

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700361

研究課題名(和文) 神経から幹細胞へのフィードバックシグナル機構の解析

研究課題名(英文) The feedback signaling from neurons to neural stem cells

研究代表者

下向 敦範 (Shitamukai, Atsunori)

独立行政法人理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター・専門職研究員

研究者番号：00442971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：脳の発生において機能の異なる神経がどのようにその数を調整しながら産生されるのかそのメカニズムはほとんど分かっていない。本研究では、胎児期に初期の神経で発現する増殖因子FGF18が神経幹細胞を制御することによって、後期に産生される神経の数を制御する事を発見した。FGF18は脳の発生の中期から後期にかけて初期に産生された神経で発現しており、FGF18遺伝子欠損マウスは、後期の産生される神経の特異的な減少が見られた。この事は、初期に産生された神経細胞がFGF18を分泌することにより、つぎに産生される後期の神経の生産量を神経幹細胞の維持を介して制御するというフィードバック制御の可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：The radial glial (RG) cells are multipotent stem cells in the developing brain. During this stage, the different types of neurons are produced sequentially in a stage-dependent manner and the final six-layered structure is formed. The mechanism of the RG cell maintenance has been well studied; however, it is largely unknown how the population of distinct progeny is controlled. We found that a neuronal FGF, FGF18 is important for this process. The FGF18 gene is expressed in the neural layer at the middle stage of neurogenesis, but not at the early stage. The brain of FGF18 KO mice showed a reduction in RG cell numbers at the middle stage of neurogenesis and a specific reduction of late born neuron numbers at the postnatal stage. From these results, we propose a feedback signaling from neurons to radial glia cells, in which the early born neurons control the number of late born neurons that are generated.

研究分野：細胞生物学、脳神経発生学

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経幹細胞 神経 自己複製 神経層形成

1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞は高度に極性化した上皮様の細胞であり、その極性に沿って細長いプロセスとよばれる突起を basal 側 (基底膜側) と apical 側 (頂端側) にのびしている。発生の初期、神経幹細胞は対称分裂し、その数を増やしていく。神経分化が始まると、自己複製しながら、分化した神経細胞を生み出す非対称分裂を行う。このメカニズムは、典型的な極性細胞の非対称分裂であると考えられてきた。すなわち、細胞の極性に対して平行に分裂すると、極性に沿った細胞内の物質は等分配され、対称分裂となり、縦または、斜めに分裂することにより、細胞の極性を分断するように分裂が起こり、極性に沿った細胞内の物質がそれぞれ別々に分配され、異なる運命を持つ細胞が生まれる。神経幹細胞の場合、basal 側受け継いだ細胞は神経、apical 側を受けついで細胞は幹細胞の運命に決定されるモデルが提唱されてきた。しかしながら、発生を通じて、分裂の方向は、ほぼ一定であるなど、異論も多く、モデルが訂正されるなど、長い間混乱が続いている。

ハエと同様にマウスにおいても神経幹細胞の維持には Notch のシグナルが重要であり、分裂後の Notch シグナルの非対称性が存在すると考えられている。ハエと同様に、分裂時に Numb のような Notch の阻害因子が運命決定因子として、非対称に分配にされるというモデルも提唱されているが、ごく一部のグループから報告されているにすぎず、いまだにコンセンサスはとれていない。

このように、分化、未分化を決定するメカニズムは未だに解明されていないが、最近、ライブイメージング解析により、神経幹細胞の性質維持に必須な構造が明らかとなってきている。しかしながら、細胞の構造が運命の決定にどのような役割を果たしているかは、ほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

脳の発生は一層の上皮細胞から多層の神経層からなる複雑な構造を構築する過程を端的に示す例であるといえる。それらは神経幹細胞の分裂パターンと性質の変化によって構築されると考えられており、分化によって生じた神経細胞からのシグナルが後の幹細胞の性質変化に重要な役割を果たすことが知られている。しかしながら、分化細胞から幹細胞への「フィードバックシグナル」の分子メカニズムは、発生学、医学的に重要であるが、ほとんど明らかとなっていない。本研究では、新たに見出した神経細胞由来の増殖因子の解析を通じて、マウス脳発生をモデルとした幹細胞の空間的、時間的な制御のメカニズムに迫りたい。

3. 研究の方法

本研究は FGF18 と神経幹細胞の関係について三段階の解析をおこなう。

1. FGF18 が神経幹細胞における作用点の同定。FGF18 ノックアウトマウスの解析結果は FGF18 シグナルが幹細胞の維持に関与している事を強く示唆している。幹細胞の維持には、二つのメカニズムが必要である。一つは、増殖性の維持。もう一つは神経分化の抑制である。それぞれについて、FGF18 ノックアウトマウスと野生型の比較、FGF18 遺伝子の過剰発現の効果等を調べ、作用点を明らかとする。

FGFシグナリングの下流にはMPAK経路など様々な経路、そして転写因子が活性化されることが知られている。FGF18 の下流の因子を同定するために、リン酸化特異的な抗体による組織染色、またはウエスタンブロットングによって、野生型と FGF18 ノックアウトマウスの比較を行い、主要なメディエーターを同定する。さらには、恒常的活性化状態や RNAi、ドミナントネガティブのコンストラクトを導入する事によって、神経幹細胞に与える影響を調べ、幹細胞維持に関与する経路を同定する。

2. 個体レベルの FGF18 の役割について、脳の形成に関する表現型解析。

コンベンショナルな FGF18 遺伝子のノックアウトマウスは、他のグループにより、すでに作成されており、入手済みである。しかし生後間もなく、致死となるために、生後の脳の形成の解析は不可能だが、胎生期の神経幹細胞の解析は可能である。遺伝子の発現パターンの解析とあわせて、異なる時期・領域など脳全体での幹細胞や神経の産生に異常がないか幅広く解析を行う。

また、生後の脳形成の表現型を観察するために、コンディショナルノックアウトマウスの作成を行う。本マウスの作成においては、本研究所の動物資源開発室との共同研究を行う。作成したコンディショナルノックアウトマウスを用いて、生後の神経層形成、神経発生後のグリア産生など影響が無いのか解析する。また、FGF18 遺伝子は、発生の中期から後期にかけて一過的に発現している。その時期は、ちょうど Deep layer の神経から Upper layer の神経の産生へと、幹細胞の性質が変化する時期であり、FGF18 が単に幹細胞の維持だけでなく、性質変化にも関与している可能性がある。このため、発現のタイミングを早めたり、長めたりすることより、産生される神経の種類に変化が見られるか解析する。

3. FGF18 シグナル伝達における Basal プロセスの役割。

FGF18 は分泌性の増殖因子であり幹細胞への作用は二つの方法が考えられる。

単純拡散により幹細胞の細胞体へ到達し、レセプターに結合して、核にシグナルを伝える。

basal プロセスが積極的に FGF18 を受け取り、細胞内部をシグナル伝達因子が移動す

る。

これら想定した二つの可能性は、排他的ではなく、両者が同時起きている可能性もある。そのため、まずは、FGF18 シグナル経路分子の脳内の分布について徹底的に検証を行う。解析により同定したメディエーター分子に蛍光タンパク質で標識を行い、basal プロセス内での挙動をフォトブリーチング法を用いて、拡散の方向性や、FGF18 ノックアウトマウスでの挙動の変化を調べる。

同様の手法を用いて蛍光ラベルした FGF18 を神経層に異的に発現させたり、吸着したビーズや発現細胞を移植する方法などにより、細胞外での挙動を解析する。

さらに FGF18 シグナルの伝達経路を阻害する事によって、実際に非対称分裂や OVZ 幹細胞の維持に影響が出るかを解析する。特に非対称分裂に関しては、ライブイメージングを用いて分裂前後の変化を調べる。これによって、なぜ basal プロセスを引き継ぐことが、運命の非対称性に結びつくか、運命決定にどの程度の寄与をもっているのかを検証する。

OVZ 幹細胞は、basal プロセスをだけをもつことから、FGF18 シグナルの影響をより受けやすいと考えられる。しかしながら、マウスにおいては OVZ 幹細胞は非常に数が少ない事から解析が困難である、そこで、分裂の方向性がランダムになり OVZ 幹細胞が増大している LGN 遺伝子変異マウスとの二重変異マウスを作製する事により、OVZ 幹細胞への影響を個体レベルで調べる。

4. 研究成果

脳において様々な種類の神経がどのようにそれぞれの数を調整しながら産生されるのかはほとんど分かっていない。本研究では、胎児期に初期の神経で発現する増殖因子 FGF18 が神経幹細胞を制御することによって、後期に産生される神経の数を制御する事を発見した。FGF18 は脳の発生の中期から後期にかけて初期に産生された Deep layer 神経で発現しており、FGF18 遺伝子欠損マウスは、後期の産生される Upper layer 神経の特異的な減少が見られた。この事は、初期に産生された神経細胞が FGF18 を分泌することにより、つぎに産生される後期の神経の生産量を神経幹細胞の維持を介して制御するというフィードバック制御の可能性を示唆している。このような制御は異なる機能を持った神経層の比率を制御していると考えられ、なぜヒト脳で Upper layer が大きく発達しているかのメカニズムの解明に寄与する可能性が考えられる。

一方、遠くはなれた神経層から放出された FGF18 のシグナルを神経幹細胞がどのように受けているのか、FGF18 シグナルの下流の因子については、完全に解明できておらず、今後更なる解析が必要であると考えられる。

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)

