

## 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 24 年 4 月 23 日現在

機関番号：11301  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22770206  
 研究課題名（和文） 脳パターン化におけるシグナリングセンターの形成維持メカニズムの解明  
 研究課題名（英文） Mechanisms of formation and maintenance of signaling center during brain patterning  
 研究代表者  
 高橋 将文 (TAKAHASHI MASANORI)  
 東北大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：20361074

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、*Pax6* 遺伝子変異ラット胚の菱脳境界形成過程を詳細に解析し、*Pax6* が境界領域において Notch シグナル関連遺伝子の発現を誘導または維持することで、境界の未分化性維持に寄与している可能性を見いだした。また、ゼブラフィッシュ胚を用いた菱脳境界付近細胞の高解像度タイムラプスイメージング解析により、*EphA4/ephrinB3b* が境界細胞の移動方向および極性を制御することで、正常な境界が確立されることを見いだした。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, I examined the processes of rhombomere-boundary formation in the *Pax6* mutant rat hindbrain. This study suggests that *Pax6* may repress neuronal differentiation through Notch signaling pathway in the rhombomere-boundary cells. I also analyzed cell behavior in the hindbrain of *EphA4/ephrinB3b* double knockdown-zebrafish embryos using high resolution-confocal time-lapse imaging. GFP<sup>+</sup> interface cells at r3/4 boundary abnormally elongated along the A-P axis and then migrated into r4 region, suggesting that *EphA4/ephrinB3b* signaling is required for sharpening rhombomere boundaries via regulation of cell migration and cell polarity.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：(A) 細胞分化

## 1. 研究開始当初の背景

高次の脳機能が正確に発揮されるためには、個々のニューロンが胎児期において決められた場所、決められた時期に産生され、正確な神経回路の構築および動作制御が必要である。我々も含めた脊椎動物において、神経板とい

う初期脳の単純な構造からどのようにして脳細胞の特異性および多様性が生み出されるのだろうか？ その基盤となる脳のパターン化（区画化）のメカニズムの解明は、神経発生学において非常に重要な研究課題である。たとえば、菱脳においては、発生が進むにつれて神経板を構成する神経上皮細胞の動きが制限

され、細胞が混じらないコンパートメント領域が確立する。次に、隣り合うコンパートメント領域間に働く相互シグナルにより、特殊化した境界細胞が生み出される (Kiecker & Lumsden, 2005)。境界領域は脳形成におけるシグナリングセンターとして極めて重要な領域であり、コンパートメント細胞は、境界領域から分泌されるシグナル分子の濃度勾配により形成される異なる位置情報を読み取り、様々な種類のニューロンへ分化する。このように神経上皮細胞には細胞増殖速度が速くニューロンに分化するコンパートメント細胞と、細胞増殖速度が遅く運動性に乏しい境界細胞の2種類が存在する。これまでに、ゼブラフィッシュ胚において Wnt および Notch シグナルが (Cheng et al., 2004; Amoye et al., 2006)、マウス胚において Notch シグナル (Baek et al., 2006) が境界の維持に関与すること報告されてはいるものの、境界領域がどのようにしてコンパートメント領域から分離し、特殊化され維持されているのかについての分子基盤および細胞の挙動については、ほとんどわかっていない。

研究代表者はこれまでに、哺乳類における脳パターン化のメカニズムを解明するために、領域特異的に発現する転写因子や細胞接着分子の役割を解析してきた (Takahashi & Osumi, 2002; Takahashi et al., 2002; Takahashi & Osumi, 2005 & 2008)。その過程で、細胞接着分子 *Cadherin7* や分泌性因子 *Wnt5a* が菱脳境界細胞特異的に発現することを見いだした (研究課題開始時、論文未発表データ)。さらに菱脳腹側領域に発現する転写因子 Pax6 の遺伝子変異ラット胚の境界細胞において、*Wnt5a* の発現が低下し、本来見られないニューロン分化が生じていることを見いだした。これらのことから、境界細胞は本来ニューロンへ分化しないにも関わらず、ニューロン分化能を内在的に有しており、Pax6、WntシグナルやCadherinによる細胞選別機構が、ニューロン分化抑制を含む境界の形成維持に関与している可能性が新たに示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、明瞭なコンパートメント・境界構造を有する菱脳領域に焦点を当て、1) Pax6 を基点とした境界細胞の未分化性維持を司る遺伝子機能の解析、2) タイムラプスイメージング解析による境界細胞の挙動の解

析、3) 境界形成期における神経上皮細胞の細胞周期の解析、の3つの課題を遂行し、脳パターン化におけるシグナリングセンターの形成維持メカニズムを分子・細胞レベルで明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、菱脳境界領域の形成および維持のメカニズムを解明するために、1) 組織化学的手法による Pax6 変異体の表現型の解析、2) ゼブラフィッシュ胚を用いた境界形成過程における細胞挙動のタイムラプスイメージング解析を行った。

## 4. 研究成果

22年度は、Pax6 変異胚における菱脳境界細胞の異常の原因を探るため、まず Pax6 遺伝子の発現様式を境界細胞が形成される以前の発生段階から詳細に解析した。Pax6 の発現は胎齢(E)10.0 では菱脳文節(r)4 では発現は見られず、r3 に強い発現が見られた。E10.5-10.75 になると、その発現レベルは r3 および r5 の領域で高くなり、分節的発現パターンを示した。その後 E11.0 までには、r1 以外のすべての菱脳腹側領域に発現していた。したがって、Pax6 の発現は、ダイナミックに変化し、分節的発現パターンと Pax6 変異胚での境界形成の異常に関連性があると考えられた。一方、E10.75 以降には、Pax6 タンパク質は境界領域およびコンパートメント領域の細胞で検出された。

さらに、Pax6 変異体の表現型の解析をさらに進めた。境界細胞のマーカー遺伝子として、これまでマウスで報告されているマーカー遺伝子 *PLZF(Zbtb16)* および *Ring1A(Ring1)* の発現を E12.5 の Pax6 変異ラット胚で解析した。両遺伝子ともに、Pax6 変異胚菱脳境界領域において、それらの発現が消失していた。このことから、Pax6 変異体では、境界領域そのものは形成されるものの、境界領域の性質は少なくともこの時期において変化していることが明らかとなった。

また Pax6 変異胚菱脳境界領域の異常な神経分化は既に E11.5 で見られ、Tuj1 陽性の細胞は突起を基底膜に伸ばし、その細胞体は、脳室側面に位置していた。このことから、Pax6 変異体菱脳において境界細胞そのものが早期にニューロンに分化してしまうことが明らかとなった。次に異所的なニューロン分化と神

経幹細胞の未分化性維持に関わる Notch シグナルとの関わりについて解析した。Pax6 は神経分化を促進する *Neurogenin2* 遺伝子を直接的に活性化することが、他の脳領域において報告されていたが、Pax6 変異胚菱脳境界領域では、むしろ、*Hes1*, *Hes5* といった神経分化を抑制する遺伝子の発現が減少し、本来この領域で見られない *Neurogenin2* の発現が亢進していた。したがって、Pax6 は菱脳発生の初期過程においては、*Hes1*, *Hes5* の発現の活性化または維持を通じて、境界細胞の未分化性維持に寄与している可能性が考えられた。

また、哺乳類全胚培養についての詳細なビデオプロトコールが *Journal of Visualized Experiments* 誌に掲載された。

23 年度は、これまでの結果と昨年度見いだした Pax6 を基盤とする新しい遺伝子カスケードについての結果を *Mechanism of Development* 誌に報告した。前年度に Pax6 変異体の解析が順調に進行したこと、並びに、研究代表者の長期海外出張に伴い、本年度予定していた哺乳類の全胚培養、展開培養および電気穿孔法を用いた境界形成期の細胞挙動のタイムラプスイメージング解析を下記のように変更した。

菱脳境界の形成には、細胞膜分子 Eph-ephrin シグナルによる反発作用が重要であることが報告されている (Xu et al., 1999)。また Pax6 遺伝子はゼブラフィッシュ胚においても、菱脳境界の形成に関わることが報告されている (Nolte et al., 2006)。個々の遺伝子機能を細胞レベルの変化として理解することは発生生物学において重要な側面であるが、菱脳境界形成における細胞の実際の振る舞いについては、未だ明らかになっていない。そこで、23 年度は、MRC National Institute for Medical Research, London, UK の Division of Developmental Neurobiology, Dr. David Wilkinson の研究室において、胚丸ごと生きたままの状態でのイメージングが可能なゼブラフィッシュを用いた細胞挙動の解析を行った。

これまでの多くの報告では倒立型顕微鏡を用いたイメージング法が一般的であるが、これらの方法では菱脳背側をガラスボトムディッシュの底面に配置させ、上からアガロースでカバーするする必要があり、同時に多くの胚を正しい位置に配置するのは難しい。そこでまず、正立型レーザー顕微鏡 (LSM700, Carl Zeiss, 高感度の検出器ならびに 40x の長作動距

離の水浸対物レンズを搭載) を用いて *in vivo* 多点タイムラプスイメージング法を改良し、より確実な方法を確立した。

再現性良く背腹方向の Z-stack イメージを安定して取得するために、胚固定用ゲルシート (Megason, (*Methods Mol Biol.*, 2009) 0.8% agarose/0.5X Danieau solution) を市販のシリコンリングシート内に固定し、胚の r3-5 領域の背側が表面にくるように bud (受精後 10 hr) stage の胚をゲルの各くぼみに 1 匹ずつ合計 8 匹同時に配置した。次に、0.8% low melting agarose (LMA)/0.5X Danieau solution をゲルの上に注ぎ込み、すばやく胚の方向を揃えた後、室温で 10 分間静止することで胚を LMA で固定した。最後に胚の表面を 0.5X Danieau solution で満たし、24-25°C で一晩インキュベートした。この培養法では胚尾部の成長および伸張が正常の発生とほぼ同様であり、菱脳の分節化において形態学的な異常は見られなかった。

次に、上記の培養条件下で、野生型胚を用いて菱脳形成過程における神経上皮細胞の細胞挙動を解析した。組織全体における細胞の動きを把握するために、1 細胞期において膜移行型 EGFP (GAP-GFP) mRNA を細胞質に導入し、全ての細胞を標識した。包埋方向および蛍光標識を確認し、状態が良い胚について上位から 3 つの胚を選択し、10  $\mu\text{m}$  の光学切片像を 10  $\mu\text{m}$  の間隔をあけて 3 切片分 30 秒間隔で取得した。これにより、境界が形成される過程において、細胞の混じり合いが制限され、ロンボメアが形成されて行く過程を time-lapse movie により世界で初めて捉えることが出来た。また、細胞の選別後に形態的菱脳境界が形成された後も、境界の細胞は分裂を繰り返しており、これまで示唆されてきた境界維持のメカニズムに比べ、形態学的境界がよりダイナミックにリアレンジされていることが明らかとなった。

r3 領域および r3/4 境界が確立されていくメカニズムを細胞レベルで明らかにするために、*pGFP5.3* 胚 (Picker et al., 2002) における GFP 陽性の神経上皮細胞の挙動を解析した。この transgenic fish における EGFP の発現は heterozygote においてはその蛍光強度は低く、homozygote の r3 領域においては、r3/4 の遺伝子発現境界がシャープになり始める 12 hpf より少し以前の 11.5 hpf から EGFP の蛍光が検出できた。*pGFP5.3* 胚における GFP の発現領

域を詳細に解析したところ、境界細胞が特殊化し始める 15-16 hpf の時期において r2 の領域に少数の異所的 GFP 陽性細胞が認められ、r5 での EGFP の発現開始は 15 hpf 以降で検出された。また、r3 における GFP の発現は EphA4 タンパク質の局在パターンと一致していた。これらの観察から、*pGFP5.3* 胚を用いたイメージング解析では、r3 と r4 の境界領域での細胞挙動に注目した。胚の背側から奥に 50  $\mu\text{m}$  の範囲から、2 分間隔で合計 25 枚の 2.0  $\mu\text{m}$  光学切片を取得し、細胞の挙動を Volocity ソフトウェアで解析した。r3 の左右の細胞は、インターカレートしながら反対方向に移動し、中心から離れたやや側方の GFP 陽性 r3/r4 境界の細胞は、短時間の間に r4 側に細胞膜の伸長と退縮を繰り返していた。

次に、ロンボメア境界形成過程における r3 と r4 細胞の間での細胞レベルでの相互作用を明らかにするために、*pGFP5.3* 胚 16 細胞期の片側の 1 細胞に膜移行型 mcherry mRNA を注入し、細胞挙動を解析した。mcherry により標識された右側の r4 細胞は、GFP 陽性の左側 r3 細胞と神経板の中心付近で接触後、速やかに細胞の形態が移動方向に伸長し、その後 r3/r4 境界を作る細胞に寄与した。

最後に、ロンボメア境界形成における EphA4 および ephrinB3b の機能を明らかにするために、EphA4 と ephrinB3b のアンチセンス Morpholino オリゴヌクレオチドを *pGFP5.3* 胚 1-2 細胞期の yolk に注入した。続けて、16 細胞期の片側の 1 細胞に膜移行型 mcherry mRNA を注入し、細胞挙動を 2 分間隔のタイムラプスイメージングにより解析した。GFP 陽性の r3 細胞はインターカレーションが起きる前に、細胞の移動方向を胚の前後軸方向に変え、本来の r4 の領域に侵入していた。さらに、mcherry で標識された r4 の細胞も本来の細胞移動方向と異なり、胚の前後方向に変化していた。これらの結果から、シャープなロンボメア境界が形成されるためには、EphA4 発現細胞と ephrinB3b 発現細胞が神経板側方で接触することで、両細胞間で反発シグナルが生じると考えられた。さらに、EphA4-ephrinB3b シグナルは細胞の極性および将来境界を作る細胞の形態変化を正確に制御することで、細胞系譜が制限された境界形成に寄与している可能性が示唆された。

本研究期間では、Pax6 と Eph/ephrin シグナルの関係については解析することができな

かったが、本研究で確立したライブイメージング法と Morpholino による機能阻害を組み合わせることで、今後 Pax6 遺伝子による菱脳境界形成の細胞レベルでの制御機構について明らかにできると考えられる。

#### 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 3 件)

1. Tsunekawa, Y. Brutto, JM, Takahashi, M. Polleux, F. Tan, SS. Osumi, N. Cyclin D2 in the basal process of neural progenitors is linked to non-equivalent cell fates. EMBO J. Mar 6 (Epub ahead of print), 2012. 査読有
2. Takahashi, M. and Osumi, N. Pax6 regulates rhombomere boundary cell specification in the rat hindbrain. Mech. Dev.128, 289-302, 2011. 査読有
3. Takahashi, M. and Osumi, N. The method of rodent whole embryo culture using the rotator-type bottle culture system. J. Vis. Exp. 42, 2170, 2010. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. Takahashi, M. and Osumi, N. Pax6 regulates boundary cell specification in the rat hindbrain. The 1st Tohoku International Symposium on Multidisciplinary Neuroscience. 2011, January 21, Sendai, Japan
2. Takahashi, M. and Osumi, N. Pax6 is involved in specification of rhombomere boundary cells in the rat hindbrain. 3rd International Congress on Stem Cells and tissue Formation. 2010, July 13, Dresden, Germany

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 将文 (TAKAHASHI MASANORI)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：20361074

### (2) 研究分担者

なし  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし  
研究者番号：