

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22123003

研究課題名（和文）胎生期大脳新皮質神経幹細胞による多様な細胞の産生機構の解析

研究課題名（英文）Mechanisms underlying cell type diversity in the mouse neocortex

研究代表者

後藤 由季子 (Gotoh, Yukiko)

東京大学・薬学研究科（研究院）・教授

研究者番号：70252525

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 84,400,000円

研究成果の概要（和文）：大脳新皮質は多くの異なる種類のニューロンとグリア細胞等から構成され、それらが脳発生過程において、順序良く共通の前駆細胞（大脳新皮質神経系前駆細胞）から産み出される。私たちはポリコム複合体がその運命転換に重要であることを支持する結果を得た。またニューロン分化およびアストロサイト分化を制御する分子を新たに同定した。さらにニューロン分化と移動の開始をカップリングするメカニズムのひとつを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：One of the fundamental questions in understanding tissue development is how multipotent progenitors/tissue stem cells give rise to various cell types in a defined order to achieve appropriate tissue organization. Neural stem/progenitor cells (NPCs) attract much attention since these cells give rise to neuronal and glial cell types in a developmental-stage dependent manner with striking precision. We have shown in this study that polycomb group (PcG) complex and high mobility group A (HMGA) proteins play pivotal roles in driving fate switches of NPCs during neocortical development. Also, we identified a mechanism that couples neuronal fate commitment and neuronal migration. Further, we found that TCF3 suppresses Wnt signaling and maintains the undifferentiated state of NPCs.

研究分野：分子生物学

キーワード：ニューロンサブタイプ クロマチン状態 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

大脳新皮質は多くの異なる種類のニューロンとグリア細胞等から構成され、それらが正確に配置されることで機能する。脳発生過程において、各種ニューロンとグリアは共通の前駆細胞（大脳新皮質神経系前駆細胞、radial glia）から産み出される。これらの様々な分化細胞は神経系前駆細胞からランダムに生み出されるのではなく、発生の時間に従って順序良く生み出される。そして、ニューロンについては後から生まれたニューロンがより脳表層へと移動するため、産生される時間順序が、おおそ大脳皮質内の空間順序に対応することになる。さらにこのニューロン分化期が終了するとアストロサイトを産生するようになる（グリア分化期）。アストロサイトは整然と並んだ皮質板ニューロンの間を埋めるように配置され、ニューロンの機能を様々な形で支持する。このように、神経系前駆細胞内の発生時間に従った運命制御機構は、大脳皮質の空間配置を決めるのに非常に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 私たちはこれまでに、発生時間に従って起こる神経系前駆細胞のニューロン分化期からグリア分化期への運命転換においてポリコム複合体が重要な役割を果たすことを示してきた (Hirabayashi et al. *Neuron* 2009)。しかしながらニューロン分化期中でいかなるメカニズムが異なるニューロンサブタイプの運命転換を促すかについては不明であった。そこで深層 (L5) の皮質下投射ニューロンの産生に関わる Fezf2 という転写因子が、L5 産生期から L4 産生期への転換期にいかんして発現が抑制されるのかを検討した。

(2) 神経系前駆細胞のニューロン分化期を発生後期に抑制するのにポリコム複合体が重要であることはわかったが、逆にニューロン分化期にニューロン分化ポテンシャルを神経系細胞に与えるメカニズムについては必ずしも明らかではなかった。大脳新皮質神経系前駆細胞において、プロニューラル転写因子 Neurog1, Neurog2 の発現上昇がニューロン分化運命決定に重要である事が示されている。しかしこれらがなぜ発生早期のみ発現出来るかについては明らかではなかった。そこで私たちはこれらの因子の上流メカニズムについて検討した。

(3) 大脳新皮質において、神経系前駆細胞から種々のニューロンが順序良く産生され、それが正確に皮質板内の空間順序に対応するためには、「分化したらすぐに脳室面から離脱し、脳表層に移動する」ことが重要である。これまではニューロン分化する際に、神経系前駆細胞の分裂面が傾くことによって脳室面から離脱するという説が有力であった。しかし今野、松崎らの報告 (Konno et al. *Nat. Cell Biol.* 2008) などの観察により、

ニューロン分化する際も脳室面から離脱はしていないことが明らかになった。従ってニューロン分化と移動開始を結びつける他のメカニズムが存在することが示唆された。私たちはこのリンクに上皮間葉転換が存在する可能性を考えて検討を行った。

(4) 大脳新皮質発生の間、神経系前駆細胞は分裂を続けるが、このとき未分化性を保ちそのプールを維持しながら分化細胞を必要な数だけ産生する必要がある。それではいかんして神経系前駆細胞は未分化細胞と分化細胞のバランスを制御しているのだろうか。ひとつの方法は、神経系前駆細胞が非対称分裂をして、未分化細胞と分化細胞をひとつずつ産生するというやり方である。しかしながら神経系前駆細胞のすべてが分裂後に非対称な運命を持つ娘細胞を産んでいるわけではない。外来性因子による神経系前駆細胞の分化制御もこの未分化 vs 分化のバランスに寄与していることが知られている。

私たちは以前に、ニューロン分化期の神経系前駆細胞はカノニカル Wnt 経路によりニューロン分化が促進されることを報告した (Hirabayashi et al. 2004)。Wnt 経路は、beta-catenin/TCF 転写因子複合体の活性化を介して Neurog1, Neurog2 の発現を誘導する。またこれまでに Wnt 経路が N-Myc 発現誘導を介してニューロン前駆細胞の増加を引き起こすことも報告した (Kawahara et al. 2010)。しかし、Wnt-beta-catenin 経路の強い活性化は、神経系前駆細胞の過剰なニューロン分化を誘導してしまい、未分化な神経系前駆細胞のプールを減少させてしまうと考えられる。そこで私たちは、Wnt 経路の過剰な活性化を抑制する何らかのメカニズムの存在を予想し検討した。

3. 研究の方法

胎生期および生後発達期におけるマウス大脳新皮質の神経系前駆細胞を対象に、種々の遺伝子操作と細胞の性質の解析を行った。特定の遺伝子の神経系前駆細胞の分化運命への影響を調べる際には、主に胎生 1 1 日目から 1 4 日目のマウス大脳新皮質に *in utero* electroporation などにより遺伝子導入を行ってその性質を追跡した。

4. 研究の成果

(1) 深層 (L5) の皮質下投射ニューロン (SCPN) の産生に関わる転写因子 Fezf2 が、SCPN 産生が終了するタイミングでいかなる制御を受けているかを検討した。その結果、Fezf2 遺伝子座で発生時期依存的にポリコム複合体により修飾されるヒストン H3K27me3 の量が増加することを見出した。またポリコム複合体の主要構成因子 Ring1B をノックアウトすると Fezf2 の発現低下が起こらなくなること、その結果 SCPN の産生が通常よりも長い期間起こることがわかった。このようにポリコム複合体が適切な時期

に特定の遺伝子座を抑制することで神経系前駆細胞の運命転換が起こることがニューロン分化期でも明らかに成った (Morimoto-Suzki et al. Development 2014)。

(2) 大脳新皮質神経系前駆細胞において、プロニューラル転写因子 Neurog1, Neurog2 の発現上昇がニューロン分化運命決定に重要である事が示されている。しかしこれらがなぜ発生早期にのみ発現出来るかについてはポリコム制御などが明らかになってきたものの、その全容は不明である。私たちは最近、発生早期の神経系前駆細胞において HMGA1, HMGA2 というクロマチン結合分子が高いレベルで発現しており、これらがクロマチン状態をグローバルに脱凝集させると共にニューロン分化能を与える事を報告した (Kishi et al. Nat. Neurosci. 2012)。そこで HMGA1, HMGA2 の下流でニューロン分化能を獲得するために重要なエフェクターを同定することを試みた。発生早期の大脳新皮質神経系前駆細胞において高いレベルで発現しており、かつ HMGA2 過剰発現で発現レベルが上昇する遺伝子群を同定し、その中でニューロン分化能を促進する活性を持つものを調べたところ、IMP2 を新規に同定した (Fujii et al. Genes to Cells 2013)。IMP2 は過剰発現で後期神経系前駆細胞のニューロン分化能を促進し、アストロサイト分化を抑制した。逆に IMP2 をロックダウンすると早期神経系前駆細胞のニューロン分化能が抑制され、アストロサイト分化が促進した。以上の結果は HMGA2 と同様に、下流で発現制御される IMP2 も発生時期依存的な神経系前駆細胞の運命制御に関わっている事を示唆している。

(3) 神経系前駆細胞がニューロンに分化運命を決定すると、放射状に移動を開始する。この移動開始に先立って脳室面から離脱する必要があるが、そのメカニズムは明らかではなかった。我々は、プロニューラル転写因子の下流で Scratch1, Scratch2 の発現が誘導される事によって、脳室面からの離脱が誘導される事を明らかにした (Itoh et al. Nat. Neurosci. 2013)。Scratch は Snail superfamily に属し、Snail と同様に E-cadherin の転写を抑制することで脳室面における細胞間接着を解離させること、それによって移動を開始させることを明らかにした。Scratch1, Scratch2 は、大脳新皮質だけでなく他の中枢神経系においてもニューロン分化のタイミングで発現上昇することが観察されたことから、同様のメカニズムが一般的にニューロン分化と移動の開始を結びつけている可能性が示唆された。

(4) 私たちは、Wnt 経路の過剰な活性化を抑制する内在性の因子として TCF3 が重要な役割を果たす事を見いだした (Kawahara et al. Development 2014)。TCF3 はロックダウンすると premature にニューロン分化することが、影山先生、大塚先生のグループから既に報告

されている (Ohtsuka et al. Stem Cells 2011)。我々は TCF3 が最も未分化な神経系前駆細胞群に発現していること、またカノニカル Wnt に対して抑制的に働くことを示した。また、Wnt リガンド刺激によって TCF3 の発現が低下し、逆に Wnt 経路に対して促進的に働く TCF ファミリー分子 Tcf1, Lef1 の発現が上昇することも見いだした。即ち、Wnt シグナルが十分に入るまではニューロン分化が容易に起こらないようにブレーキとして TCF3 が働いており、Wnt シグナルが十分に入ると TCF ファミリーが促進型にスイッチすることでターゲット遺伝子の発現が可能になるという「ゲート機構」が働いていることが示唆された。このようなブレーキが存在する事で過剰なニューロン分化が抑えられ、適切なバランスで神経系前駆細胞の運命が制御されていると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 23 件)

Nagao M., Ogata T., Sawada Y., and Gotoh, Y.
Zbtb20 promotes astrocytogenesis during neocortical development,
Nat. Comm. 7:11102, 2016、査読有
doi:10.1038/ncomms11102、

Furutachi, S., Miya, H., Watanabe, T., Kawai, H., Yamasaki, N., Harada, Y., Imayoshi, I., Nelson, M., Nakayama, K.I., Hirabayashi, Y., and Gotoh, Y.
Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells.
Nat. Neurosci. 18, 657-665, 2015, 査読有
doi:10.1038/nn.3989_

Oshiro, H., Hirabayashi, Y., Furuta, Y., Okabe, S. and Gotoh, Y.
Up-regulation of HP1g expression during neuronal maturation promotes axonal and dendritic development in mouse embryonic neocortex.
Genes Cells 20, 108-120, 2015, 査読有
doi:10.1111/gtc.12205.

Morimoto-Suzki, N., Hirabayashi, Y., Tyssowski, K., Singa, J., Vidal, M., Koseki, H. and Gotoh, Y. The polycomb component Ring1B regulates the timed termination of subcerebral projection neuron production during mouse neocortical development
Development, 141, 4343-4353, 2014. 査読有
doi:10.1242/dev.122276.

Nagao, M., Lanjakornsiripan, D., Itoh, Y., Kishi, Y., Ogata, T. and Gotoh, Y.

High mobility group nucleosome-binding family proteins promote astrocyte differentiation of neural precursor cells.

Stem Cells, 32, 2983-2997, 2014. 査読有 doi:10.1002/stem.1787.

Kuwahara, A., Sakai, H., Xu, Y., Itoh, Y., Hirabayashi, Y. and Gotoh, Y.

Tcf3 represses Wnt- catenin signaling and maintains neural stem cell population during neocortical development.

PLoS One, 9, e94408, 2014. 査読有 doi:10.1371/journal.pone.0094408.

Tyssowski, K., Kishi, Y. and Gotoh, Y.
Chromatin regulation of neural development

Neuroscience doi:10.1016/j.neuroscience.2013.10.008, 2013. 査読有 doi:10.1016/j.neuroscience.2013.10.008.

Itoh, Y., Tyssowski, K. and Gotoh, Y.
Transcriptional coupling of neuronal fate commitment and the onset of migration.

Curr. Opin. Neurobiol. 23, 957-964, 2013. 査読有

doi:10.1016/j.conb.2013.08.003.

Kawaguchi, D., Furutachi, S., Kawai, H., Hozumi, K. and Gotoh, Y.

Dll1 maintains quiescence of adult neural stem cells and segregates asymmetrically during mitosis.

Nat. Commun. 4, 1880, 2013. 査読有 doi:10.1038/ncomms2895.

Furutachi, S., Matsumoto, A., Nakayama, K.I. and Gotoh, Y.

p57 controls adult neural stem cell quiescence and modulates the pace of lifelong neurogenesis.

EMBO J. 32, 970-981, 2013. 査読有 doi:10.1038/emboj.2013.50.

Fujii, Y., Kishi, Y. and Gotoh, Y.
IMP2 regulates differentiation potentials of mouse neocortical neural precursor cells.

Genes Cells. 18, 79-89, 2013. 査読有 doi:10.1111/gtc.12024.

Itoh, Y., Moriyama, Y., Hasegawa, T., Endo, T.A., Toyoda, T. and Gotoh, Y.

Scratch regulates neuronal migration onset via an epithelial-mesenchymal transition-like mechanisms.

Nat. Neurosci. 16, 416-425, 2013. 査読有 doi:10.1038/nn.3336.

Kishi, Y., Fujii, Y., Hirabayashi, Y. and Gotoh, Y.

HMG proteins regulate global chromatin state and the neurogenic potential in neocortical precursor cells.

Nat. Neurosci. 15, 1127-1133, 2012. 査読有

Onoguchi, M., Hirabayashi, Y., Koseki, H. and Gotoh, Y.

A noncoding RNA regulates the neurogenin1 gene locus during mouse neocortical development.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 16939-16944, 2012. 査読有 doi:10.1073/pnas.1202956109.

Kishi, Y., Kondo, S. and Gotoh, Y.

Transcriptional activation of mouse major satellite regions during neuronal differentiation.

Cell Struct. Funct. 37, 101-110, 2012. 査読有

Watatani, K., Hirabayashi, Y., Itoh, Y. and Gotoh, Y.

PDK1 regulates the generation of oligodendrocyte precursor cells at an early stage of mouse telencephalic development.

Genes Cells 17, 326-335, 2012. 査読有 doi:10.1111/j.1365-2443.2012.01591.x.

Ip, J.P., Shi, L., Chen, Y., Itoh, Y., Fu, W.Y., Betz, A., Yung, W.H., Gotoh, Y., Fu, A.K. and Ip, N.Y.

2-chimaerin controls neuronal migration and functioning of the cerebral cortex through CRMP-2.

Nat. Neurosci. 15, 39-47, 2011. 査読有 doi:10.1038/nn.2972.

Hirabayashi, Y. and Gotoh, Y.

Epigenetic control of neural precursor cell fate during development.

Nat. Rev. Neurosci. 11, 377-388, 2010. 査読有 doi:10.1038/nrn2810.

Kuwahara, A., Hirabayashi, Y., Knoepfler, P.S., Taketo, M.M., Sakai, J., Kodama, T. and Gotoh, Y.

Wnt signaling and its downstream target N-myc regulate basal progenitors in the developing neocortex.

Development 137, 1035-1044, 2010. 査読有 doi:10.1242/dev.046417.

Miyata, T., Kawaguchi, D., Kawaguchi, A. and Gotoh, Y.

Mechanisms that regulate the number of

neurons during mouse neocortical development.
Curr. Opin. Neurobiol. 20, 22-28, 2010. 査読有
doi:10.1016/j.conb.2010.01.001.

[学会発表](計239件)

Gotoh Y.: Embryonic vs adult neural stem cells, CDSC2016 Satellite Symposium on Forebrain Neurogenesis, 2016/3/16-17, Banff(Canada).

Gotoh Y.: Regulation of Neural Stem Cell Fate during Embryogenesis and in the adult, Neurogenesis, 2016/3/2-5, Cancun(Mexico)

後藤由季子: Embryonic vs adult neural stem cells、新学術領域大脳新皮質構築修了国際シンポジウム「Neocortical Organization」, 2016/2/11-12、東京大学小柴ホール(東京)

Gotoh Y.: Regulation of neural stem cell fate, Sino-German Joint Symposium, Institute of Genetics and Developmental Biology, 2015/9/11-14, Beijing(China)

Gotoh Y.: Embryonic vs adult neural stem cells, 25th Meeting of the International Society for Neurochemistry (ISN), 2015/8/23-27, Cairns(Australia)

後藤由季子: Embryonic vs adult neural stem cells、第67回日本細胞生物学会大会、2015/6/30-7/2、タワーホール船堀(東京)

Gotoh Y.: Embryonic vs adult neural stem cells, Cold Spring Harbor Asia (CSHA) Conference on International Brain Project, 2015/6/19-22, Suzhou(China)

Gotoh Y.: Embryonic vs adult neural stem cells, CDB Symposium Time in Development, 2015/3/23-25, 理化学研究所(神戸)

Gotoh Y.: Embryonic vs Adult Neural Stem Cells, Medical Research Center Symposium, 2014/12/17, London(UK)

Gotoh Y.: Polycomb regulation of neural stem cell fate, 2nd UK/Japan workshop on Neural Epigenetics, 2014/12/15-16, London (UK)

Gotoh Y.: Regulation of embryonic and adult neural stem/progenitor cell fate. 2014 ASCB/IFCB Annual Meeting, 2014/12/6-10, Philadelphia(USA)

Gotoh Y.: Regulation of neural

stem/progenitor cell fate in the embryonic and adult mouse brains, Global controls in stem cells, ISSCR, 2014/11/5-7, Singapore

Gotoh Y.: Regulation of neural stem cell fate in mammalian brain, The 38th Naito Conference on "Molecule-based biological systems", 2014/10/7-10, CHATERAISE Gateaux Kingdom, 札幌(北海道)

Gotoh Y.: Embryonic vs adult neural stem cells, The Notch Meeting VIII, Notch signaling in the Nervous System, 2014/9/28-10/1, Athens(Greece)

Gotoh Y.: Regulation of neural precursor cell fate in the developing mouse neocortex, Development, functions and disorders of the Nervous System(Joint meeting of the 20th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience and the 5th Annual NeuroDev Net Brain Development Conference), 2014/7/19-24, Montreal(Canada)

Gotoh Y.: Neural stem cell development, Gordon Research Conferences /Phosphorylation & G-Protein Mediated Signaling Networks, 2014/6/15-20, Biddeford(USA)

Gotoh Y.: Regulation of neural stem cell fate during mouse neocortical development, MBSJ symposium, New concepts arising in stem cell biology 2013/12/3-6, 神戸国際会議場(兵庫)

Gotoh Y.: Regulation of neural stem cell fate during mouse neocortical development, 2013/11/22-24, 名古屋国際会議場(静岡)

Gotoh Y.: Regulation of neural fate by Polycomb group proteins, UK-Japan Workshop 'Neural Epigenetics From Mechanisms to Disease', 2013/2/26-28, 英国大使館(東京)

Gotoh Y.: Epigenetic regulation of neural stem cell fate during mouse brain development. Keystone Symposium "Neurogenesis", 2013/2/3-8, SantaFe(USA)

②Gotoh Y.: Regulation of neural stem cell fate during mouse brain development. Cold Spring Harbor Conferences Asia "Stem cells and Development", 2012/12/5-8 Suzhou (China)

②後藤由季子: 大脳新皮質発生における神経幹細胞の分化能制御. 第 35 回日本神経科学大会, 2012/9/18-21、名古屋国際会議場 (愛知)

③後藤由季子: 神経幹細胞の運命制御、第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2012/3/26-27、山梨大学甲府キャンパス (山梨)

④Gotoh Y. : Faithful Coupling of Neuronal Fate Commitment and the Onset of Neuronal Migration during Neocortical Development, International Symposium "Neocortical Organization", 2012/3/10-12, 岡崎コンファレンスセンター (静岡)

⑤後藤由季子: GCOE の公開講座、脳を創る細胞の振舞い、2012/1/21、東京大学小柴ホール (東京)

⑥Gotoh Y. : Neural stem cell maintenance in the adult brain, DiSCUSS (Disease - Stem Cell - Unique Signaling - Standpoint) Meeting, 2011/12/5-8, Dresden(Germany)

⑦Gotoh Y. : Neural stem cell maintenance in the adult brain, Joint CSH Asia/ISSCR Conference, 2011/10/24-48, Suzhou(China)

⑧後藤由季子: 神経幹細胞の運命制御、日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム、2011/5/25-26、石川県立音楽堂 (石川)

⑨後藤由季子: 大脳神経幹細胞の分化ポテンシャルの制御、第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010/12/7-10、神戸国際会議場 (兵庫)

⑩Gotoh Y. : Temporal regulation of neural stem cell fate in the developing mouse neocortex, RIKEN BSI Seminar, 2011/11/29, 理化学研究所 (埼玉)

⑪後藤由季子: マウス大脳神経幹細胞の運命制御機構、第 26 回 Wako ワークショップ「幹細胞 iPS 細胞研究の最前線」、2011/11/26、品川グランドセントラルタワー (東京)

⑫後藤由季子: Embryonic and adult neural stem cells in mouse telencephalon、Neuro2010 (第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経科学大会・第 20 回日本神経回路学会大会)、2010/9/2-4、神戸国際会議場 (兵庫)

⑬Gotoh Y. : Embryonic and adult neural stem cells in mouse telencephalon, 3rd International Congress on Stem Cells and

Tissue Formation, 2010.7.11-14 Dresden (Germany)

⑭Gotoh Y., Tsuboi M., Kishi Y., Suzuki N., Hirabayashi Y.: Temporal regulation of neural stem cell fate in the developing mouse neocortex, CSHL Francis Crick Neuroscience Symposium, 2010/4/12-17, 蘇州 (中国)

⑮Gotoh Y.: Chromatin-level regulations during neocortical development, Cold Spring Harbor Conferences Asia, Local Transport-Francis Crick Neuroscience Symposium, 2010/4/12-17, 上海 (中国)

[図書] (計 14 件)

古舘昌平、後藤由季子: 学研メディカル秀潤社、細胞工学 1 月号、2016、88(p58-59)

古舘昌平、原田雄仁、後藤由季子: 羊土社、実験医学 9 月号、2015、vol33.No14、134,p2262-2265

遠藤 垂穂、後藤由季子: 医学書院、生体の科学、2014、Vol.65 No.3、p208-214

伊藤靖浩、後藤由季子: 化学同人、脳の発生学 3 章「細胞運命決定の分子機構」、2013、p34-50

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~molbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 由季子 (GOTOH Yukiko)

東京大学大学院薬学系研究科・教授

研究者番号: 70252525

(2) 研究分担者

今吉 格 (IMAYOSHI Itaru)

京都大学ウイルス研究所・特定准教授

研究者番号: 60543296