Fumiaki Nagashima, Ikuo K Suzuki, Atsunori Shitamukai, Haruko Sakaguchi, Misato Iwashita, Taeko Kobayashi, Shigenobu Tone, Kazunori Toida, Pierre Vanderhaeghen, Yoichi Kosodo, Novel and robust transplantation reveals the acquisition of polarized processes by cortical cells derived from mouse and human pluripotent stem cells., *Stem cells and development*, 2014, in press, 査読有, 10.1089/scd.2013.0251

Gregor-Alexander Pilz, Atsunori Shitamukai, Isabel Reillo, Emilie Pacary, Julia Schwausch, Ronny Stahl, Jovica Ninkovic, Hugo J Snippert, Hans Clevers, Leanne Godinho, Francois Guillemot, Victor Borrell, Fumio Matsuzaki, Magdalena Götz, Amplification of progenitors in the mammalian telencephalon includes a new radial glial cell type., *Nature Communications*, 2013, 4, 査読有, 10.1038/ncomms3125

Masaki Mizunuma, Ryohei Tsubakiyama, Takafumi Ogawa, Atsunori Shitamukai, Yoshifumi Kobayashi, Tomomi Inai, Kazunori Kume, Dai Hirata, Ras/cAMP-dependent Protein Kinase (PKA) Regulates Multiple Aspects of Cellular Events by Phosphorylating the Whi3 Cell Cycle Regulator in Budding Yeast., *J. Biol. Chem.*, 2013, 288, 10558-10566, 査読有, 10.1074/jbc.M112.402214

Masaki Mizunuma, Takafumi Ogawa, Tetsuya Koyama, Atsunori Shitamukai, Ryohei Tsubakiyama, Tadamas Komaruyama, Toshinaga Yamaguchi, Kazunori Kume, Dai Hirata., Evidence of Antagonistic Regulation of Restart from G1 Delay in Response to Osmotic Stress by the Hog1 and Whi3 in Budding Yeast., *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2013, 77, 2002-2007, 査読有, 10.1271/bbb.130260

Togo Shimosawa, Kazuo Yamagata, Takefumi Kondo, Shigeo Hayashi, Atsunori Shitamukai, Daijiro Konno, Fumio Matsuzaki, Jun Takayama, Shuichi Onami, Hiroshi Nakayama, Yasuhiro Kosugi, Tomonobu M. Watanabe, Katsumasa Fujita, Yuko Mimori-Kiyosue, Improving

spinning disk confocal microscopy by preventing pinhole cross-talk for intravital imaging., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2013, 110,3399-3404, 査読有, 10.1073/pnas.1216696110.

Atsunori Shitamukai, Fumio Matsuzaki, Control of asymmetric cell division of mammalian neural progenitors. Dev. Growth Differ. 2012, 54, 277-286, 査読無, 10.1111/j.1440-169X.2012.01345.x.

[学会発表](計 7件)

下向敦範, Live imaging of the developing brain, 第7回神経発生討論会, 2014年03月13日~2014年03月14日, 大阪府, 吹田市, 大阪大学 吹田キャンパス 銀杏会館

下向敦範, 神経幹細胞の自己複製能を維持するシグナルの空間的制御, 第36回日本神経科学大会, 2013年06月20日~2013年06月23日, 京都府, 京都市, 国立京都国際会館

Atsunori Shitamukai, Spatial and temporal control of signaling pathways for neural stem cell self-renewal in the developing mammalian brain., 第46回日本発生生物学会, 2013年05月28日~2013年05月31日, 島根県, 松江市, くにびきメッセ

下向敦範, 神経幹細胞の自己複製能を維持するシグナルの時空間的制御, 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日~2012年12月14日, 福岡県, 福岡市, 福岡国際会議場

下向敦範, マウス神経幹細胞の自己複製能における上皮構造の役割, 第34回日本神経科学大会, 2012年09月18日~2012年09月21日, 愛知県, 名古屋市, 名古屋国際会議場

Atsunori Shitamukai, Roles of the epithelial structure in the neural progenitor self-renewal in the mammalian developing neocortex., 4th International Conference on Stem Cell and Tissue Formation, 2012年07月18日~2012年07月20日, ドイツ, ドレスデン, マックスプランク研究所

Atsunori Shitamukai, Roles of the epithelial structure in the neural progenitor self-renewal in the mammalian developing brain., 第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会 合同大会, 2012年05月28日~2012

年05月31日, 兵庫県, 神戸市, 神戸国際会議場

[図書](計 1件)

Fumio Matsuzaki, Atsunori Shitamukai, Mammalian Development: Networks, Switches, and Morphogenetic Processes, SECTION II. MORPHOGENETIC PROCESSES, 8 Cell Division Modes and Cleavage Planes of Neural Progenitors during Mammalian Cortical Development, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2013, 111-126

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下向敦範 (SHITAMUKAI Atsunori) 発生・再生科学総合研究センター・専門職研究員
研究者番号: 00442971

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: