

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 9 月 20 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02538

研究課題名(和文)小脳各種神経細胞の個性獲得および分化の分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms of acquisition of individuality and differentiation of various types of neurons in the cerebellum

研究代表者

星野 幹雄 (Hoshino, Mikio)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 病態生化学研究部・部長

研究者番号：70301273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：小脳の顆粒細胞前駆細胞が、段階的に「未分化性」と「増殖性」を失い、最終的に顆粒細胞へと神経分化することが見出された。さらにこの段階的变化において、細胞増殖を活性化させることが知られていたサイクリンD1が、リン酸化を介してATOH1タンパク質を安定化させ、その結果として前駆細胞の未分化性を維持させることが明らかにされた。また、脳の発生とともに増加するWNTタンパク質とそれによって発現誘導されるPROX1分子によって、徐々にサイクリンD1の量が減少し、それによって顆粒細胞発生が加速されるということも明らかにされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、顆粒細胞(GCs)という神経細胞の新しい発生メカニズムとその分子基盤に関して新しい知見を多く見出すことができた。これらの成果は、顆粒細胞の発生機構だけでなく、進化的な小脳皮質の拡大機構や顆粒細胞のガン化のメカニズムに関する多くの示唆に富んでいる。また、今回注目している分子や発生メカニズムは小脳にとどまらない。大脳皮質をはじめとする各脳領域で、これらの分子や発生メカニズムは共通しているため、小脳の研究が、脳全体の共通原理の創出につながっていくことが、今後大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：It was found that granule cell progenitors (GCPs) in the cerebellum progressively lose their "undifferentiated" and "proliferative" nature and eventually differentiate into granule cells. Furthermore, in this stepwise transition, cyclin D1, which was known to activate cell proliferation, was found to stabilize the ATOH1 protein via phosphorylation, thereby maintaining the undifferentiated nature of GCPs. It was also revealed that the WNT protein, which increases with brain development, and the PROX1 molecule whose expression is induced by the WNT protein, gradually decrease the amount of cyclin D1, thereby accelerating GC development.

研究分野：神経発生生物学

キーワード：神経発生 小脳 転写因子 細胞分化 サイクリンD1 PROX1 ATOH1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系には、数千種類もの多様な神経細胞が存在しているが、「限られた遺伝情報からいかにして多種多様な神経細胞を分別して生み出すのか」については、まだ未解明の部分が多い。申請者は、「神経細胞を生み出す神経上皮細胞が持つ(1)位置情報と(2)時間情報の組み合わせによって多種多様な神経細胞が生み分けられている」という仮説を立て、それを証明するために、小脳をモデル系として、この課題に取り組んできた。そして、(1)興奮性神経細胞 vs 抑制性神経細胞の生み分け機構、および(2)各種抑制性神経細胞の生み分けについて、それぞれ神経幹細胞の位置情報(Neuron 2005, JNS 2014)と時間情報(Nat Commun 2014)を担う分子機構を明らかにすることによって、その分子メカニズムを明らかにしてきた。小脳神経細胞の個性獲得機構が明らかにされた後、次なる解くべきクエスチョンは、神経幹細胞や神経前駆細胞の増殖停止と神経細胞分化の制御機構である。神経前駆細胞が「未分化(未成熟)」かつ「増殖性」の細胞であるのに対して、神経細胞は「分化し」かつ「増殖性を失った」細胞である。しかしながら、脳の発達過程において、これらの「未分化性」と「増殖性」を同時並行的に協調制御するメカニズムについては、あまり解明されてなかった。

このテーマを研究するために、小脳顆粒細胞系は良いモデル系である。小脳顆粒細胞前駆細胞(GCPs)は、発生途上の小脳の外顆粒層で増殖するが、やがて細胞周期を離脱し顆粒細胞(GCs)という神経細胞へと分化する。

2. 研究の目的

小脳の GCPs-GCs をモデル系として、神経前駆細胞の増殖性と未分化性を制御し、神経前駆細胞が適切な時期に適切な数の神経細胞(GCs)を生み出す分子機構を明らかにする。

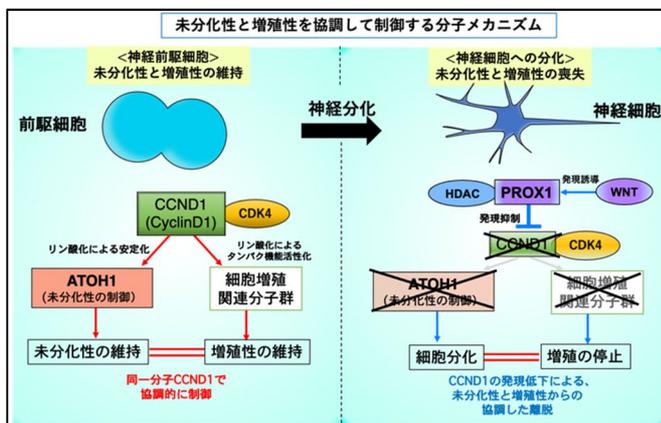
3. 研究方法

- (1) 生直後のマウス小脳のシングルセル RNAseq データ取得する。
- (2) GCPs について、これまでに未分化性の維持に関わることが知られていた転写因子 ATOH1 と、細胞増殖を促進することが知られていた細胞周期関連分子 CyclinD1(CCND1)について着目する。発達途上のマウス小脳の GCPs に対して遺伝子導入し、これらの分子の働きを強めたり(強制発現)、弱めたりする(ノックダウン)実験を行う
- (3) 培養細胞を用いた実験により、CCND1 が CDK4 というリン酸化酵素と共役することによって ATOH1 タンパクをリン酸化できるかどうかについて、ウエスタンブロット法で調べる。さらに、ATOH1 タンパク質の安定性への影響についても同時に調べる。
- (4) 小脳の発達過程における GCPs の CCND1 発減量変化について、免疫染色およびウエスタンブロット法で調べる。
- (5) 小脳の発達過程における WNT タンパク質の発現量、WNT シグナルの強さについて免疫染色およびウエスタンブロット法で調べる。

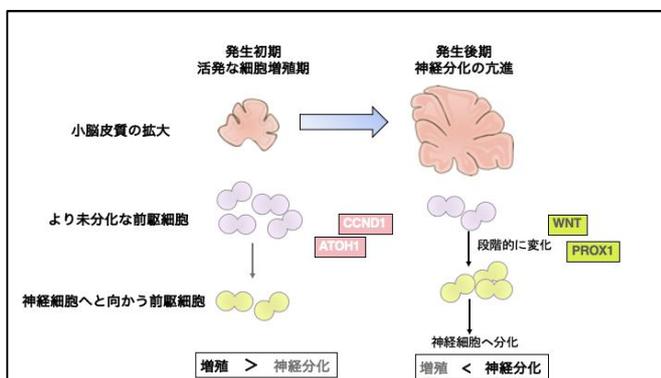
4. 研究成果

- (1) 上記 3.(1)の結果、シングルセル RNAseq データは高品質のものを取得することができた。さまざまな解析に使う基盤ができた。
- (2) 上記 3.(2)の結果、ATOH1 や CCND1 が「活発に増殖を行うより未分化な前駆細胞(AT+GCPs)」としての性質の維持に必要とされることが明らかになった。
- (3) 上記 3.(3)の結果、CCND1 が CDK4 というリン酸化酵素と共役することによって ATOH1 タンパクをリン酸化することで(309番目のセリン残基) ATOH1 タンパクを安定化させることを見出した。もともと CCND1 は「増殖性」の促進に働くことが知られていたが、この結果は、このタンパク質が ATOH1 タンパク質の安定化を介して「未分化性」の維持にも働くことを示していた。つまり、CCND1 という一つのタンパク質の量をコントロールするだけで、神経前駆細胞の中で「未分化性」と「増殖性」を協調して制御できる、ということが明らかになった。
- (4) 小脳の発達過程では、初期には多くの GCPs が「未分化性」と「増殖性」を保ちつつも少数の GCs を生み出すが、小脳の発生が進むと、GCPs は徐々にその増殖性と未分化性を失い、神経細胞へと分化する確率が増えることが知られている。上記 3.(4)の結果、発生が進むにつれて CCND1 のタンパク質量が徐々に減少することが見出された。また遺伝子導入実験から、発達過程における CCND1 の量の減少が顆粒細胞前駆細胞から神経細胞への分化の促進の原因となることが示唆された。

