

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430035

研究課題名(和文) 神経幹細胞の分化に際し速やかに発現変動する遺伝子の脳組織形成への関与

研究課題名(英文) Mechanisms controlling temporal identity and departure of neural progenitor cells during cerebral development

研究代表者

川口 綾乃 (Kawaguchi, Ayano)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90360528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の対象は、哺乳類大脳の発生時にみられる神経幹細胞から生じた分化細胞の脳室面からの離脱と、神経幹細胞の時間軸に沿った個性変遷の2点である。共に代表者が得ているマウス大脳原基由来の単一細胞遺伝子発現プロファイルを利用し研究を推進した。前者については、種々の機能実験の結果に基づき、分化早期に発現上昇する遺伝子群の中から目的とする細胞離脱制御に関わる因子を一つ同定し、その特徴的な発現パターンを確認した。後者については、発生時刻の進行にともなって発現変化する「時間軸遺伝子」を同定し、細胞周期を止めても神経幹細胞内で発生時刻を刻む「時計」が進んでいくことを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to reveal the mechanisms regulating (1) the departure of differentiating cells from the apical surface and (2) transition of temporal identity of the neural stem cell during mammalian cerebral development. We promoted the research based on the single-cell transcriptome profiles. Based on the results from various functional experiments, we identified one molecule which plays a key role in cellular delamination from the apical surface, and also confirmed its characteristic expression pattern. Regarding the temporal identity, we identified "time-axis genes" whose expression changes over time but is independent of differentiation status. The pattern of changes in the expression of such temporal-axis genes is unaffected by cell-cycle arrest, suggesting that the timing mechanisms in neural stem cells function independently of cell-cycle progression.

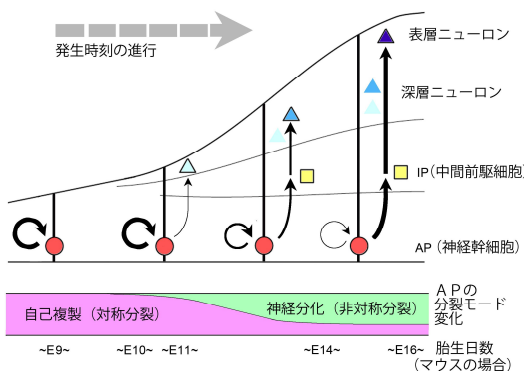
研究分野：神経発生

キーワード：神経幹細胞 神経前駆細胞 細胞周期進行 大脳発生

1. 研究開始当初の背景

哺乳類大脳の発生過程で細胞産生を担う神経幹細胞(神経前駆細胞, AP, apical progenitor cell とも呼ばれる)は、脳室面から脳膜にまで至る放射状に長い形態をしており、細胞周期に応じてその細胞体を脳室帯内でエレベーター運動させつつ、脳室面で分裂する。この分裂によって誕生する娘細胞のうち、一部は中間前駆細胞やニューロンへと分化し、脳室面から離脱して脳室帯の外側へと移動する。分化した細胞が正しいタイミングで離脱することは、最終的に形成される大脳皮質の層形成だけでなく、継続的に細胞を産生する必要のある脳室帯の維持にも必須の条件である。上皮間葉転換(EMT)に関連する転写因子がこの細胞離脱に関与するという報告はあるものの、分化細胞がその誕生から数時間のうちに離脱を開始する現象を説明する具体的な分子機構は未だ明らかではない。

一方、脳室面の分裂で誕生した娘細胞の運命は発生の時期に応じて変化することが知られている。この変化には2つの局面がある。ひとつは分化して脳室面から離脱するか再び未分化な神経幹細胞として維持されるかという選択の比率の変化であり、マウスでは胎生12日目頃を中心に变化する。もうひとつが最終的に分化して形成されるニューロンの種類であり、胎生初期には深層ニューロン、胎生後期には表層ニューロンに分化する細胞が生み出される(図1)。



(図1)哺乳類の大脳皮質発生の模式図

このような発生の時期に応じた神経幹細胞とその娘細胞の挙動変化を説明する、神経幹細胞が発生時刻を知るための「タイマー」の仕組みはよくわかっておらず、従来は細胞周期の進行度合いや細胞分裂の回数をカウントしているのではないかと漠然と考えられてきた。

2. 研究の目的

(1)細胞離脱制御機構の解明

分化直後の細胞がどのような分子機構で脳室面から移動を開始するのかを、特に神経幹細胞の「分化直後」に発現変動する遺伝子の機能実験を通して明らかとする。

(2)発生の時間軸に沿った神経幹細胞の個性変遷

まず発生の時刻進行に伴い神経幹細胞がどのように遺伝子発現を変化させるのかを明らかとした上で、この神経幹細胞の時間軸に沿った遺伝子発現変化と細胞周期進行との関係を実験的に明らかにする。

3. 研究の方法

これまでに代表者が得てきた各発生段階のマウス大脳原基細胞由来の単一細胞の網羅的な遺伝子発現プロファイルを利用して両研究を推進した。

(1)マウス大脳原基への *in vivo* エレクトロポレーション法による遺伝子導入・機能阻害実験を通して、神経幹細胞の分化直後に変動する遺伝子セットの中から分化に伴う移動開始に関係する分子を探索・同定し、その詳細な表現型や組織内・細胞内局在を検討した。

(2)発生時期の異なる大脳原基細胞の単一細胞遺伝子発現プロファイルをクラスター解析し、細胞の種類を遺伝子発現のパターンから分類して神経幹細胞と中間前駆細胞を同

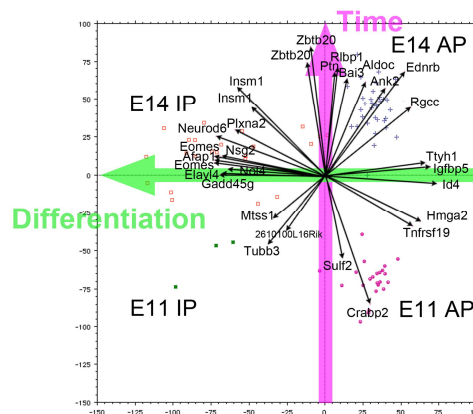
定した。同定された神経幹細胞・中間前駆細胞の遺伝子発現プロファイルを主成分分析等により解析し、発生時刻に応じて特異的に変化する遺伝子群(時間軸遺伝子)を決定した。胎生期マウス大脳に存在する神経幹細胞に対して未分化性を維持しながら細胞周期を止める実験操作(活性型 Notch1 と CDK インヒビター-p18 の *in vivo* エレクトロポレーション)を行い、1日後から4日後に細胞を取り出して、先に同定した時間軸遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR で測定した。これらの結果と、組織内での娘ニューロンの位置と各種マーカーの発現等を指標として、細胞周期停止が遺伝子発現と娘細胞の運命決定に与える影響を検討した。併せて、同様の操作によって作成した細胞周期を停止させた神経幹細胞を完全に周囲から孤立した状態でクローナル培養し、時間軸遺伝子の発現レベルを測定した。得られた結果を細胞集団塊として維持されるニューロスフェア中にある神経幹細胞の遺伝子発現と比較することで、神経幹細胞の時間個性の変遷に与える細胞内在性・細胞外性の機構についての評価を行った。

4. 研究成果

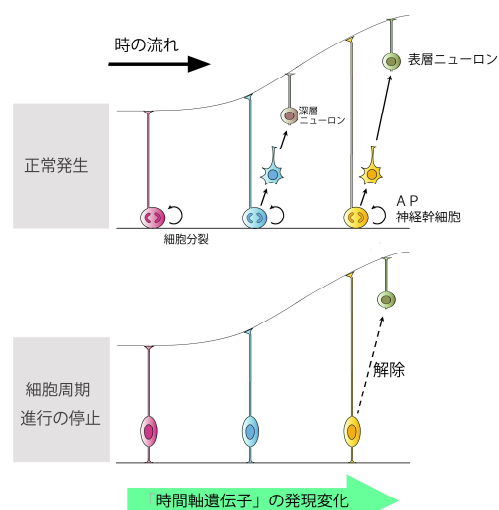
(1)特徴的な発現パターンと過剰発現の表現型、機能阻害によって脳室面からの離脱が遅延することなどから、目的とする細胞離脱制御に関わる因子を一つ同定することができた。一方で予想外なことに、本分子を機能阻害すると、脳室下帯にある outer-radial glia(oRG)様細胞の出現頻度が低下することも観察された。過剰発現下での表現型、前駆細胞内での本分子の特徴的な発現パターンと合わせ、本分子が oRG 細胞の誕生にも関与する可能性が新たに浮上し、この仮説の検証は 2017 年度に採択された新学術領域公募研究課題として発展的に継続されることとなった。

(2)発生時刻の異なる個々の神経幹細胞と中間前駆細胞の遺伝子発現プロファイルの主成分分析に基づき、分化状態によらず発生時刻の進行にともなって発現変化する「時間軸遺伝子」を同定した(図2)。

これらの発現を指標に、発生途中のマウスの脳の中で未分化性を維持させつつ神経幹細胞の細胞周期進行を止めても、時間軸遺伝子の発現は引き続き変化していくことを確認した。また、Cre-loxp システムを利用した2段階 *in vivo* エレクトロポレーションを用いた実験により、細胞周期停止を解除後にその娘細胞は正しい発生の時刻に応じたタイプのニューロンへと分化することを明らかとした(図3)。



(図2)主成分分析をもとに分化状態によらず発生時刻の進行にともない発現量が変化する遺伝子群(縦軸に傾きが近いもの)を時間軸遺伝子として同定した。



(図3)未分化性を維持しながら神経幹細胞の細胞周期の進行を止めても、発生の時刻にそってその性質は変化する。

さらに周囲から完全に孤立した神経幹細胞のクローナル培養とその遺伝子発現プロファイルの解析結果などと合わせ、細胞周期進行を止めても神経幹細胞内では発生時刻を刻む「時計」が進んでいくこと、この個々の細胞内にある仕組みと細胞外からの調整の両者が協調して、発生時期に応じた正しい神経幹細胞の挙動を決定していることを明らかとした。これらは細胞周期進行と発生の「時の流れの進行」との関係という基本的な生物学的疑問に答えるものであり、成果を Nature Communications 誌に報告し、同時に名古屋大学と理化学研究所の共同プレスリリースを行った。また本成果を紹介する英文総説を2本執筆し国際学術誌に発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Delaunay D, Kawaguchi A, Dehay C, Matsuzaki F. Division modes and physical asymmetry in cerebral cortex progenitors. *Curr Opin Neurobiol* 2017,42:75-83 (査読有り)DOI: 10.1016/j.conb.2016.11.009.

Kawaguchi A and Matsuzaki F. Cell cycle-arrested cells know the right time. *Cell Cycle* 2016; 15(20):2683-2684 (査読あり)DOI: 10.1080/15384101.2016.1204857

Okamoto M, Miyata T, Konno D, Ueda HR, Kasukawa T, Hashimoto M, Matsuzaki F*, and Kawaguchi A* (*co-corresponding authors). Cell cycle-independent transitions in temporal identity of mammalian neural progenitor cells. *Nature Communications* 2016,7:11349 (査読有り)DOI: 10.1038/ncomms11349

Miyata T, Okamoto M, Shinoda T and Kawaguchi A. Interkinetic nuclear migration generates and opposes

ventricular-zone crowding: insight into tissue mechanics.

Front Cell Neurosci. 2015,8:473. (査読有り)DOI: 10.3389/fncel.2014.00473.

Kawaue T, Sagou K, Kiyonari H, Ota K, Okamoto M, Shinoda T, Kawaguchi A and Miyata T. Neurogenin2-d4Venus and Gadd45g-d4Venus transgenic mice: Visualizing mitotic and migratory behaviors of cells committed to the neuronal lineage in the developing mammalian brain.

Dev Growth Differ. 56(4)293-304, 2014. (査読有り)DOI: 10.1111/dgd.12131

〔学会発表〕(計5件)

川口綾乃、哺乳類大脳発生における発生の時間軸に沿った神経前駆細胞の変化と Notch シグナリング、第39回分子生物学会年会、2016年12月1日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Kawaue T, Sago K, Kiyonari H, Ota K, Okamoto M, Shinoda T, Kawaguchi A, Miyata T. Visualizing mitotic and migratory behaviors of cells committed to the neuronal lineage in the developing mammalian brains. 第8回神経発生討論会、2015年3月20日、九州大学(福岡県福岡市)

川口綾乃、岡本麻友美、宮田卓樹、松崎文雄、神経前駆細胞の発生時期に応じた個性の変遷は細胞周期進行に依存しない、第37回日本神経科学学会大会、2014年9月12日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Kawaue T, Sago K, Okamoto M, Shinoda T, Kiyonari H, Kawaguchi A, Miyata T. Comprehensive monitoring of cell-cell contact and cell fate choice in the developing mouse neocortex. 第47回日本発生生物学会、2014年5月28日-29日、ウイ

ンク愛知（愛知県名古屋市）

川口綾乃、岡本麻友美、宮田卓樹、松崎文雄、単一細胞遺伝子プロファイリングによって明らかになった大脳発生過程における神経前駆細胞の発生時期依存的な変化、第 36 回日本神経科学学会大会 2013 年 6 月 21 日、京都国際会議場(京都府京都市)

〔その他〕

名古屋大学プレスリリース

細胞周期を止めても「時計」は進む ~ 発生の時刻にそった神経前駆細胞の変化の仕組み ~

URL:https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/research/pdf/cycle_20160421jp.pdf

理化学研究所 CDB ニュース

細胞周期を止めても神経前駆細胞の「時計」は進む

URL:http://www.cdb.riken.jp/news/2016/researches/0506_10696.html

科研費 NEWS 2016 vol2

細胞周期と発生過程の「時の流れ」 の関係を解明

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川口 綾乃(KAWAGUCHI, Ayano)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90360528

(2)連携研究者

岡本 麻友美(OKAMOTO, Mayumi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教
研究者番号：30551965

宮田 卓樹 (MIYATA, Takaki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号:70311751

松崎 文雄(MATSUZAKI, Fumio)
国立研究開発法人理化学研究所・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：10173824