

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670097

研究課題名(和文) 血管発生が抑制された環境が、神経幹細胞の分化制御に果たす役割

研究課題名(英文) Avascular environment regulates differentiation of neural stem cells

研究代表者

水谷 健一 (Ken-ichi, Mizutani)

同志社大学・脳科学研究科・准教授

研究者番号：40469929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物は、体の隅々にまで血管網と神経網を発達させることにより、複雑な高次機能の獲得とその情報処理を可能にしている。これらの血管-神経2大ネットワークが形成されるとき、その3次元パターンは極めて秩序立って規則的に形成され、この神経-血管のネットワークの間には綿密な相互作用が存在することが知られているが、血管によって構築される酸素環境(低酸素環境、活性酸素(ROS))が如何なる生理的役割を担っているかは不明である。本研究では、発生期大脳皮質では、神経幹細胞から多極性細胞への変化にPrdm16を介して、ミトコンドリア局在型ROSの調節機構が神経分化の調節に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The precise control of neuronal migration and morphological changes during differentiation is essential for neocortical development. We found that the progenitors had higher levels of mitochondrial reactive oxygen species (mtROS), but these levels significantly decreased with differentiation. A possible candidate modulator of mtROS is the Prdm16 gene, which was identified by microarray analysis. Prdm16 was specifically expressed by progenitors in the ventricular zone, but its Prdm16 expression declined as cells transitioned into NeuroD1-positive multipolar cells. This downregulation of Prdm16 expression was crucial for the appropriate progression of the multipolar phase and was required for normal cellular development. Both reporter assay and mtROS quantification demonstrated that PGC1 is a major downstream effector of Prdm16 and NeuroD1 that is required for the modulation of multipolar phase and its characteristic mode of migration.

研究分野：神経発生学

キーワード：神経発生 大脳皮質 活性酸素 血管発生

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物は、体の隅々にまで血管網と神経網を発達させることにより、複雑な高次機能の獲得とその情報処理を可能にしている。これらの血管-神経2大ネットワークが形成されるとき、その3次元パターンは極めて秩序立って規則的に形成され、この神経-血管のネットワークの間には綿密な相互作用が存在することが知られている。両者の機能的な相互作用は、血管-神経の明瞭な密着性によるホメオスタシスの調節などからもわかるように、生体機能の根幹を支える基盤として位置付けられ、その重要性は主に臨床の現場において古くから認識されてきた。しかしながら、中枢神経系の発生現象において、血管-神経の相互作用の成り立ちの仕組みが、如何なる分子機序によって構築され、如何なる役割を担っているのかについては明らかにされていない。本研究では、血管によって構築される酸素環境、特に活性酸素(reactive oxygen species; ROS)が如何なる生理的役割を担っているのかについて、注目した。

2. 研究の目的

これまでの申請者の研究から、①発生期大脳皮質における微小血管の発生は極めて秩序だった発生様式を示すことで、特徴的・規則的な微小血管が構築され、②結果として、脳室に面した限られた領域へは決して血管が発生・侵入できない領域が存在することを明らかにしている(発表準備中)。すなわち、神経幹細胞が増殖と分化を繰り返す、神経発生過程における極めて重要な領域で、血管発生を敢えて抑制するという生理現象の意義に興味を持たれる。そこで本研究では、血管が発生・侵入できない領域の分子環境を解明すると共に、この領域が酸素環境の調節や代謝変化に如何なる意義を果たすのかを明確化することを目的とした。

3. 研究の方法

発生期大脳皮質における ROS の質的・量的変化を解析するために、種々の ROS 特異的な化学プローブを活用して、大脳皮質分散細胞を解析し、如何なる種類の ROS がどの程度、どの分化過程の細胞内で存在するか、あるいは、血管との位置関係、酸素分圧の変化との関連性等について検討した。さらには、上記の細胞集団を ROS 量の高低でセルソーターにより分取し、発現プロファイリングを行うことによって、ROS の質的・量的変化と分化制御の関連性、これを調節する分子機構を追求した。これらの実験によって明らかになった ROS 調節に関わる候補分子が、血管が発生・侵入できない領域の構築を介して、神経分化過程に如何なる役割を果たすのかについて、検討を加えた。

