていることが知られている。未分節中胚葉の細胞も接着帯様構造をもっており、この接着帯様構造を壊すと、Notch シグナルの分子の発現が見られなくなる。このことから、神経幹細胞と同様に、未分節中胚葉においても Notch シグナルを正確に活性化させるためには接着帯様の構造が重要であることがわかった。

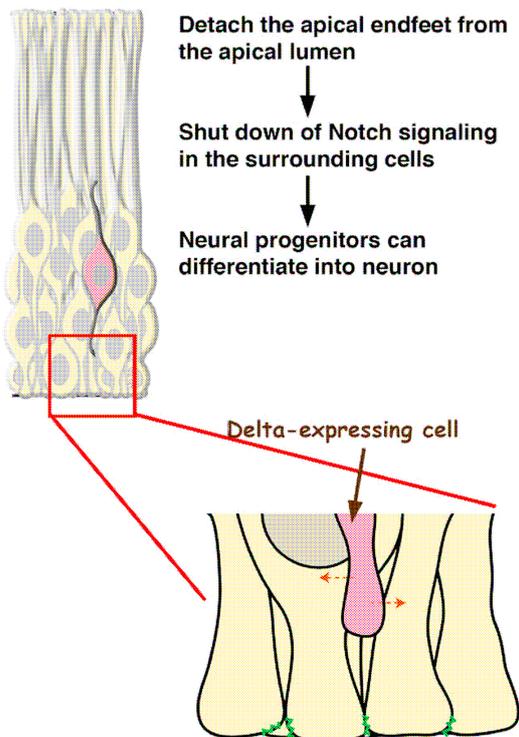
(5) cadherin の変異体を用いることで生まれたばかりのニューロンが神経幹細胞と接着帯を保持する時間を変化させたときの神経分化に対する影響を解析した。マウス大脳皮質をモデルに用いた所、保持する時間が短くなると、神経分化が促進され、早生まれの深層のニューロンが増えた。接着帯を崩壊させると Notch シグナルが減弱するというデータと合わせると、Notch シグナルによる神経幹細胞の維持が脆弱になったことが原因で神経分化が促進されたと考えられる。反対に、保持する時間を長くすると、神経分化が抑制され、遅生まれの浅層ニューロンが増えた。この場合は、Notch シグナルの活性が通常より長く持続したことが原因と考えられる。この結果は、新生ニューロンが神経幹細胞と接着帯を保持する時間が、神経幹細胞の増殖と分化のバランスを制御していることを強く示唆する。幼若ニューロンの突起は、細胞接着帯と Notch シグナルを介して、神経幹細胞における神経分化のペースをコントロールしている可能性が示唆された (図参照)。幼若ニューロンが、脳室帯の突起の脱着によって神経幹細胞の分化を制御するという発想は、神経分化における全く新しい概念である。領域によって接着帯を保持する時間が異なることで、異なった増殖と分化のバランスをコントロールし、領域による組織構造の違いがうみ出されるのかもしれない。現在、この成果については論文投稿中である。

(6)脳の区画の仕切りである境界細胞の役割と境界細胞決定機構を明らかにするために境界細胞の形成に関わっている Hes1 を局所に導入する方法を確立した。今後、Hes1 を局所に発現させた胚において、境界細胞様の細胞群ができてきているのか、できていたときには細胞の動きや形態形成にどのような影響があるのか検討していく。同一神経幹細胞由来の細胞群を複数、色で区別できるマウスを用いた実験については、共同研究先の都

合により、マウスを用いた解析にまでは至らなかったが、解析準備は期間中に達成した。



図：幼若ニューロンが接着帯を保持している時



図：幼若ニューロンが接着帯を失った時

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 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

1: Jun Hatakeyama, Kenji Shimamura The adherens junction serve as a switch for neurogenesis by facilitating Notch-Delta interaction in the vertebrate CNS、第 44 回日本発生生物学会大会、2011 年 5 月 19-21 日、沖縄コンベンションセンター、沖縄県宜野湾市 口頭&ポスター発表

2: Jun Hatakeyama, Kenji Shimamura, “The adherens junction serves as a switch for neurogenesis via Notch signaling”, Notch and Stem Cells, October 3-6, 2010, ionic centre, Athens, Greece. ポスター発表

3: Jun Hatakeyama, Kenji Shimamura, The adherens junction serves as a switch for neurogenesis 第 43 回日本発生生物学会 2010 年 6 月 20 日~23 日 京都国際会館 京都市 口頭発表&ポスター発表

4: 畠山 淳 神経分化における接着帯の役割 第 6 回宮崎サイエンスキャンプ 2010 年 2 月 26 日-28 日 ワールドコンベンションセンターサミット 宮崎市 ポスター発表

5: Jun Hatakeyama, Kenji shimamura, Role of the adherens junction in neurogenesis. 16<sup>th</sup> International Society of Developmental Biologists Congress 2009 6-10 September 2009, Edinburgh International Conference Centre, Edinburgh, UK ポスター発表

6: Jun Hatakeyama, Kenji Shimamura,  
Novel boundary cells in the developing  
central nervous system. 第 42 回日本発生  
生物学会 2009 年 5 月 28-31 日  
朱鷺メッセ 新潟市 ポスター発表

7: Jun Hatakeyama A novel boundary in  
the developing central nervous system.  
第 3 回神経発生討論会 2009 年 3 月 12 日、  
13 日 岡崎コンファレンスセンター 岡崎  
市愛知県 ポスター発表

[図書] (計 2 件)

1: Hatakeyama J. and Shimamura K. Method of  
electroporation for the early chick embryo  
**Electroporation and Sonoporation in  
Developmental Biology** Springer 2009  
P43-54 (分担)

2: Kageyama R, Ohtsuka T., Ohsawa R,  
Hatakeyama J. Helix-loop-helix (bHLH)  
protein: Hes family. **Encyclopedia of  
Neuroscience.** Oxford: Academic Press.  
2009 Vol. 4, pp.1057-1065 (分担)

[その他]

ホームページ

<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/morphogenesis/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島山 淳 (HATAKEYAMA JUN)  
熊本大学・発生医学研究所・助教  
研究者番号：90404350

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし