

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22500289

研究課題名（和文）

発生期の脳組織中で神経幹細胞の維持と分化を制御する機構の解明

研究課題名（英文）

Studies on the regulatory mechanisms for maintenance and differentiation of neural stem cells in the developmental brain

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

研究成果の概要（和文）：

発生の進行に伴って神経幹細胞がどのように遺伝子発現パターンを変化させていくのかを、マウス大脳原基由来の神経幹細胞を対象に、単一細胞レベルの遺伝子発現情報を用いて描出した。神経幹細胞集団内で、Notch シグナル関連遺伝子の発現レベルの分散程度が発生時期に応じて変化すること、神経幹細胞の中で発生の時を刻む「時計」の進行に、Notch シグナルの振動、細胞周期の進行や細胞分裂が必須ではないことを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

Genome-wide transcriptome profiles of single mouse cortical progenitors identified a set of temporally-regulated genes in embryonic neural stem cells (NSCs). Early NSCs showed cell-to-cell variations of Notch signaling-related gene expression, while later NSCs were more homogenous in Notch signaling status, suggesting a shift of NSC-maintaining strategy. I also found that neither initial oscillatory Notch activation nor cell cycle progression is necessary for NSCs' internal "clock" mechanisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経発生

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：発生・発達・再生神経科学

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の脳の発生過程で、未分化な前駆細胞である神経幹細胞の分裂パターンは、発生時期に応じて変化することが知られている。胎生初期においては、神経幹細胞の多くは、分裂により自分自身を2つ生み出す「対称分裂」をする。

次いで胎生中期になると、分裂により生じた2つの娘細胞のうち、一つが神経幹細胞、そしてもう一つが分化した細胞（ニューロン、あるいはニューロンしか産生しない中間前駆細胞）になるという、「非対称分裂」が増加してくる。

このような、発生時期に応じた神経幹細胞の分裂モードの変化と、神経幹細胞の維持と分化細胞の産生を同時に成し遂げるようなシステムは、最終的にできてくるニューロンの数や脳のサイズに大きく影響するが、その制御機構は一部しか明らかとなっていない。

一方、代表者はこれまで、単一細胞から cDNA を作成し、DNA マイクロアレイで一つ一つの細胞の遺伝子発現をプロファイルするという手法を用いて、胎生中期（マウス胎生 14 日目、E14）に焦点を絞って、神経幹細胞がどのようにして中間前駆細胞に変化するのを探ってきた。その結果、神経幹細胞と中間前駆細胞を明確に区別する遺伝子セットを同定した上で、神経幹細胞の分裂により誕生した直後の幼若な中間前駆細胞の遺伝子発現情報を得ることができた。さらにこれらの細胞は、従来から神経幹細胞の維持に重要だと知られてきた Notch シグナルのリガンドである Delta を一過的に強く発現して、周囲の神経幹細胞の未分化性を維持しており、結果として神経幹細胞の分化と維持のバランスをとっていることを明らかとした。

そこで本研究では、これまでの研究成果をさらに発展させ、種々の細胞が混在する脳組織中で、発生時期に応じて、神経幹細胞の維持と分化がどのように制御されているのか、その分子機構を解明することを目指した。

## 2. 研究の目的

### (1) 各発生時期の前駆細胞の分類

E10-E16 というニューロン産生が行われる時期に注目し、遺伝子発現プロファイル情報やリアルタイム PCR によるマーカー遺伝子の発現パターンから、各発生時期の前駆細胞を分類する。ガラスキャピラリーを用いて単一細胞をピックアップすることで、細胞分散処理後に逆転写反応を速やかに開始できるため、組織内での状態を反映させた遺伝子発現プロファイルを得ることができる。

### (2) 神経幹細胞の遺伝子発現変化

発生時期の異なる神経幹細胞で、どのような遺伝子の発現が変化しているのかを、単一の神

経幹細胞レベルで描出する。またそれらの集合体として神経幹細胞集団を捉えた時に、その遺伝子発現の分散の程度がどのように変化しているのかを詳細に検討する。特に、Notch シグナル関連分子の発現変化に注目する。

### (3) 遺伝子発現変化を制御する「時計」

神経幹細胞の、発生の時期依存的な性質の変化（遺伝子発現変化や、生みだすニューロンの最終目的地となる大脳皮質層の違い）は、どのような「時計」を用いて制御されているのかについて検討する。神経幹細胞内では Notch シグナルの活性化レベルが振動（オシレーション）していることが報告されている。そのサイクル数が、発生時期を数え知らせる「時計」の役割をしている可能性について検討する。また、神経幹細胞の細胞周期進行・細胞分裂の回数が、「時計」の役割をしている可能性について検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 単一細胞由来 cDNA の作成

既に得ている E11, 14, 16 の大脳原基単一細胞由来の cDNA に加えて、E10, E12, E13 のマウス大脳原基をトリプシンにより分散処理した後、ガラスキャピラリーを用いて単一細胞をピックアップし、栗本・斎藤らの方法 (Nat Protoc. 2007, 2:739-752) を用いて単一細胞由来 cDNA を作成した。

### (2) 前駆細胞の分類

DNA マイクロアレイ (GeneChip, Affimetrix 社) を用いて得た E11, E14, E16 の単一細胞由来 cDNA の網羅的な遺伝子発現プロファイル情報を用い、クラスター解析、主成分分析によって、分裂能をもつ前駆細胞を、神経幹細胞と、中間前駆細胞に分類した。これらの情報を元に、神経幹細胞が発生時期に応じて変化させる遺伝子セットを同定した。

### (3) 組織培養と Notch インヒビターの添加

胎生初期 (E10) の脳原基を Notch シグナルインヒビター存在下・非存在下で組織培養し、胎生初期における Notch シグナルと前駆細胞の

種類に関して検討を行った。

#### (4) 発生時期依存的な変化の描出

Notch シグナルに関連する遺伝子セットを抽出し、それらの発現の細胞集団内での分散の程度が発生時期に応じてどのように変化するかを、主成分スコアを用いて E11 から E16 の範囲で評価した。

神経幹細胞が集団としてどのように遺伝子発現を変化させているのかを知るため、E10-E14 の各発生段階の神経幹細胞由来 cDNA に対して、上記(2)で同定した発生時刻依存的な遺伝子セットの発現レベルの変化をリアルタイム PCR により測定し、主成分分析により評価した。

#### (5) 発生時期の異なる前駆細胞の共培養

発生時刻依存的な遺伝子発現の変化に、神経幹細胞に内在する「時計」が関与しているのか否かを、赤色蛍光タンパクでラベルされた E11 脳原基由来細胞と、E14 脳原基由来細胞とを共培養した後、E14 の神経幹細胞に特異的に発現する分子の抗体で免疫染色して検討した。

#### (6) Notch 過剰発現と細胞周期進行の停止が神経幹細胞の性質変化へ与える影響

E10 あるいは E11 の胎生初期マウス胎児脳へ、*in vivo* エレクトロポレーション法を用いて遺伝子導入を行った。具体的には、蛍光蛋白を発現させるプラスミドと共に、活性化型 Notch を過剰発現させるプラスミド、あるいはそれと同時に細胞周期を停止させる遺伝子の cDNA を強制発現させるプラスミドベクター DNA を遺伝子導入した。2-4 日後に組織を固定し、神経幹細胞の増殖や分化に与える変化を免疫染色により検討した。

また、同様に遺伝子導入した別の個体を用い、2-4 日後に蛍光蛋白の発現を指標に遺伝子操作された細胞のみをピックアップし、(1)と同様の手法を用いて単一細胞由来 cDNA を作成した。得られた cDNA を用いて、上記(2)によって同定した、発生時期により

神経幹細胞内での発現レベルが異なる遺伝子のセット (21 遺伝子を抽出して使用) の発現レベルがどのように変化しているかを、リアルタイム PCR を用いて測定し評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 前駆細胞の分類

遺伝子発現パターンから、E11-E16 の前駆細胞集団は、いずれも神経幹細胞と中間前駆細胞の2種類に分類されることが明らかとなった。また胎生初期の神経幹細胞の維持にも Notch シグナルが必要で、それを阻害すると神経幹細胞は中間前駆細胞へと変化することが確認された。

### (2) 神経幹細胞の経時的な遺伝子発現変化

研究を行った E10 から E16 にかけての期間中、全ての神経幹細胞は、発生の進行とともに遺伝子発現パターンを徐々に変化させることを明らかとし、その遺伝子セットを同定することができた。またその変化は、E12 に最も大きかった。このことは、E12 の前後で、神経幹細胞の分裂モード変化・脳室帯の組織構造の変化が起こることと関連している可能性がある。

### (3) 細胞内在性時計の存在

E11 脳原基由来細胞を、E14 脳原基由来細胞と共培養しても E14 型神経幹細胞マーカー分子の発現開始が前倒しとならないことから、神経幹細胞の発生時期に応じた遺伝子発現変化は、少なくとも一部は「細胞内在性の時計」によって制御されていることが示唆された。

### (4) Notch シグナルと細胞周期進行の内在性時計への関与

恒常的に Notch シグナルを活性化させた状態であっても、神経幹細胞における発生時期に応じた遺伝子発現変化は、通常と同様に観察された。また、同様に、Notch シグナルを活性化させつつ細胞周期進行を停止させた場合であっても、神経幹細胞における遺伝子発現変化の進行は通常どおり観察された。このことから、Notch シグナル活性の振動 (オシレーシ

オン) や細胞分裂・細胞周期進行は、共に、神経幹細胞の発生時期に応じた遺伝子発現変化を調整する「内在性時計」の進行には必須でないことが示唆された。

#### (5)Notch シグナルの細胞集団内の分散の程度

神経幹細胞を集団として捉えた場合、個々の細胞内での Notch シグナルの状態の分散の程度が、発生の進行とともに集団として変化していることが明らかとなった。すなわち、胎生初期 E11 では、その分散は大きく、発生の進行とともに小さくなっていく。このことは、胎生初期には神経幹細胞はシグナルの送り手であると同時に受けてでもあり、相互に分化を抑制しあうことで神経幹細胞の未分化性を維持しているが、中期移行になると、神経幹細胞から分化した細胞（中間前駆細胞や幼弱なニューロン）からシグナルを受ける、いわゆる側方抑制のメカニズムを利用するように、神経幹細胞の維持システムが発生進行に伴ってシフトしていることを示唆していた。

#### (6)本研究の成果のまとめ

神経幹細胞の時期依存的な性質の変化は、大きく「分裂パターンの変化」と、「その娘細胞ニューロンの運命の変化」の2つに分けて考えることができる。本研究では、それらにそれぞれ関連しうる遺伝子発現パターンの変化を捉えることができた。また、「娘細胞ニューロンの運命変化」に関連すると思われる遺伝子発現変化は、恒常的 Notch シグナル活性化状態や、それに合わせて細胞周期進行の停止状態であっても、発生時期依存的に進行することが示され、それら以外の細胞内在性時計の存在が示唆された。本研究で得られた成果は学会等で報告しており、現在主要な成果について取りまとめた論文を作成中である。

#### 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 2 件)

- ①Kato TM, Kawaguchi A, Kosodo Y, Niwa H, Matsuzaki F. Lunatic fringe potentiates Notch signaling in the developing brain. *Mol Cell Neurosci*. 査読有 2010、45:12-25.
- ②Miyata M, Ono Y, Okamoto M, Masaoka M, Sakakibara A, Kawaguchi A, Hashimoto M, Ogawa M. Migration, early axonogenesis, and Reelin-dependent layer-forming behavior of early/posterior-born Purkinje cells in the developing mouse lateral cerebellum. *Neural Development* 査読有、2010、5:23 doi: 10.1186/1749-8104-5-23.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 川口綾乃、大脳発生期における神経前駆細胞の単一細胞遺伝子発現プロファイリング、第 35 回日本神経科学大会、2012. 9. 19、名古屋国際会議場、名古屋
- ② 川口綾乃、大脳皮質発生過程における神経前駆細胞の遺伝子発現変化、平成 24 年度 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク、2012. 7. 26、仙台国際センター、仙台
- ③ 川口綾乃、Temporal Change of Gene Expression Pattern in Neural Progenitor Cells during Neocortical Development、第一回国際シンポジウム” Neocortical Organization”、2012. 3. 12、岡崎コンファレンスセンター、岡崎
- ④ 川口綾乃、大脳発生過程における前駆細胞の遺伝子発現の変化、第 34 回日本神経科学大会、2011. 9. 17、パシフィコ横浜、横浜

- ⑤ 川口綾乃, Characterization of the neocortical progenitors during development as revealed by single-cell gene expression profile、新学術領域「動く細胞と秩序」第2回班会議、2010. 12. 18、ロイヤルパークイン名古屋、名古屋

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) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし