

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500394

研究課題名(和文) 大脳皮質神経細胞の運命決定機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of neuronal fate determination in the cerebral cortex

## 研究代表者

花嶋 かりな (Hanashima, Carina)

独立行政法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・チームリーダー

研究者番号：80469915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：知覚や随意運動などの高次の機能を担う大脳の新皮質は、発生の過程で神経幹細胞が経時的に異なるニューロンを生み出すことで6層の構造を形成する。本研究では大脳皮質の形成原理を理解するために、神経幹細胞からニューロンへの分化の過程で作動する遺伝子プログラムに焦点をあて、層特異的なニューロンの分化機構について解析を行った。まずマウスの大脳皮質において各層の神経前駆細胞に発現する遺伝子群を網羅的に同定し、これら遺伝子のニューロンの分化における機能について検証した。一連の解析により、大脳皮質の神経回路形成における層特異的遺伝子プログラムを介した樹状突起のパターニングおよび配置決定機構について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The neocortex is comprised of diverse neurons that are organized into six layers and is the processing center for complex behaviors such as perceptions and voluntary movements. Currently, the mechanisms underlying the specification and assembly of each neuronal component of the neocortex remain largely elusive. To understand the organizing principles of the cerebral cortex, we focused on gene program that operates during neural cell differentiation. We first established a system in which temporal subtypes are labeled in developing mouse neocortex, and performed genome-wide analysis to identify layer-specific expressing genes. We further performed functional analysis, and revealed that these molecules are responsible to establish laminar-specific neuronal distribution and dendrite morphology. These studies demonstrated that neocortical circuit formation requires layer-specific gene program that direct the morphogenesis and assembly of individual neuronal subtype during differentiation.

研究分野：神経発生学

キーワード：大脳皮質 ニューロン 分化 遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

知覚や随意運動などの高度な情報処理を担う大脳の新皮質は、投射標的や形態、発火パターン等が異なるニューロンが秩序だった神経回路網を形成することで、高次機能を発現する。これらのニューロンは、発生の過程で脳室面近くに局在する神経幹細胞が増殖と分化を繰り返しながら、初めに第1層のカハール・レチウス細胞などのプレプレートニューロンが産生され、続いて第5、6層の深層投射ニューロン、第2-4層の上層投射ニューロンが順次生み出される。これら一連の分裂・移動を繰り返すことによって、最終的に特有のインサイド・アウト様式の層形成により大脳新皮質の6層構造がつけられる。この複雑な脳の構築原理を理解するために、これまで大脳皮質ニューロンの分化に関わる複数の転写因子が同定され、これらの機能の解析により、大脳皮質ニューロンの運命決定が遅生まれのニューロンがより早い誕生日の細胞運命を辿らないよう、時期依存的に転写因子 *Foxg1* が抑制していること (Hanashima et al., 2004)、さらに分化した大脳皮質ニューロンにおいて *Fezf2*、*Ctip2*、*Sox5*、*Tbr1*、*Satb2* の転写因子間の相互抑制作用により、各層ニューロンのサブタイプが決定されること (Molyneux et al., 2005、Arlotta et al., 2005、Kwan et al., 2008、Britanova et al., 2008、Han et al., 2011) が明らかになった。これらの知見により、近年大脳皮質ニューロンの分化決定を担う転写制御ネットワークの理解が急速に進展しつつある。一方で、従来の研究においては単一、あるいは多重ノックアウトマウスを用いた遺伝子欠損や強制発現実験による転写因子間の相互作用について詳細が明らかにされたものの、実際にこれらの転写因子の下流で、どのようなプログラムを介して形態や投射パターン等のサブタイプごとのニューロンの特性が決定されるのかについては、制御分子を含め、その機構について不明な点が多く残されていた。

## 2. 研究の目的

このような状況をふまえ、本研究では大脳皮質ニューロンの分化を制御する遺伝子プログラムの全貌とその制御機構を理解するために、大脳皮質ニューロンの分化決定に連動した遺伝子発現のダイナミクスと、これら遺伝子の機能発現による層特異的ニューロンの分化決定機構を明らかにすることを目的としている。これまで大脳皮質の異なる細胞集団に発現する遺伝子を同定する方法として、単一細胞や領域特異的な細胞のサンプリング等の様々なアプローチが試みられてきたが、異なるタイミングで生み出される

各サブタイプのニューロンの分化過程で変動する遺伝子発現を捉えるためには、時間的に変化していく細胞集団をバイアスのない方式で取り扱う必要がある。そこで本研究では (1) 時系列の異なる大脳皮質の細胞を均一に標識する手法を確立し、これを用いて層特異的な神経前駆細胞の単離と発現遺伝子群の網羅的な同定、さらに (2) これらの神経前駆細胞で作動する層特異的な分化プログラムを介したニューロンの分化制御機構、の2つの項目に焦点をあてて解析を行うことで、大脳皮質の異なる層のニューロンの分化過程における分子と細胞の動態を明らかにすることを目的とする。特に、本研究では経時的に変動するプログラムのダイナミクスと多様なニューロンの特性を決定する分化制御機構を分子レベルで解明することで、複雑な大脳皮質の構築原理の全貌を捉え、大脳皮質の形成原理の理解推進を目指すものである。

## 3. 研究の方法

### (1) 大脳皮質の層特異的ニューロンの標識と発現する分子群の同定

大脳皮質の異なるニューロンを標識する手法としては、これまでレーザーマイクロダイセクション等を用いた層や領域特異的な組織の切り出しによるサンプリング、単一細胞レベルでの大脳皮質細胞の分散・分取による遺伝子発現解析、特定ニューロンに発現する遺伝子を指標とした蛍光レポーターマウスによる標識など、様々なアプローチが試みられてきたが、本研究では層特異的ニューロンの前駆細胞で発現する遺伝子群を網羅的に同定するために、再現性が高い細胞集団の標識・操作に向けた遺伝学的手法を確立する。

初めに大脳皮質の神経前駆細胞に普遍的に発現する遺伝子群の中で、分化決定を受けた細胞に一過的に発現が上昇する *bHLH* 遺伝子 *Neurog2* (*Neurogenin2*) を用い、時系列の異なる神経前駆細胞群の抽出を行うために、*Neurog2* の誘導型 *Cre* リコンビナーゼノックインマウス (*Neurog2-CreER* マウス) を用いた細胞標識手法の確立を行う。この *Neurog2-CreER* マウスを異なるレポーターマウス系統に掛け合わせて、目的の発生日にタモキシフェンを投与することにより、時期特異的な *Cre* の活性化による組換えを誘導し、異なる時系列の細胞集団においても均一な神経前駆細胞群を標識できるかについて確認する。次に *Neurog2-CreER* マウスを *Cre* 組換え依存的に蛍光タンパク質を発現するレポーターマウスと交配し、胎生13日目から15日目の各ステージにタモキシフェンを投与することにより、大脳皮質において標識された神経前駆細胞

胞を分散、FACSにて単離し、マイクロアレイ解析によりステージ依存的に発現が変動する遺伝子群を網羅的に同定する。

次に上記の手法において同定された候補遺伝子について *in situ* ハイブリダイゼーション解析により、発生期における時空間的な発現パターンを検証する。また、これまでの我々の転写因子の機能解析により、Foxg1が初期のプレプレートニューロンを抑制し、深層ニューロンへの分化を誘導することが示唆されていることから、並行してFoxg1のノックアウトマウスとコンディショナルノックアウトマウスを用いて、サブタイプ特異的な分化決定におけるこれらの候補遺伝子の発現挙動についても解析を行い、層特異的ニューロンの分化決定を司る分子について絞り込みを行う。

#### (2) 層特異的発現遺伝子のニューロン分化における機能解析

上述したスクリーニングにより得られた候補遺伝子群について、ノックダウン実験を用いた機能欠失や過剰発現実験により、生体内において大脳皮質神経細胞の分化に重要な遺伝子群の機能同定とその作用機序について詳細な解析を進める。具体的に、各層ニューロンの分化特性を規定する樹状突起のパターニングや軸索投射のガイダンス機能に着目し、子宮内電気穿孔法による遺伝子導入を用いた機能解析を行う。またニューロンの配置異常および樹状突起形態形成に関わる遺伝子については脳スライスのイメージングにより生体脳での観察および定量化による評価も行う。最重要候補分子については遺伝学的手法を用いた機能欠失実験により検証を行う。以上の(1)(2)の研究項目により、層特異的な遺伝子プログラムを介したニューロンの分化決定機構を明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究ではマウス大脳皮質を用いて時系列の異なるニューロンの標識と操作を行う手法を確立するために、まず大脳皮質神経前駆細胞に発現する *Neurog2* 遺伝子の下流に誘導型 Cre リコンビナーゼ (CreER) を挿入したノックインマウスを用い、目的の発生日のマウスへのタモキシフェンの投与により、時期特異的レポーター遺伝子の活性化と層ニューロンの標識を行った。初めにタモキシフェン投与後12時間から72時間後の大脳皮質を回収し、Creの組換えによる神経前駆細胞の標識が18時間以降でほとんど変わらないことを見出したため、同様の条件を用いて、大脳皮質の第5層から第2/3層の神経前駆細胞が生み出される胎生13日目から15日目

の大脳皮質においてタモキシフェンによりレポーター遺伝子を活性化後18時間経過した神経前駆細胞を蛍光タンパク質の発現を指標としてFACSにて単離、マイクロアレイ解析を行い、各時系列のサンプルで特異的に発現が高い遺伝子の網羅的同定を行った。また得られた遺伝子群の発現を確認するために、同様のサンプルを用いて定量PCRによる検証を行い、双方にて特異的な発現が確認された遺伝子についてさらなる解析を進めた。

得られた候補遺伝子のうち、大脳皮質の第2/3層または4層のニューロンに発現が高い遺伝子群に着目し、胎生14日から生後7日齢までのマウス胎仔を用いて、*in situ* ハイブリダイゼーションにより時空間的な発現パターンについて解析を行った。これらの中で、発生期を通じてその発現パターンが層特異性を示す複数の遺伝子群を同定することができた。

(2) 上記の手法を用いて同定された遺伝子の中で層特異的な発現を示す分子群について機能解析を進めた。特にこれらの遺伝子の中で樹状突起形態、軸索伸長や配置決定に関わるものが予測される複数の分子に着目し、子宮内電気穿孔法を用いて発生期大脳皮質の神経幹細胞に遺伝子導入を行い、大脳皮質ニューロンの分化における機能について検討を行った。この中で、膜貫通型受容体分子である *Robo1* は上層ニューロンの中で第2/3層に特異的に発現することが確認され、また *Robo1* の shRNA を用いて機能阻害を行ったところ、神経細胞の移動の遅延、ならびに神経細胞の樹状突起形態の変化という表現型が見出された。そこで、胎生15日目と16日目に各々EGFPとDsRed発現コンストラクトを *Robo1* の shRNA、またはコントロール shRNA と共導入したところ、*Robo1* を機能阻害したニューロンでは先に到着したニューロンが最表層にとどまり、後から来たニューロンが追い越せず、コンパクトな第2/3層を形成することが確認された。これらの結果から、大脳皮質ニューロンの位置決定には、層特異的に発現する受容体分子が正しい分配を制御していることが明らかになり、大脳皮質ニューロンの配置が各層に発現する他の分子によっても調節されている可能性が新たに示された。

次に Cre/loxP 組み換えシステムを用い、発生の異なる時期での *Robo1* 遺伝子の発現抑制を試みた。すると、神経細胞分化の早い段階での遺伝子発現抑制では神経細胞の移動遅延が確認された一方で、移動を停止したニューロンにおいて遺伝子の発現を抑制すると、主として樹状突起の形態変化が確認された。このことから、

大脳皮質ニューロンの分化が初期の細胞移動期、さらに移動を停止した後の樹状突起形態形成期という、分化の各段階において、異なる分子との相互作用により制御されている可能性が示された。また大脳皮質の第2/3層ニューロンの分化過程において、錐体細胞の特徴である先端樹状突起の形成が、辺縁帯直下到達後のシグナル伝達により制御されることを見出した。さらに、この分化時期における上層ニューロンの動態について詳細に解析を進めた結果、Robo1が細胞内の細胞小器官の局在を変化させることで、先端樹状突起の初期形成を促進していることが示唆された。一方、大脳皮質上層ニューロンの辺縁帯とのコンタクトを阻害したマウスにおいては先端樹状突起の極性異常が見出されたことから、層特異的な遺伝子発現プログラムを介して樹状突起の数および極性の制御による形態決定機構を用いていることが明らかになった。

これらの一連の研究により、大脳皮質の神経回路形成には、神経前駆細胞において経時的に変動する遺伝子プログラムが多様なニューロンの特性を生み出し、これらのプログラムによって樹状突起形態や配置等の分化決定がなされていることが明らかになった。

#### 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6件)

- 1) Toma, K., Kumamoto, T., Hanashima, C. (2014) The timing of upper-layer neurogenesis is conferred by sequential derepression and negative feedback from deep-layer neurons. *Journal of Neuroscience*. 34, 86, 37-49 (査読有)  
DOI: 10.1016/j.neures.2014.07.002
- 2) 花嶋かりな (2014) 大脳皮質ニューロンの運命決定機構 -時空間制御によるニューロン産生のメカニズム- 「神経幹細胞研究の最前線」医学のあゆみ. 251, 1123- 1128 (査読なし)
- 3) Kumamoto, T., Hanashima, C. (2014) Neuronal subtype specification in establishing mammalian neocortical circuits. *Neuroscience Research*. 86, 37-39 (査読有)  
DOI: 10.1016/j.neures.2014.07.002
- 4) Yeh, M., Gonda, Y., Mommersteeg, M.T., Barber, M., Ypsilanti, A.R., Hanashima, C., Parnavelas, J.G., Andrews, W.D. (2014) Robo1 modulates proliferation and neurogenesis in the developing neocortex. *Journal of Neuroscience*. 34, 5717-5731 (査読有)  
DOI:10.1523/JNEUROSCI.2334-14.2014.
- 5) Kumamoto, T., Toma, K., Gunadi., McKenna, W.L., Kasukawa, T., Katzman, S., Chen, B., Hanashima, C. (2013) Foxg1 coordinates the switch from nonradially to radially migrating glutamatergic subtypes in the neocortex through spatiotemporal repression. *Cell Reports*. 3, 931- 945 (査読有)  
DOI: 10.1016/j.celrep.2013.02.023
- 6) Gonda, Y., Andrews, W.D., Tabata, H., Namba, T., Parnavelas, J.G., Nakajima, K., Kohsaka, S., \*Hanashima, C., Uchino S. (2013) Robo1 regulates the migration and laminar distribution of upper-layer pyramidal neurons of the cerebral cortex. \*Correspondence. *Cerebral Cortex*. 23, 1495-1508 (査読有) DOI: 10.1093/cercor/bhs141

[学会発表] (計24件)

- 1) Hanashima, C. Temporal Control of Neuronal Identity in the Cerebral Cortex. CDB Symposium 2015 Time in Development 2015年03月23日 理化学研究所(兵庫県神戸市)
- 2) Gonda, Y. & Hanashima, C. Robo1 regulates dendritic development of neocortical pyramidal neurons. CDB Symposium 2015 Time in Development 2015年03月23日~2015年03月25日 理化学研究所(兵庫県神戸市)
- 3) Toma, K., Kumamoto, T. & Hanashima, C. A two-step regulatory mechanism determines the timing of upper-layer neurogenesis in the cerebral cortex. CDB Symposium 2015 Time in Development 2015年03月23日~2015年03月25日 理化学研究所(兵庫県神戸市)
- 4) Kumamoto, T. & Hanashima, C. Molecular logic underlying the origin of the neocortex. CDB Symposium 2015 Time in Development 2015年03月23日~2015年03月25日 理化学研究所(兵庫県神戸市)
- 5) Hanashima, C. Temporal Control of Neuronal Identity in the Cerebral Cortex. China-Japan-Korea Joint Symposium in Developmental Biology. 2014年10月21日 China(Beijing)
- 6) 権田裕子、花嶋かりな Molecular mechanisms for dendritogenesis of neocortical pyramidal neurons (大脳皮質錐体細胞の樹状突起の形態を決定する分子メカニズム) 第37回日本分子生物学年会 2014年11月27日 パシフィック横浜(神奈川県横浜市)
- 7) 権田裕子、花嶋かりな 軸索ガイダンス分子を介した大脳皮質神経細胞の形態形成機構 Neuroscience2014: 第37回日本神経科学大会 2014年09月11日 パシフィック横浜(神奈川県横浜市)

- 8) 當麻憲一、隈元拓馬、花嶋かりな 大脳皮質上層ニューロンの分化決定機構 Neuroscience2014: 第37回日本神経科学大会 2014年09月11日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- 9) 隈元拓馬、花嶋かりな 哺乳類大脳新皮質獲得を可能にした分子メカニズムの解析 Neuroscience2014: 第37回日本神経科学大会 2014年09月11日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- 10) 王天成、當麻憲一、花嶋かりな 大脳皮質発生における神経細胞特異的な RNA 結合蛋白質 Nova1 の同定と解析 Neuroscience2014: 第37回日本神経科学大会2014年09月13日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- 11) Gonda, Y., Andrews, W., Chedotal, A., Parnavelas, G. & Hanashima, C. Laminar-specific control of neuronal distribution and dendritic patterning by axon guidance molecules. Cortical Development 2014年05月23日 Greece (Chania)
- 12) Toma, K., Kumamoto, T. & Hanashima, C. Mechanisms that determine the timing of upper-layer neurogenesis in the cerebral cortex. Cortical Development 2014年05月24日 Greece (Chania)
- 13) Kumamoto, T. & Hanashima, C. Molecular logic underlying the origin of the neocortex. Cortical Development 2014年05月23日 Greece (Chania)
- 14) Carina Hanashima. Neuronal Specification in Establishing Mammalian Neocortical Circuits. Symposium 'Neocortical Development and Circuit Formation' 第36回日本神経科学大会・第53回日本神経化学会大会・第20回日本神経回路学会大会 合同大会 (Neuro2013) 2013年06月21日 国立京都国際会館(京都府京都市)
- 15) 隈元拓馬、花嶋かりな 大脳新皮質構築を担う哺乳類特異的分子機序の解析 Neuro2013: 第36回日本神経科学大会, 第56回日本神経化学会大会, 第23回神経回路学会合同大会 2013年06月22日 国立京都国際会館(京都府京都市)
- 16) Hanashima, C. Neuronal Specification in Establishing Mammalian Neocortical Circuits 2nd International Symposium on "Neocortical Organization" 2013年11月22日 岡崎
- 17) Carina Hanashima. Temporal and Spatial Control of Neuronal Identity in the Brain. (招待講演) 2013年01月10日 MRC Centre for Developmental Neurobiology UK(London)
- 18) Yuko Gonda., William D Andrews., John G Paenavelas., Carina Hanashima. Temporal requirement for Robo1 in the development of neocortical pyramidal neurons. 第35回日本神経科学大会 2012年09月18日 名古屋
- 19) Carina Hanashima. Regulation of Neuronal Subtype Identity Transition in the Cerebral Cortex. Symposium 'Mechanism of multipotency of neural stem/progenitor cells' 第35回日本神経科学大会 2012年09月20日 名古屋
- 20) Yuko Gonda A., Carina Hanashima. conditional gene expression system to study layer-specific dendrite development of neocortical pyramidal neurons 包括脳夏のワークショップ 2012年07月24日~2012年07月27日 仙台
- 21) Carina Hanashima. Non-radially and Radially Migrating Glutamatergic Neurons of the Cerebral Cortex. National Institute of Basic Biology. 2012年07月05日 岡崎カンファレンスセンター(愛知県岡崎市)
- 22) Yuko Gonda The role of Robo1 in the morphological development of cortical upper-layer pyramidal neurons. Joint meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Cell Biology 2012年05月28日~2012年05月31日 神戸
- 23) Carina Hanashima. Molecular Control of Projection Neuron Identity in the Cerebral Cortex. BIT's 3rd Annual World Congress NeuroTalk 2012年05月18日 China (Beijing)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

<http://hanashima-lab.wix.com/main-page>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

花嶋かりな (HANASHIMA, Carina)  
理化学研究所・多細胞システム形成研究  
センター・チームリーダー  
研究者番号：80469915

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし