

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：34310  
 研究種目： 基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22570209  
 研究課題名（和文） 大脳皮質発生過程におけるソニックヘッジホッグ発現細胞の機能解析  
 研究課題名（英文） Analyses of the role of Shh-expressing cells during mammalian cortical development  
 研究代表者  
 元山 純 (MOTOYAMA JUN)  
 同志社大学・脳科学研究科・教授  
 研究者番号：70321825

研究成果の概要（和文）：本研究では、大脳皮質発生過程において分泌タンパク質であるソニックヘッジホッグ(Shh)を分泌する細胞の機能解明を目的とした。Shh-CreERT2マウスを用いて、胎生後期の脳皮質でのShh発現細胞の同定を試みた。Shh-CreERT2マウスとZEG double reporterマウスと交配させ、E13-14にタモキシフェンを経口投与し発生過程での大脳皮質中のGFPの発現細胞を観察した結果、Shhを発現している細胞はINTERMEDIATE ZONEにある細胞である事がわかった。これらのShh発現細胞が、神経幹細胞の発生に関与するかどうかを調べるため、Shhを発現する細胞中でのみジフテリア毒素(DTA)を発現させ、Shh発現細胞の数を減少させた。その結果として神経幹細胞の分化が抑制された。以上の結果からShh発現細胞は胎生後期の脳皮質の発生過程において神経幹細胞の分化を誘導していることが分かった。

研究成果の概要（英文）：The objective is to identify the role of Sonic hedgehog (Shh) during mammalian cortical development. We identified the source of Shh protein during cortical development using EGFP expression under Shh-creERT2/beta-geo-EGFP (ZEG) system under the administration of tamoxifen at both E13.5 and E14.5. Shh expressing cells were limited population of post-mitotic cortical neuronal cells in the intermediate zone. To identify the role of these cells, we induced apoptosis in the Shh expressing cells by using mice with Shh-creERT2/loxP-STOP-loxP-DTA background. By the ablation of the Shh-expressing cells, we detected significant reduction of the differentiation from neural stem cells, indicating that the Shh-expressing cells in the intermediate zone is required for the differentiation of neural stem cells into the mitotic progenitors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500千円	750千円	3,250千円
2011年度	900千円	270千円	1,170千円
2012年度	500千円	150千円	650千円
年度			
年度			
総計	3,900千円	1,170千円	5,070千円

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生物学・発生生物学

キーワード：遺伝学・神経科学・脳神経・発生分化・シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景：

細胞間相互作用は中枢神経系発生において重要である。脊髄の発生において、脊索中胚葉から分泌蛋白質ソニックヘッジホッグを介した神経板／管への作用が、底板(floor plate)細胞を誘導し、多様な腹側神経細胞の分化を制御している事はよく知られている。その事実は、ソニックヘッジホッグの変異体ではヒトでもマウスでも正中欠損が生じることから明確に証明されている。しかし、ソニックヘッジホッグの変異体では正中欠損になるのみならず、小頭症になることも観察されている。小頭症になることから、腹側のみならず背側の神経上皮である大脳皮質の発生がソニックヘッジホッグ欠損の影響を受けていることが考えられる。しかし、具体的にソニックヘッジホッグがどのように大脳皮質の発生に関与しているのかは未だ明確ではない。

本研究では、胎生後期の大脳皮質発生過程においてソニックヘッジホッグを分泌して神経幹細胞の発生に関与し皮質の組織形成を調節する細胞の同定とその機能解明を目的とする。

### 2. 研究の目的：

(1) Shh 発現細胞が、どのような細胞として大脳皮質内に定着しているのか？(細胞系譜実験)

(2) 脊索前板細胞の発現する Shh タンパク質は、神経幹細胞の維持・分化制御において、如何なる意義があるのか？(神経幹細胞との相互作用)

### 3. 研究の方法：

【研究計画1】 Shh 発現細胞の細胞系譜を記載する

当初は脊索前板細胞の大脳皮質への到達について移動経路と定着位置を明らかにする可能性の検討を行った。蛍光色素 DiI で胎齢 7.5 日のラット胚の脊索前板を標識した。胎齢 7.5 日の脊索前板の表面積は幅約 50  $\mu$  m X 縦約 200  $\mu$  m であり、標識サイズは直径 50  $\mu$  m とする。標識を行った胚は全胚培養器で 60-72 時間 *in vitro* で培養し、脊索前板由来細胞の大脳皮質への移動並びに分布を観察記録した。

次に神経幹細胞から生じた分化した神経細胞が Shh 発現細胞となる可能性について検討した。Shh 発現細胞を確認するために Shh-CreERT2-ノックインマウスと Z/EG double reporter マウスをもちいて、皮質発生過程での Shh 発現細胞の分布を記載した。

【研究計画2】 遺伝的に Shh 発現細胞の除去をおこなう

大脳皮質に到達する脊索前板細胞のみを

選択的に除去する実験を行う。脊索前板細胞は胎齢 7.75 日から間充織化して移動し始め、胎齢 8.5 日には間脳腹側の神経板の細胞に対し Shh の作用を及ぼしている。大脳皮質の表面に脊索前板細胞が到達する時期がおおよそ胎齢 9.5-10.5 日目以降であるので、胎齢 9.5 から 10.5 日の間に脊索前板細胞に細胞死を誘導すれば、選択的に大脳皮質に移動する脊索前板由来細胞を除去できる。

組織全体に発現するよう CAG プロモーター支配下に loxP-STOP-LoxP-DTA 遺伝子を挿入したトランスジェニックマウスと Shh-CreERT2-ノックインマウスを交配し生まれたマウスを妊娠させ妊娠後胎齢 8.5 から 9.5 日の間にタモキシフェンを投与する。タモキシフェン投与後に Shh 遺伝子発現細胞で STOP カセットが除かれ、その後生まれた細胞はジフテリア毒素(DTA)を発現し、細胞死を起こす。

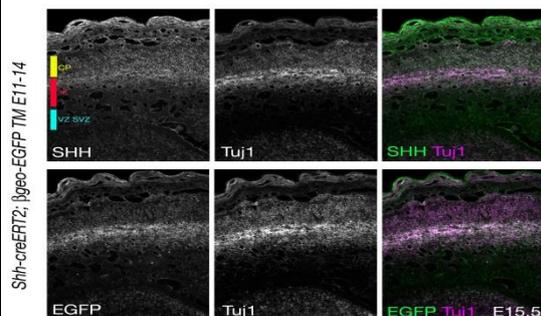
更に胎生後期の Shh 発現細胞を特異的に除去するため、上記で使用した組織全体に発現するよう CAG プロモーター支配下に loxP-STOP-LoxP-DTA 遺伝子を挿入したトランスジェニックマウスと Shh-CreERT2-ノックインマウスを交配し生まれたマウスを妊娠させ妊娠後胎齢 13 から 16 日の間にタモキシフェンを投与し。その効果を解析する。

### 4. 研究成果

【研究計画1】 Shh 発現細胞の細胞系譜を記載する

蛍光色素 DiI で胎齢 7.5 日のラット胚の脊索前板を標識し、脊索前板細胞の大脳皮質への到達について移動経路と定着位置を明らかにした。その結果、脊索前板由来細胞は、そのほとんどが終脳正中部に集中していた。

一部の細胞は皮質を取り囲む細胞中に存在することが解った。しかしこれら細胞は皮質内へ侵入することは無かった。このことから、皮質内で神経幹細胞の発生制御を担う Shh 発現細胞の対象として脊索前板由来の細胞が機能する可能性は低くなった。



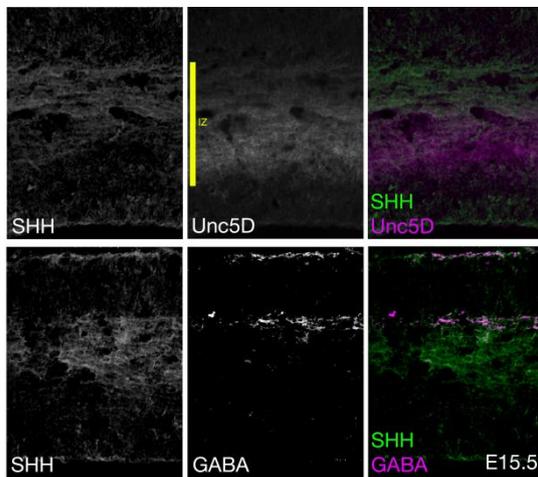
【図1】

一方、shh 発現細胞を確認するために Shh-CreERT2-ノックインマウスと Z/EG

double reporter マウスをもちいて、皮質発生過程での Shh 発現細胞の分布を観察した。

その結果を上図 1 に示す。Shh を発現している細胞は免疫染色 (SHH) と遺伝的標識 (EGFP) の結果 INTERMEDIATE ZONE に存在する事がわかった。これらの Shh 発現細胞は、分化した神経細胞のマーカである Tuj1 を発現していた。更に intermediate zone のマーカである unc5D の分布と比較したところ、Shh 発現細胞は intermediate zone の外層にある後期 multi polar cell である可能性が示唆された (図 2)。

また抑制性神経細胞のマーカである GABA を発現する細胞も一部 Shh 発現細胞集団に含まれていた。以上のことから、Shh 発現細胞は抑制性と興奮性両方の神経細胞を含む分化決定後の神経細胞であることが示唆された (図 2)。



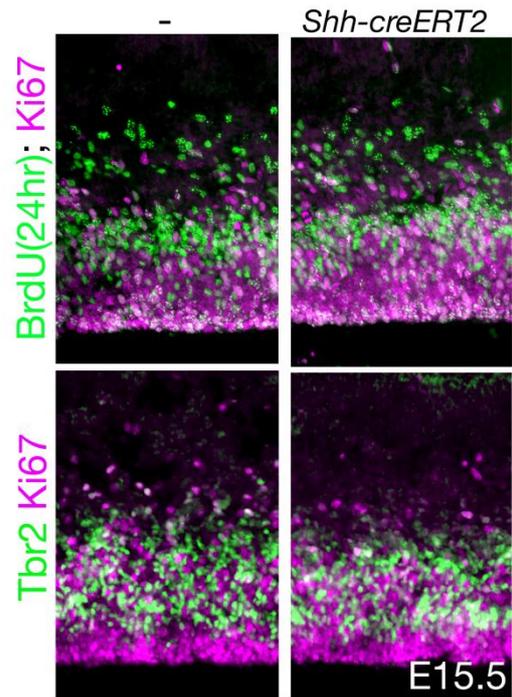
【図 2】

【研究計画 2】遺伝的に Shh 発現細胞の除去をおこなう

上記の結果を基に、intermediate zone に存在する Shh 発現細胞の除去実験を実施した。研究計画 1 で使用した Shh-CreERT2-ノックインマウスをもちいてタモキシフェンを投与した時期について Shh 発現細胞のみに遺伝的にジフテリア毒素の発現を誘導し細胞死を誘導した。まず胎齢 13、14 日にタモキシフェンを投与し、その影響を解析した。その結果、細胞分裂活性を持つ細胞を示す Ki67(+)細胞と BrdU(+)細胞の数には大きな変化は確認できなかったが、神経幹細胞から生じる神経前駆細胞 (Tbr2(+)細胞) の数はやや減少している傾向が観察された (図 3)。

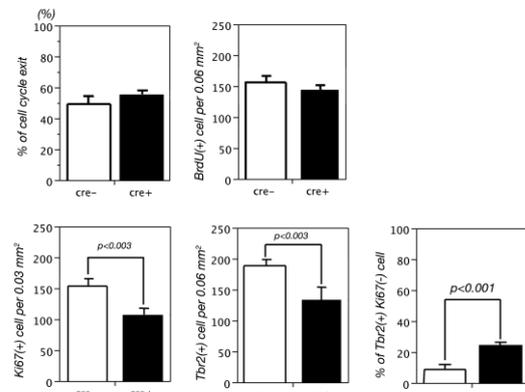
その効果を確認するためにタモキシフェンの投与期間を胎齢 13 日目からの 2 日から 4 日間に延長し効果を解析した。その結果、Tbr2(+)細胞は更に顕著に減少し、かつ分裂

ROSA26-eGFP-DTA; TM E13-14



【図 3】

活性をもつ Tbr2(+)細胞が減少した。更に分裂細胞である Ki67(+)細胞の数が減少した (図 4)。



【図 4】

以上の結果から、intermediate zone にある Shh 発現細胞を減少させることによって、幹細胞が存在する VZ の上層にある SVZ に位置する細胞分裂活性を持つ神経前駆細胞の量が減少していることがわかった。更に、それら神経前駆細胞の細胞分裂活性が顕著に低下していることも確認した。

これらの結果から、intermediate zone にある Shh 発現細胞からの作用により、神経幹細胞から分裂活性のある神経前駆細胞へと細胞分化が促されることが示唆された。

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 1 件)

1. 元山 純, マウス胎生後期の脳皮質内での神経発生におけるソニックヘッジホッグ発現細胞の遺伝的検出及び除去, 第46回日本発生生物学会 (松江) 2013. 5. 19

6. 研究組織

(1) 研究代表者

元山 純 (MOTOYAMA JUN)  
同志社大学・脳科学研究科・教授  
研究者番号 : 70321825

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :