

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24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700361

研究課題名（和文） 神経幹細胞が自己増殖から神経産生モードへ遷移する機構の解明

研究課題名（英文） Screening for genes involved in temporal and spatial regulation of mammalian neocortical neural progenitors

研究代表者

今野 大治郎 (KONNO DAIJIRO)

独立行政法人理化学研究所・非対称細胞分裂研究グループ・研究員

研究者番号：00362715

研究成果の概要（和文）：

本研究では、増殖期および分化期の神経幹細胞において異なった発現パターンを示す転写因子群の機能解析を足掛かりとして、神経幹細胞の性質変化に関与する分子の検索と機能解析を行った。その結果、新規核内因子である *Dmrt3* および *Dmrta2* が、胎生期マウス大脳領域に時期・空間特異的に発現することを明らかにした。さらにコンディショナルノックアウトマウスの作製等を含む発生工学的手法を用いた解析から、これらの因子が大脳皮質神経幹細胞の維持に重要な役割を担っている事を見いだした。

研究成果の概要（英文）：

Here we aimed to identify the genes that are involved in the temporal and spatial regulation of neocortical progenitors by comparing the gene expression profiles of the cells at four different developmental stages of mouse embryos (E10.5, E12.5, E15.5, and E18.5). We found that *DmrtA* family genes, encoding putative transcription factors, were predominantly expressed in early stages of neuroepithelial cells. We also found that *Dmrt3* and *Dmrta2* mutants exhibited the abnormal development of the telencephalon. These data thus suggest that *Dmrt* family genes are involved in the regulation of the spatiotemporal diversity of the process of neuroepithelial cell differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：神経幹細胞, 大脳新皮質

1. 研究開始当初の背景

生物の発生過程において、幹細胞が対称分裂によりその数を飛躍的に増加させる増殖期から、非対称細胞分裂により幹細胞を維持しつつ分化した細胞を生み出す分化期へと遷移する現象は、秩序だった組織構築に欠かすことの出来ない重要な役割を担っている。哺乳類中枢神経系の発生過程においても、神経幹細胞の増殖期から分化期への移り変わりの時期は厳密に制御されており、その異常は神経発生に重篤な影響を与える。非常に興味深いことに、これら神経幹細胞が増殖期から分化期へ移り変わる時期及び移り変わりの頻度は、各組織間および生物種間で大きく異なることが知られており、ヒトを含む高等哺乳類の脳領域では齧歯類に比べてその増殖期が非常に長いことが組織学的解析から示唆されてきた。つまりこの性質変化を制御するメカニズムは、神経細胞の産生という脳の形態形成過程における重要なプロセスを制御しているだけでなく、脳の進化プロセスにおいても非常に重要な役割を担ってきたと考えられているが (Caviness et al., 1995., Rakic, et al., 1995)、その分子実態は発生初期の胚を扱う技術的な困難さもあり未だほとんど明らかになっていっていない。

2. 研究の目的

本研究では、マウス大脳新皮質に存在する神経幹細胞を研究対象として、神経幹細胞における増殖・分化遷移メカニズムを、以下に示す密接に関連する2つの課題に答えることによりその全貌を明らかにすることを目指した(課題 I 及び II)。さらにこれら遷移メカニズムの解明は単なる基礎科学的知見の蓄積にとどまらず、ES細胞やiPS細胞などから誘導された培養神経幹細胞の自在な分化制御といった、現在では非常に困難であるが再生医療の発展に欠かすことのできない基盤技術の礎となることが大きく期待される。して、これら遷移メカニズムを制御

する分子メカニズムを上記胚性幹細胞から誘導した培養神経幹細胞に応用し、増殖・分化遷移の完全なコントロールを試みた(課題 III)。

- (I) 発生時期の異なるマウス大脳から単離した神経幹細胞の遺伝子発現プロファイリングにより、時期特異的に発現する遺伝子群の単離する
- (II) 発生工学的手法により増殖分化遷移メカニズム制御候補分子の解析する
- (III) ES細胞及びiPS細胞を用いて増殖・分化遷移メカニズム制御候補分子の解析する

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するための最も重要な点の一つは、未分化な神経幹細胞間での遺伝子発現プロファイリングである。そこで、発生時期の異なる脳組織から未分化な神経幹細胞を単離するため、Hes1遺伝子のプロモーター制御下でd2EGFP(分解促進型EGFP)を発現するトランスジェニックマウス(京都大学、影山龍一郎先生より供与)(Ohtsuka et al, 2005, Mol cell Neurosci.)とFACSの組み合わせを用いる。この方法により、マウス胎生10日(増殖期)、12日(分化期前半)、15日(分化期後半)、18日(最終分化期)という4段階の異なる発生ステージより未分化神経幹細胞を採取し、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリングにより、発生ステージの違いにより発現パターンの異なる遺伝子群を単離した。単離した遺伝子群は、*in situ* hybridization法によりその時間・空間的発現パターンを解析することによりさらなる候補遺伝子の絞り込みを行った。

上記手法により単離された各種遺伝子の機能を明らかにするため、それら遺伝子の強制発現およびRNAiを、エレクトロポレーション法及びトランスジェニックマウスの作製により大脳神経幹細胞に時期・空間特異的に発現させること

により、これら分子群の神経幹細胞における増殖・分化遷移メカニズムにおける役割を、免疫組織化学等の組織学的手法により解析した。さらに、それら遺伝子のノックアウトマウスを作製し、大脳皮質形成における役割を詳細に検討した。

4. 研究成果

発生時期の異なる *Hes1* リポーターマウス胎児脳組織から、セルソーターを用いて神経前駆細胞を分取し、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現の網羅的解析および *In situ* ハイブリダイゼーション法を用いた脳組織における遺伝子発現部位の解析を行い、神経前駆細胞において時間・空間的に発現が変動する遺伝子群を検索した。その結果、機能未知の核内因子をコードする *Dmrt3* および *DmrtA2* が、大脳新皮質神経前駆細胞特異的に発現し、しかも未分化性の高い前駆細胞により高発現していることを見いだした。*Dmrt3* および *DmrtA2* は共に、性決定に重要な因子であるショウジョウバエ *double sex* および線虫 *mab-3* の哺乳類相同遺伝子群である *Dmrt* ファミリーに属しており、それらの翻訳産物はDMドメインと呼ばれるDNA結合能力を持つZinc fingerドメインを有しているが、その神経発生における役割は明らかでない。そこでsiRNAを用いたノックダウン法とエレクトロポレーション法の組み合わせにより、*In vivo* における *Dmrt3* 及び *DmrtA2* の機能阻害が神経前駆細胞に及ぼす影響を解析した。その結果、対照群ではエレクトロポレーションされた細胞の6割強が未分化神経前駆細胞のマーカーであるSox2を発現する細胞として維持されていたが、*Dmrt3* 及び *DmrtA2* の siRNA を導入した細胞におけるSox2陽性細胞の割合は2割程度であり、残りの大部分は神経細胞へと分化していたことが明らかとなった。これらの結果から、*Dmrt3* 及び *DmrtA2* が大脳新皮質神経前駆細胞における未分化維持機構に重要な役割を担っている事が明らかとなった。さらに、*Dmrt3* 及び *DmrtA2* の脳形成における機能をより詳細に明らかにする

ため、各遺伝子におけるノックアウトマウスを作製した。*Dmrt3* 及び *DmrtA2* の各ノックアウトマウスは、発生過程における顕著な外見上の異常は認められなかったが、大脳新皮質領域におけるサイズの減少が認められ、特に *DmrtA2* ノックアウトマウスでは減少の割合がより顕著であった。*Dmrt3* および *DmrtA2* は、胎生期大脳領域の神経幹細胞において強い発現が認められることから、神経幹細胞における何らかの異常が、ノックアウトマウスにおける大脳領域の縮小における原因であることが示唆された。そこで、これらの因子の神経幹細胞における増殖制御への関与を検証するため、胎生12日における *DmrtA2* ノックアウトマウス胚脳切片を用いて、リン酸化ヒストン抗体による免疫組織染色およびEdUパルスラベリングにより、*DmrtA2* 遺伝子欠損が細胞周期へ及ぼす影響を観察した。その結果、*DmrtA2* ノックアウトマウスでは、神経幹細胞におけるS期およびM期細胞の数が顕著に減少していた。これらの結果から、*DmrtA* ファミリー遺伝子は発生時期特異的な神経幹細胞の増殖制御を介して、大脳新皮質形成に重要な役割を担っている事が明らかとなった。

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 1件)

①Shitamukai A., Konno D. and Matsuzaki F. “Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer-subventricular zone progenitors. “*J Neurosci.* 2011 Mar 9;31(10):3683-95.. 査読有

[学会発表] (計 2件)

①今野大治郎, Screening for genes involved in temporal and spatial specific regulation of mammalian neocortical neural progenitors., 第34回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県), (Dec 20th, 2011)

②Daijiro Konno, Screening for genes invol

ved in temporal and spatial specific regulation of mammalian neocortical neural progenitors., Cortical Development Conference 2011, Chania, Crete, Greece., (May 20th, 2011)

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今野 大治郎 (KONNO DAIJIRO)

独立行政法人理化学研究所・非対称細胞分裂研究グループ・研究員

研究者番号：00362715