(5)以上から、GCPs においては、CCND1 という単一分子が「未分化性」と「増殖性」をコントロールすることによって、この両者を協調して同じ方向へ向かわせることに寄与していると考えられた。さらに、3.(5)の結果から、細胞外からのシグナルである WNT シグナルが発達と共に上昇していくことを見出した。さらに、WNT シグナルがより上位で CCND1 の量のコントロールをしていることも明らかにされた。このことは、今回見出した分子ネットワークが、ひとつひとつの細胞の中での「未分化性」と「増殖性」を制御しているだけではなく、細胞全体のシステムとして細胞増殖に比重をおくか、それとも神経分化にするかというバランスの決定にも寄与していると考えられた(右上図)(文献 1,2)。



(6) 本研究では、顆粒細胞(GCs)という神経細胞の新しい発生メカニズムとその分子基盤に関して新しい知見を多く見出すことができた。これらの成果は、顆粒細胞の発生機構だけではなく、進化的な小脳皮質の拡大機構や顆粒細胞のガン化のメカニズムに関する多くの示唆に富んでいる。また、今回注目している分子や発生メカニズムは小脳にとどまらない。大脳皮質をはじめとする各脳領域で、これらの分子や発生メカニズムは共通しているため、小脳の研究が、脳全体の共通原理の創出につながっていくことが、今後大いに期待される(右下図)。



<引用文献>

(1)Miyashita S, Owa T, Seto Y, Yamashita M, Aida S, Sone M, Ichijo K, Nishioka T, Kaibuchi K, Kawaguchi Y, Taya S, Hoshino M. Cyclin D1 controls development of cerebellar granule cell progenitors through phosphorylation and stabilization of ATOH1. *EMBO J.* 40(14) e10572. 2021.
 (2) Published erratum for (1). *EMBO J.* 43(8), e113613, 2023.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 1. Yamashiro K, Hori K, Esther L, Aoki R, Shimaoka K, Arimura N, Egusa SF, Sakamoto A, Abe M, Sakimura K, Watanabe T, Uesaka N, Kano M, Hoshino M	4. 巻 23
2. 論文標題 AUTS2 governs cerebellar development Purkinje cell maturation, motor function and social communication.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101820
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101820	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hayase Y, Amano S, et al	4. 巻 8
2. 論文標題 Down syndrome cell adhesion molecule like-1 (DSCAML1) links the GABA system and seizure susceptibility.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Neuropathol Commun	6. 最初と最後の頁 206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40478-020-01082-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 3. Arimura N, Okada M, Taya S, Dewa KI, Tsuzuki A, Uetake H, Miyashita S, Hashizume K, Shimaoka K, Egusa S, Nishioka T, Yanagawa Y, Yamakawa K, Inoue YU, Inoue T, Kaibuchi K, Hoshino M	4. 巻 6
2. 論文標題 DSCAM regulates delamination of neurons in the developing midbrain.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaba1693
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aba1693	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 4. Hori K, Yamashiro K, Nagai T, Shan W, Egusa SF, Shimaoka K, Kuniishi H, Sekiguchi M, Go Y, Tatsumoto S, Yamada M, Shiraishi R, Kanno K, Miyashita S, Sakamoto A, Abe M, Sakimura K, Sone M, Sohya K, Kunugi H, Wada K, Yamada M, Yamada K, Hoshino M	4. 巻 23
2. 論文標題 AUTS2 Regulation of Synapses for Proper Synaptic Inputs and Social Communication.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101183	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Pajtlér KW, Wei Y, Okonechnikov K, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 YAP1 subgroup supratentorial ependymoma requires TEAD and nuclear factor I-mediated transcriptional programmes for tumorigenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-11884-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shiraishi Ryo D., Miyashita Sathoshi, Yamashita Mariko, Adachi Toma, Shimoda Mana M., Owa Tomoo, Hoshino Mikio	4. 巻 34
2. 論文標題 Expression of transcription factors and signaling molecules in the cerebellar granule cell development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gene Expression Patterns	6. 最初と最後の頁 119068 ~ 119068
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gep.2019.119068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujiyama Tomoyuki, Miyashita Satoshi, Tsuneoka Yousuke, Kanemaru Kazumasa, Kakizaki Miyo, Kanno Satomi, Ishikawa Yukiko, Yamashita Mariko, Owa Tomoo, Nagaoka Mai, Kawaguchi Yoshiya, Yanagawa Yuchio, Magnuson Mark A., Muratani Masafumi, Shibuya Akira, Nabeshima Yo-ichi, Yanagisawa Masashi, Funato Hiromasa, Hoshino Mikio	4. 巻 24
2. 論文標題 Forebrain Ptf1a Is Required for Sexual Differentiation of the Brain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 79 ~ 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.06.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Yukiko U., Morimoto Yuki, Hoshino Mikio, Inoue Takayoshi	4. 巻 132
2. 論文標題 Generation of Pax6-IRES-EGFP knock-in mouse via the cloning-free CRISPR/Cas9 system to reliably visualize neurodevelopmental dynamics	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2018.01.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Itoh Masayuki, Yamashita Mariko, Kaneko Masaki, Okuno Hiroyuki, Abe Manabu, Yamazaki Maya, Natsume Rie, Yamada Daisuke, Kaizuka Toshie, Suwa Reiko, Sakimura Kenji, Sekiguchi Masayuki, Wada Keiji, Hoshino Mikio, Mishina Masayoshi, Hayashi Takashi	4. 巻 38
2. 論文標題 Deficiency of AMPAR?Palmitoylation Aggravates Seizure Susceptibility	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 10220 ~ 10235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1590-18.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakikubo Morito, Furuyama Kenichiro, Horiguchi Masashi, Hosokawa Shinichi, Aoyama Yoshiki, Tsuboi Kunihiko, Goto Toshihiko, Hirata Koji, Masui Toshihiko, Dor Yuval, Fujiyama Tomoyuki, Hoshino Mikio, Uemoto Shinji, Kawaguchi Yoshiya	4. 巻 8
2. 論文標題 Ptf1a inactivation in adult pancreatic acinar cells causes apoptosis through activation of the endoplasmic reticulum stress pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-34093-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ambrozkiwicz MC., Schwark M, Kishimoto Suga M, Borisova E, Hori K, Salazar-Lazaro A, Rusanova A, Altas B, Piepkorn L, Bessa P, Schaub T, Zhang X, Rabe T, Ripamonti S, Rosario M, Akiyama H, Jahn O, Kobayashi T, Hoshino M, Tarabykin V, Kawabe Hi	4. 巻 100
2. 論文標題 Polarity Acquisition in Cortical Neurons Is Driven by Synergistic Action of Sox9-Regulated Wwp1 and Wwp2 E3?Ubiquitin Ligases and Intronic miR-140	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 1097 ~ 1115.e15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuron.2018.10.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Itoh Masayuki, Okuno Hiroyuki, Yamada Daisuke, Yamashita Mariko, Abe Manabu, Natsume Rie, Kaizuka Toshie, Sakimura Kenji, Hoshino Mikio, Mishina Masayoshi, Wada Keiji, Sekiguchi Masayuki, Hayashi Takashi	4. 巻 39
2. 論文標題 Perturbed expression pattern of the immediate early gene Arc in the dentate gyrus of GluA1 C terminal palmitoylation deficient mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 61 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/npr2.12044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takizawa Hotake, Hara Yuko, Mizobe Yoshitaka, Ohno Taisuke, Suzuki Sadafumi, Inoue Ken, Takeshita Eri, Shimizu-Motohashi Yuko, Ishiyama Akihiko, Hoshino Mikio, Komaki Hirofumi, Takeda Shin'ichi, Aoki Yoshitsugu	4. 巻 9
2. 論文標題 Modelling Duchenne muscular dystrophy in MYOD1-converted urine-derived cells treated with 3-deazaneplanocin A hydrochloride	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40421-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arimura Nariko, Dewa Ken-ichi, Okada Mako, Yanagawa Yuchio, Taya Shin-ichiro, Hoshino Mikio	4. 巻 24
2. 論文標題 Comprehensive and cell-type-based characterization of the dorsal midbrain during development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 41 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12656	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyashita S, Owa T, Seto Y, Yamashita M, Aida S, Sone M, Ichijo K, Nishioka T, Kaibuchi K, Kawaguchi Y, Taya S, Hoshino M	4. 巻 40
2. 論文標題 Cyclin D1 controls development of cerebellar granule cell progenitors through phosphorylation and stabilization of ATOH1.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO J	6. 最初と最後の頁 e105712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2020105712	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 星野幹雄、堀啓
2. 発表標題 AUTS2の神経発生における機能と病理
3. 学会等名 NPBPPP合同年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hoshino M, Hori K
2. 発表標題 Neuronal progenitors and synapses in psychiatric disease mouse model
3. 学会等名 日本神経科学学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星野幹雄, 宮下聡
2. 発表標題 小脳顆粒細胞分化の分子機構と発達期曝露による影響評価
3. 学会等名 日本毒性学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星野幹雄
2. 発表標題 脳の性分化のための新たな分子機構
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Adachi T, Miyashita S, Yamashita M, Shiraishi R, Shimoda M, Owa T, Hoshino M
2. 発表標題 Notch signaling in the cerebellar granule cell development.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嶋岡可純, 堀啓, 坂本亜沙美, 阿部学, 崎村建司, 星野幹雄
2. 発表標題 Auts2 is required for neurogenesis in cerebral cortex.
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀啓, 山城邦比古, 永井拓, Shan Wei, 江草早紀, 嶋岡可純, 郷康宏, 辰本将司, 菅野康太, 坂本亜沙美, 阿部学, 崎村健司, 惣谷和宏, 功刀浩, 山田清文, 星野幹雄
2. 発表標題 自閉症感受性遺伝子Auts2変異により引き起こるシナプス形成障害およびマウス行動異常の病態解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hoshino M, Hori K
2. 発表標題 AUTS2 gene and psychiatric disorders
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hori K, Nagai T, Shan W, Yamad M, Shiraishi R, Sakamoto A, Kanno K, Abe M, Yamada K, Sakimura K, Hoshino M
2. 発表標題 Loss of Auts2 induces the defects of synaptic function and cognitive brain functions
3. 学会等名 新学術領域個性創発脳第1回国際シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嶋岡可純, 堀啓, 坂本亜沙美, 阿部学, 崎村健司, 星野幹雄
2. 発表標題 AUTS2 is required for neurogenesis in cerebral cortex
3. 学会等名 第12回神経発生討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大輪智雄, 田谷真一郎, 宮下聡, 西岡朋生, 中村卓郎, 後飯塚僚, 貝淵弘三, 星野幹雄
2. 発表標題 Role of Meis1 in the cerebellar development
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会 第61回日本神経化学大会合同年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嶋岡可純, 堀啓, 坂本亜沙美, 阿部学, 崎村健司, 星野幹雄
2. 発表標題 The role of AUTS2 gene in the corticogenesis
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会 第61回日本神経化学大会合同年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 病態生化学研究部 ホームページ
<https://byosei-neuroscience-institute.ncnp.go.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------