

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号： 22701
研究種目： 若手研究（B）
研究期間： 2011～2012
課題番号： 23790342
研究課題名（和文） 神経幹細胞の分裂モード制御における細胞極性制御因子の機能解析
研究課題名（英文） The regulatory roles of PAR-aPKC complex in the division patterns of neural stem cells
研究代表者 廣瀬 智威 (HIROSE TOMONORI) 横浜市立大学・医学部・助教 研究者番号： 20381668

研究成果の概要（和文）：

哺乳類の脳形成過程において、神経幹細胞の自己複製分裂（幹細胞増幅期）から神経産生分裂（神経産生期）への分裂モード遷移は最終的な神経細胞数を規定するために重要である。しかし、この分裂モード遷移の制御機構は十分に解明されていなかった。無脊椎動物においては、分裂した細胞の運命決定（自己複製、または分化）が細胞極性制御因子によって制御されている例が報告されてきた。申請者は、哺乳類の神経幹細胞の分裂モード遷移における分子機構を明らかにするため、マウス神経幹細胞を用いて細胞極性制御因子の機能を解析した。この解析により、PAR3 がマウス神経幹細胞の分裂モード遷移において転写調節因子などを介して重要な役割を果たす可能性を示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：

During mammalian cerebral development, neural precursor cells (NPCs) first expand their population and next generate neurons. However, the molecular mechanisms regulating this transition of NPC division modes have not been clarified yet. To elucidate the molecular mechanisms regulating this transition, I analyzed the roles of PAR3, the evolutionarily conserved polarity protein, in mouse NPCs at E10.5. I found that PAR3-deficient NPCs were significantly biased to self-renewal divisions and altered expression of several transcription factors. These observations suggest that PAR3 is involved in the regulation of the transition of NPC division modes in mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

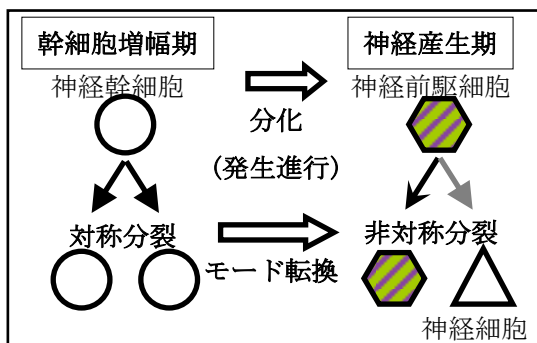
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：神経幹細胞、発生・分化、細胞極性

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の脳形成過程において、神経幹細胞はまず対称分裂を反復して自己増幅（幹細胞増幅期、マウス胎生 10 日まで；図、左）を行なった後、一段分化した神経前駆細胞となって非対称分裂により自己複製と神経産生を進める（神経産生期、マウス胎生 11 日以降；図、右）。この機構により幹細胞増幅期に神経幹細胞の総数が決定されるので、幹細胞増幅期から神経産生期への分裂モード遷移は最終的な神経細胞数を規定する重要なポイントの一つである。しかし、この分裂モード遷移の制御機構は十分に解明されていなかった。



無脊椎動物では、PAR3 を始め不均等分裂制御因子の同定が進んでおり、それらのホモログの機能は脊椎動物でも注目されてきた。これまでの報告から、マウス神経前駆細胞の非対称分裂においては PAR3 が重要な役割を果たすことが示されてきた。一方、幹細胞増幅期や神経産生期への分裂モード遷移での PAR3 の役割は未解明のままであった。

2. 研究の目的

申請者は、PAR3 欠損マウスの解析を進める過程で、脳の神経幹細胞増幅期において神経幹細胞・前駆細胞の異常増幅を見出した。この結果は、幹細胞増幅期から神経産生期への分裂モード遷移においても PAR3 が重要な機能を果たすことを示唆するものであり、本研究計画ではこの可能性の追求を目的

に設定した。

3. 研究の方法

(1) ペア・セル解析（細胞培養実験）

神経幹細胞の分裂モードを解析するため、マウス胎生10.5日の終脳から低密度初代培養を行い、神経幹細胞分裂後に娘細胞ペアの運命をマーカー染色（Sox2=神経幹細胞； β III tubulin=神経細胞）によって判定する解析方法を用いた。PAR3 に依存した神経幹細胞の分裂モード制御を明らかにするため、申請者が独自に樹立した終脳特異的PAR3 欠損マウス（*Foxg1Cre-Par3* cKO）を用いたペア・セル解析を行った。

(2) マウス脳における神経産生パターン解析

- ① *Foxg1Cre-Par3* cKO胚における神経幹細胞の分裂モードを更に詳細に解析するため、BrdU パルスラベルした神経幹細胞の8時間後（細胞周期一回分）の状態を各種マーカーによって判定・解析した。
- ② 神経幹細胞の分裂モード遷移が起きる時期の分子機構を解析するため、胎生10.5日の *Foxg1Cre-Par3* cKO胚の終脳をサンプルとし、コントロールサンプルと共にウエスタン・ブロット法やRT-qPCR法によって神経幹細胞マーカー（Nestin、Sox2、cyclin D2等）、各種中間前駆細胞マーカー（Mash1、Ngn2、Tbr2等）、各種神経細胞マーカー（Reelin、 β III tubulin等）の発現量を定量的に比較検討した。また、免疫組織化学法によってこれらの発現分布も解析した。

4. 研究成果

(1) ペア・セル解析（細胞培養実験）

コントロールの神経幹細胞に対し、PAR3 を欠損した神経幹細胞では、神経幹細胞同士のペアや片方が神経幹細胞のペアの割合が優位に高く、自己複製型の分裂が多いことを明らかにした。この結果は、幹細胞増幅期か

ら神経産生期への分裂モード遷移に PAR3 が重要な役割を果たすことを示唆している。

(2) マウス大脳における神経産生パターン解析

- ① 胎生 10.5 日のコントロール胚に対し、PAR3 欠損胚の終脳神経幹細胞では、一回の分裂から神経細胞が産生される割合が優位に低下しており、神経分化率が低下していることを明らかにした。この結果は、ペア・セル解析の結果と矛盾が無く、生体内でも幹細胞増幅期から神経産生期への分裂モード遷移に PAR3 が重要な役割を果たすことを強く示唆している。
- ② PAR3 欠損胚の終脳神経幹細胞を用いて神経幹細胞の分裂モード遷移に関わる分子機構の探索を進めたところ、神経幹前駆細胞の運命決定において重要であることが示されている幾つかの転写調節因子や増殖・分化関連分子において発現量や発現分布の異常を確認できた。これは、PAR3 が神経幹細胞の分裂モード遷移において転写調節因子などを介して重要な役割を果たす可能性を示唆している。

以上の結果は、これまで未知の点が多く残されていた哺乳類の大脳形成の初期過程で重要な神経幹細胞の分裂モード遷移の制御機構の一端を明らかにしただけでなく、細胞運命調節因子と細胞増殖制御機構との具体的な機能的相互作用を示唆する結果と考えられる。

参考文献：

- Götz and Huttner (2005), *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**:777-788.
- Miyata et al. (2010), *Curr Opin Neurobiol*, **20**:22-28.
- Knoblich (2008), *Cell*, **132**:583-97.
- Costa et al. (2008), *Development*, **135**:11-22.
- Bultje et al. (2009), *Neuron*, **63**:189-202.

- Shen et al. (2002), *Development*, **129**:4843-4853.

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 4 件)

- (1) Nakayama, M., Nakayama, A., van Lessen, M., Yamamoto, H., Hoffmann, S., Drexler, H.C., Itoh, N., Hirose, T., Breier, G., Vestweber, D., Cooper, J.A., Ohno, S., Kaibuchi, K. & Adams, R.H. Spatial regulation of VEGF receptor endocytosis in angiogenesis. *Nat Cell Biol* **15**, 249-60 (2013).

DOI: 10.1038/ncb2679. 査読あり

- (2) Iden, S., van Riel, W.E., Schafer, R., Song, J.Y., Hirose, T., Ohno, S. & Collard, J.G. Tumor type-dependent function of the par3 polarity protein in skin tumorigenesis. *Cancer Cell* **22**, 389-403 (2012).

DOI: 10.1016/j.ccr.2012.08.004. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 廣瀬智威、杉谷善信、日下智保、野田哲生、大野茂男：神経幹前駆細胞の運命決定に対する PAR3 の機能解析、「包括型脳科学研究推進支援ネットワーク」第 3 回夏のワークショップ 2012.7.26、仙台国際センター (宮城県)

- (2) Hirose T, Sugitani Y, Kusaka C, Noda T and Ohno S: PAR3 Is Required For Restricting Symmetric Proliferative Divisions In Mouse Neural Precursor Cells. 新学術領域研究「神経細胞の多様性と大脳新皮質の構築」第 1 回国際シンポジウム

2012. 3. 12、岡崎カンファレンスセンター（愛知県）

(3) 廣瀬智威、杉谷善信、日下智保、野田哲生、大野茂男：PAR3 is required for restricting symmetric proliferative divisions in mouse neural precursor cells. 第34回日本分子生物学会年会、2011. 12. 13、一般講演、パシフィコ横浜（神奈川県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 智威 (HIROSE TOMONORI)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：20381668

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：