

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 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：24500395

研究課題名(和文) Dmrtファミリー遺伝子による大脳新皮質神経幹細胞の維持機構の解明

研究課題名(英文) Involvement of Dmrt gene family in the embryonic development of the mammalian neocortex

研究代表者

今野 大治郎(KONNO, Daijiro)

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・研究員

研究者番号：00362715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：発生過程における大脳神経幹細胞の領域・時間依存的な個性の獲得は、神経幹細胞から多種多様なニューロンが生み出される基盤であり、高次脳機能を支える最も基本的かつ重要なメカニズムの一つである。本研究では、胎生期マウス大脳背側部神経幹細胞に特異的に発現する核内因子であるDmrt3およびDmrt2が、胎生期における神経幹細胞の細胞周期制御に重要な因子であることを明らかにした。さらに、これらの因子は協調的に機能し、GABA作動性ニューロンの産生を担う複数の転写制御因子の発現を抑制することで、大脳新皮質領域におけるグルタミン酸作動性ニューロンの産生を保証していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we report that Dmrt3 and Dmrt2, two related mammalian DM domain-containing transcription factors (Dmrt), are critically involved in maintaining the neocortical identity of neural progenitor cells in the developing mouse brain. These factors are highly expressed in neural progenitor cells in the dorsal telencephalon at early stages of cortical development. Dmrt3 and Dmrt2 double mutant brains exhibited a conversion of neural progenitor characteristics in the dorsal telencephalon from a neocortical (glutamatergic neuron-generating) to a subcortical (GABAergic neuron-generating) identity, suggesting that Dmrt3/Dmrt2 negatively regulate the genetic pathway, establishing the ventral cell fate in the telencephalon. Our results suggest a novel mechanism for maintaining neural progenitor characteristics, in which Dmrt3/Dmrt2 blocks ventralization of neural progenitors, thereby ensuring the proper development of neocortical neural progenitors.

研究分野：神経発生学

キーワード：神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

胚発生において幹細胞が増殖期から分化期へ遷移する現象は、組織形成に必要な細胞数を保ちながらも多様な細胞が生み出されなければならない個体発生において、最も基本的かつ重要なプロセスの一つである。哺乳類脳形成においても、神経幹細胞は対称分裂を繰り返しながらその数を劇的に増加させたのち、幹細胞と神経細胞を生み出す非対称分裂を行う細胞へと遷移することが知られている。それに加え、神経幹細胞は胚発生過程において、領域および発生時間特異的な個性を獲得することが知られており、その適切な制御は、神経幹細胞が多様な神経細胞を生み出すための基盤となる。しかしながら、その分子実体は未だ謎に包まれている。

2. 研究の目的

本研究では、申請者がマウス神経幹細胞を用いた遺伝子発現変動の網羅的解析により、大脳形成における重要性が示唆された2つの核内因子である *Dmrt3* および *Dmrta2* の機能解析を通して、神経幹細胞にプログラムされた増殖・分化・個性獲得・維持機構の分子実体を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、*Dmrt3* および *Dmrta2* がどのようなメカニズムで神経幹細胞の維持に関与するかを明らかにすることで、幹細胞の増殖・分化・個性獲得・維持の制御メカニズムの解明を目指した。具体的には以下に示す3つの課題の解明に挑戦した。

Dmrt3 および *Dmrta2* 遺伝子ノックアウトマウスの表現型を組織学的に解析し、“いつ”、“どの領域で”これら因子が機能しているのかを明らかにする。

次世代シーケンサーを用いた遺伝子欠損マウスにおける遺伝子発現プロファイルの解析 (mRNA-seq) と、クロマチン免疫沈降法 (ChIP-assay) の組み合わせによる解析から、*Dmrt3* および *Dmrta2* が制御する核内情報処理機構を明らかにする。

Dmrt3 および *Dmrta2* の機能改変 ES 細胞を用いて、培養神経幹細胞の増殖・分化・個性獲得の人工的制御を試みる。

4. 研究成果

Dmrt3 および *Dmrta2* 遺伝子ノックアウトマウスにおける表現型

我々のこれまでの研究から、*Dmrt3* および *Dmrta2* 遺伝子のノックアウトマウスでは、大脳領域のサイズが顕著に減少することが明らかとなっている。そこで、それらの原因を探る目的で、各種抗体を用いた免疫組織学的解析により、神経幹細胞の分化状態の変化を調べた。それに加え、EdU による細胞周期における DNA 複製期 (S 期) のラベル法により、神経幹細胞の細胞周期進行における影響についても解析した。その結果、*Dmrt3* および *Dmrta2* 遺伝子欠損マウスでは、M 期細胞のマーカーであるリン酸化ヒストンや、EdU でラベルされる S 期細胞の数が有意に減少していた。さらに、細胞分化における影響を検討する目的で、Cell cycle exit rate の計測を行ったが、野生型と遺伝子欠損マウスで顕著な差は認められなかった。これらの結果から、*Dmrt3* および *Dmrta2* は、神経幹細胞の細胞周期進行を促進する機能があることが明らかになった。

神経幹細胞における細胞周期の進行は、神経幹細胞からどのタイプの大脳神経細胞が生み出されるかという、神経幹細胞の“個性”の獲得およびその遷移に関与することが他のグループの研究から示唆されていたため、*Dmrt3* および *Dmrta2* 遺伝子欠損における大脳皮質層形成における影響を検討した。その結果、*Dmrt3* および *Dmrta2* 遺伝子欠損マウスでは、大脳皮質層を形成する各種神経細胞の数が有意に減少していた。しかしながら、その神経細胞数減少の割合は、大脳皮質 II 層から VI 層に至る各層において、大きな違いは認められなかった。以上の結果から、*Dmrt3* および *Dmrta2* 遺伝子欠損マウスにおける神経細胞数の減少は、神経幹細胞における細胞周期進行遅延による神経細胞産生数の減少が主な原因であり、発生の進行に伴う神経細胞の“個性”の遷移は正常に進行していることが示唆された。

これまでの免疫組織化学的解析や *Dmrt3* および *Dmrta2* 遺伝子欠損マウスを用いた解析から、*Dmrt3* および *Dmrta2* が相互補足的に機能していることが考えられたため、これら2つの遺伝子の二重遺伝子欠損マウスにおける表現形の解析を進めた。その結果、驚くべきことに、二重遺伝子欠損マウスの大脳新皮質領域が GABA 作動性神経細胞によって占められるという所見を得た。また、この表現型は、*Dmrt3* もしくは *Dmrta2* 遺伝子の単独欠損マウスでは全く認められなかった。大脳における GABA 作動性神経細胞は大脳内側基底核原基 (medial ganglionic eminence : MGE) ; 外側基底核原基 (lateral ganglionic eminence : LGE) ; 尾側基底核原基 (caudal ganglionic eminence : CGE) と呼ばれる大脳

腹側に位置する領域に存在する神経幹細胞より生み出される。そこで、二重遺伝子欠損マウスの大脳領域における MGE, LGE, CGE の神経幹細胞に特異的に発現する各種マーカー分子の発現を調べたところ、大脳背側においてこれらの分子の発現が異所性に認められた。以上の結果から、*Dmrt3* および *Dmrta2* は、協調的に大脳腹側部を規定する遺伝子の発現を抑制することで大脳皮質を構成するグルタミン作動性神経細胞の産生を保証していることが明らかとなった。

Dmrt3 および *Dmrta2* 遺伝子欠損マウスにおける遺伝子発現プロファイルの解析およびクロマチン免疫沈降法による *Dmrt3/Dmrta2* 結合ゲノム領域の同定

Dmrt3 および *Dmrta2* 遺伝子の二重遺伝子欠損マウスを用いた解析から、これら 2 つの遺伝子が協調的に機能することで、大脳神経幹細胞の増殖および個性獲得・維持が正常に行われることが明らかとなった。そこで、その分子メカニズムの詳細を明らかにするため、胎生 12.5 日齢における野生型および二重遺伝子欠損マウス大脳背側領域の遺伝子発現プロファイルを解析した。実際の解析には、次世代シーケンサーを使用した mRNA の網羅的解析法を用いた(九州大学・大川恭行博士との共同研究)。その結果、*Dmrt3/Dmrta2* 二重遺伝子欠損マウスでは、大脳腹側において神経幹細胞の性質獲得・維持に必須の転写因子群の発現が顕著に増加していた。驚くべきことに、その中の多くは、嗅球 GABA 作動性神経細胞の産生に関与する遺伝子群も含まれていた。嗅球 GABA 作動性神経細胞が大脳腹側における LGE 領域の一部(dorsal LGE)から産生されるという他グループからの報告を合わせてこれらの結果を考察すると、二重遺伝子欠損マウスでは、大脳の背側と腹側の境界領域が崩壊し dorsal LGE 領域が拡大した結果、嗅球 GABA 作動性神経細胞が異所性に大脳皮質領域で産生されていると考えられた。

クロマチン免疫沈降法と次世代シーケンサーを用いた解析(ChIP-seq)を進め、*Dmrt3/Dmrta2* が結合しているマウスゲノム領域の同定を試みた。その結果、上記の遺伝子発現プロファイル解析により遺伝子欠損マウスで顕著に発現が上昇した複数の遺伝子に関して、それらの遺伝子が存在するゲノム領域への *Dmrt3/Dmrta2* の結合が認められた。これらの結果から、*Dmrt3/Dmrta2* は下流遺伝子の発現を抑制することで、細胞の性質を維持していると考えられた。

機能改変 ES 細胞を用いて、培養神経幹細胞の増殖・分化・個性獲得の人工的制御を試み

大脳背側領域の神経前駆細胞に特異的に発現する核内因子である *Dmrt3* および *Dmrta2* の発現量と大脳神経前駆細胞の個性獲得における関連性を検討するため、細胞に可逆的に目的遺伝子を発現させる実験系である Tet-ON システムを導入した。具体的には、*Dmrt3* 遺伝子を発現させるための Tet-ON ベクターを構築し、これらをマウス ES 細胞に導入して安定導入株を単離した。今回用いた Tet-ON システムの Tet activator である rtTA2SM2 の発現は、神経前駆細胞特異的な発現様式を示す Nestin エンハンサーにより制御されるよう構築をデザインした。それにより、樹立した ES 細胞を各種神経分化誘導方により分化させ、かつテトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリンを投与することにより、任意の時期に任意の量の *Dmrt3* 遺伝子を神経前駆細胞で発現させることが可能となった。上記の樹立 ES 細胞を、無血清凝集浮遊培養法(SFEBq)を用いて大脳皮質神経前駆細胞に分化誘導するとともにドキシサイクリンを投与し、*Dmrt3* 遺伝子発現誘導が各種大脳領域マーカー遺伝子の発現に与える影響を解析した。その結果 *Dmrt3* 遺伝子の発現量を段階的に増加させることにより、大脳皮質内側に強く発現する各種遺伝子(*Emx1*, *Emx2*, *Wnt3a*, *Wnt8b*)の発現が有意に上昇した。以上の結果から、神経前駆細胞における *Dmrt3/Dmrta2* の発現量が、大脳皮質形成プログラムにおける領域特異的な細胞運命の獲得に重要であ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4件)

Harada A, Maehara K, Sato Y, Konno D, Tachibana T, Kimura H, Ohkawa Y., Incorporation of histone H3.1 suppresses the lineage potential of skeletal muscle. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan;43(2):775-86. doi: 10.1093/nar/gku1346. (査読有)

Shimozawa T, Yamagata K, Kondo T, Hayashi S, Shitamukai A, Konno D, Matsuzaki F, Takayama J, Onami S, Nakayama H, Kosugi Y, Watanabe TM, Fujita K, Mimori-Kiyosue Y., Improving spinning disk confocal microscopy by preventing pinhole cross-talk for intravital imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Feb 26;110(9):3399-404. doi: 10.1073/pnas.1216696110. (査読有)

Konno D, Iwashita M, Satoh Y, Momiyama A, Abe T, Kiyonari H, Matsuzaki F., The mammalian DM domain transcription factor Dmrt2 is required for early embryonic development of the cerebral cortex. PLoS One. 2012;7(10):e46577. doi: 10.1371/journal.pone.0046577. (査読有)

Harada A, Okada S, Konno D, Odawara J, Yoshimi T, Yoshimura S, Kumamaru H, Saiwai H, Tsubota T, Kurumizaka H, Akashi K, Tachibana T, Imbalzano AN, Ohkawa Y., Chd2 interacts with H3.3 to determine myogenic cell fate. EMBO J. 2012 Jun 29;31(13):2994-3007. doi: 10.1038/emboj.2012.136. (査読有)

〔学会発表〕(計6件)

今野 大治郎: 大脳神経前駆細胞にプログラムされた興奮性ニューロン産生機構 第8回神経発生討論会(九州大学) 福岡県博多市 2015.3.19-20 (poster)

Daijiro Konno: Spatial and temporal regulation of neural stem cell identity in the mammalian cerebral cortex by Dmrt family transcription factors. CDB SYMPOSIUM2015 (CDB) 兵庫県神戸市 2015.3.23-25 (poster)

今野 大治郎: "Dmrt: more than sex" 3rd German-Japanese Bilateral Event on Neural Stem Cells and Mammalian Neurogenesis (ラフォーレ蔵王) 宮城県蔵王 2013.10.13-16 (Oral)

Daijiro Konno: The mammalian DM domain transcription factor Dmrt2 is required for early embryonic development of the cerebral cortex. 2012 年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ(仙台国際センター) 宮城県仙台市 2012.7.24-27 (poster)

Daijiro Konno: Dmrt family transcription factors maintain temporal and regional diversity of neural progenitors during

embryonic development of the cerebral cortex. COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCE (Suzhou Dushu Lake Conference Center) CHINA 2012.12.3-7 (poster)

今野 大治郎: Dmrt family transcription factors maintain temporal and regional diversity of neural progenitors during neocortical development. 第6回神経発生討論会(理研和光キャンパス) 埼玉県和光市 2013.3.14-15 (poster)

〔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://www.cdb.riken.jp/cas/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今野 大治郎 (KONNO, Daijiro)
理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・研究員
研究者番号: 362715

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号：