4. 研究成果

神経幹細胞においては、顕著にミトコンドリア局在型 ROS(mtROS)が高く、分化に伴って減少することが明らかとなった。mtROS 量が顕著に高い未分化な細胞集団では、ROS 量の増減に直接的に関わるような抗酸化酵素の発現量は顕著な変化が認められなかったが、PR ドメインタンパク質の一種 Prdm16 の発現量が有意に高いことを、DNA マイクロアレイによるスクリーニング実験によって明らかにした。Prdm16 は HGF(hepatocyte growth factor)を調節することで、成体脳においては抗酸化的に働くことで ROS の調節に寄与することが既に確認されている。そこで、発生期大脳皮質において、Prdm16 の発過剰発現実験やノックダウン実験を行ったところ、mtROS 量に異常を生じることが確認された。さらには、in vivo の発生期大脳皮質に同様の実験を行ったところ、Prdm16 の発現変化によって神経分化に劇的な影響を及ぼすことが確認された。中でも、神経幹細胞から多極性細胞への変化において、Prdm16 が決定的な

役割を担うことが明らかとなった。そこで作用機序を更に追求したところ、Prdm16 は bHLH 型転写因子の NeuroD1 の発現を調節し、これが多極性細胞への変化に関与し、Prdm16 の過剰発現によって生後まで NeuroD1 の発現維持が確認され、結果として、大脳皮質の形成異常を生じることが明らかとなった。次に、Prdm16 遺伝子のミュータントを作成し、その機能を確認したところ、Zinc フィンガードメインの欠損によって、NeuroD1 の調節機能が失われることが明らかとなった。さらには、Prdm16 過剰発現細胞で顕著に発現量が高い遺伝子を DNA マイクロアレイによって解析したところ、PGC-1 α 、Igf2 などの代謝調節因子の発現量が顕著に高いことが確認された。実際、Prdm16 の下流分子として同定された PGC-1 α の転写活性は、Prdm16 や NeuroD1 によって制御されていることが確認された。そこで、PGC-1 α の過剰発現ベクターを用いてレスキュー実験を行ったところ、神経幹細胞における mtROS 量が回復し、神経分化の異常が部分的に回復することが確認された。以上のことから、発生期大脳皮質では、神経幹細胞から多極性細胞への変化に Prdm16 を介した mtROS の調節機構が、正常な神経分化の調節に重要な役割を果たすことが示唆された。

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 3 件)

研究代表者 水谷健一

すべて査読あり。*コレスポンディングオーサー

1. Inoue M., Iwai R., Yamanishi E., Yamagata K., Suzuki-Komabayashi M., Komai T., Miyachi H., Kitano S., Honda A., Watanabe C., Teshima W. and Mizutani K*. Deletion of Prdm8

impairs the development of the upper-layer neocortical neurons. *Genes to Cells* 2015;20:758-770. 査読有

2. Yamanishi E., Keejung Y., Lavinia A., Gaiano N. and Mizutani K*. NF-kB signaling regulates the generation of intermediate progenitors in the developing neocortex. *Genes to Cells* 2015;20:706-719. 査読有
3. Inoue M., Kuroda T., Honda A., Suzuki-Komabayashi M., Komai T., Shinkai Y. and Mizutani K*. Prdm8 regulates the morphological transition at multipolar phase during neocortical development. *PLoS ONE* 2014;9:e86356. 査読有

[学会発表] (計 20 件) 国際会議のみ抜粋

1. Ken-ichi Mizutani "Role of hypoxia and ROS during neocortical development" Neuro-Vascular Wiring International Symposium、2015年1月28日、京都
2. Ken-ichi Mizutani "Prdm8 regulates the guidance molecules during neocortical development" Neuroscience 2014, 2014年11月15日、アメリカ ワシントン DC

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://accafe.jp/mizutani_lab/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 健一 (Mizutani, Ken-ichi)

同志社大学大学院・脳科学研究科・准教授

研究者番号：40469929