

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500390

研究課題名(和文) 脳形態形成時における層特異性・領域特異性制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms underlying the layer- and region-specificity during brain development

研究代表者

大塚 俊之(OHTSUKA, TOSHIYUKI)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：20324709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質発生過程の神経幹細胞において各発生段階および脳領域特異的に発現する遺伝子の解析を行った。ニューロン分化への関与が示唆されたHbp1の機能解析を進め、Hbp1コンディショナルノックアウトマウスにおいて脳の形態異常、特に脳室の拡大と大脳皮質各層の菲薄化を認めた。Tet-On systemを用いてHes1の発現を操作するトランスジェニックマウスにおいては、Hes1の高発現により神経幹細胞の未分化性が維持され、胎生期および生後・成体脳において幹細胞プールの増大を認めたほか、大脳皮質領域におけるTbr2陽性の神経前駆細胞の減少と皮質浅層の菲薄化、および浅層ニューロン産生の遷延が認められた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the stage- and region-specific gene expression in neural stem cells during cortical development. We performed the functional analysis of Hbp1 that is highly expressed during the neurogenic stages, and found the abnormal brain morphogenesis including enlarged ventricles and thinner cortex in the Hbp1 conditional knockout mice. In the transgenic mice in which Hes1 expression is controlled by the Tet-On system, persistent high expression of Hes1 led to the maintenance of neural stem cells and the expansion of neural stem cell pool in embryonic, postnatal and adult brains. The number of Tbr2-positive intermediate progenitor cells was decreased in the cortical region, and it was found that the superficial layer is thinner and the generation of superficial layer neurons was decelerated and prolonged.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：脳形態形成 神経幹細胞 神経発生

1. 研究開始当初の背景

脳の発生過程においては、神経幹細胞が経時的にその形態および性質を変化させることで、多種多様なニューロン・グリアを産生している。発生初期には神経幹細胞が対称分裂を繰り返し幹細胞プールを増大させた後、厳密に制御されたタイミングで皮質深層のニューロン、続いて皮質浅層のニューロンが産生され、ニューロン産生期が終わるとグリア細胞が産生される。この神経幹細胞の性質変化のタイミングは、脳のサイズと細胞構築に極めて重要である。また大脳新皮質の各層・各脳領域は特異的な機能を持つニューロンで構成されており、こうした神経幹細胞の経時的性質変化・領域による性質の違いにより様々な異なる細胞が産み出されることが細胞の多様性・機能の多様性の源となり、脳の複雑な形態と高次機能の基盤となっている。

神経再生医療においては、神経損傷部位の修復に必要な任意の特異的ニューロン・グリアを産生する手法の確立が課題である。神経幹細胞あるいはES細胞・iPS細胞からの神経分化誘導過程において、発生段階特異的あるいは脳領域特異的な神経幹細胞の創出と増殖が可能になれば、そこから任意の<層特異的>あるいは<領域特異的>ニューロン・グリア産生が可能となり、再生移植医療において重要な発展に繋がる。

こうした神経幹細胞の性質の経時的変化・空間的差異としては、分子レベルで一部明らかになっているものの、これまで神経幹細胞の選択的回収が困難であり、各発生段階および脳領域特異的に発現する遺伝子発現を網羅的に解析することは困難であった。我々が報告した胎生期の神経幹細胞を可視化する手法の確立により、神経幹細胞の選択的回収と遺伝子発現の網羅的解析が可能になり、層特異的・領域特異的ニューロンへの分化を効率的に誘導する因子の同定およびそのメカニズムの解明が進むことが期待される。

2. 研究の目的

神経幹細胞の経時的な性質変化および脳領域特異的な性質の違いと分化メカニズムを理解することができれば、その遺伝子発現を操作することにより<層特異的>あるいは<領域特異的>ニューロン・グリア産生が可能になると考えられる。

本研究では、神経幹細胞を可視化したトランスジェニックマウスの終脳から回収した異なる発生段階および異なる領域の神経幹細胞を用いて、Gene Expression Profilingにより遺伝子発現の網羅的解析を行ったデータを基に、各発生段階および領域特異的に発現する遺伝子を探索し、脳の発生過程における神経幹細胞の性質の変化と、それに伴う

層特異性・領域特異性の形成に関わる分子メカニズムの解明を目的とする。神経幹細胞増殖期、皮質深層のニューロン産生期と浅層のニューロン産生期の神経幹細胞における遺伝子発現の比較により、層特異性を規定する遺伝子を探索する。また、胎児脳の各領域から回収した神経幹細胞における遺伝子発現を比較することにより、領域特異性を規定する遺伝子を探索する。更に遺伝子改変マウスの作製等により、各種遺伝子発現を制御することにより、脳の形態形成および神経回路形成に与える影響を検討し、脳のハードウェア形成の分子メカニズムを解明する。

層特異的・領域特異的ニューロン・グリアへの分化を規定・誘導する因子とメカニズムが解明されれば、再生移植医療への応用に向け、神経幹細胞あるいはES細胞・iPS細胞からの神経分化誘導過程において遺伝子発現を操作することにより、任意の特異的ニューロン・グリアを産生する手法の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、胎生期の神経幹細胞をHes1プロモーター:d2EGFPにより可視化したトランスジェニックマウスの終脳から、異なる発生段階(幹細胞増殖期、深層ニューロン産生期、浅層ニューロン産生期、グリア産生期)および異なる脳領域のGFP陽性幹細胞をFACSにより回収し、マイクロアレイを用いたGene Expression Profilingを行い、各発生段階および領域特異的な遺伝子発現を網羅的に探索したデータを基に、層特異性および領域特異性を規定する遺伝子を探索する。

まず特定の発生段階あるいは脳領域に特異的に発現し、層特異性および領域特異性を規定する可能性のある遺伝子を候補とし、その発現パターンの解析により、深層ニューロン・浅層ニューロンへの特異化、脳の領域特異性の形成への関与が示唆される遺伝子の候補を絞り機能解析を行う。候補遺伝子の発現操作(強制発現・ノックダウン等)、細胞移植実験、遺伝子改変マウス作製等のin vivoでの解析により、層特異的・領域特異的遺伝子の発現変化が、脳の形態形成(層形成・領域形成)および神経回路形成に与える影響を検討する。

また再生医療への応用に向け、神経幹細胞あるいはES細胞・iPS細胞からの神経分化誘導過程において、遺伝子発現を操作することにより任意の<層特異的>あるいは<領域特異的>ニューロン・グリアを産生する手法の開発に取り組む。

4. 研究成果

胎生期の神経幹細胞をHes1プロモーター:d2EGFPにより可視化したトランスジェ

ニックマウスの終脳から、異なる発生段階および異なる脳領域の GFP 陽性神経幹細胞を FACS により回収し、マイクロアレイを用いた Gene Expression Profiling を行った結果から、各発生段階特異的に発現する転写因子を候補として機能解析を進めた。その中で、Tcf3 と Klf15 がそれぞれ発生初期および後期において神経幹細胞を維持する働きがあり、Klf15 はニューロン分化能を保持した神経幹細胞の維持に重要であることを明らかにし報告した (Stem Cells, 2011 Nov;29(11):1817-28)。

更に、各発生段階および脳領域特異的に発現し、層特異性および領域特異性を規定する可能性のある遺伝子の探索を進めた。その中で、ニューロン産生期に高い発現を示し、神経幹細胞からニューロンへの分化過程における関与が示唆された Hbp1 の機能解析 (強制発現・ノックダウン等) を進めた。Hbp1 コンディショナルノックアウトマウスを作製して解析した結果、脳の形態異常、特に脳室の拡大と大脳皮質各層の菲薄化を認めた。発生初期における神経幹細胞の対称分裂の増加を示唆する所見が得られており、細胞周期と分化タイミングの制御との関連につき解析を進めている。

また、Tet-On system を用いて Hes1 の発現を操作するトランスジェニックマウスを作製した。このマウスでは、Hes1 の高発現により神経幹細胞の未分化性が維持されており、胎生期および生後・成体脳において幹細胞プールの増大を認め、脳室および脳室周囲帯の拡大と、ニューロンの存在する皮質板の菲薄化が認められた。また大脳皮質領域において、より遅い時期までニューロン産生が続く、浅層ニューロン産生の遷延が認められた。胎生期において Tbr2 陽性の intermediate progenitor が減少しており、皮質深層に比べ皮質浅層の菲薄化が認められた。また、脳室周囲帯の外側で分裂する Pax6 陽性細胞の増加を認め、哺乳動物の進化の過程で発達した outer subventricular zone で増殖する outer radial glia 類似の population と考えられた。

更に再生医療への応用に向け、ヒト iPS 細胞からの神経分化誘導過程の解析を行った。多能性幹細胞から神経幹細胞へと遷移する過程において、多能性幹細胞のマーカーである Oct3/4 遺伝子の発現減少に伴い、HES 遺伝子の発現上昇を認めた。現在 HES 遺伝子の発現を神経幹細胞のマーカーとして用いて神経幹細胞を選択的に回収・純化する手法の開発および HES 遺伝子の発現制御による神経幹細胞の維持・増殖、他の遺伝子の発現制御との組み合わせによる任意のニューロン・グリア産生手法の検討を進めている。

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 11 件)

今吉格、下條博美、坂本雅行、大塚俊之、影山龍一郎、哺乳動物の神経発生におけるノッチシグナルの遺伝子改変による可視化、Cell. Mol. Life Sci. 70(12): 2045-2057, 2013、査読有、doi: 10.1007/s00018-012-1151-x.

Siok-Lay Tan、大塚俊之、Aitor González、影山龍一郎、発生過程の脳において microRNA9 は Hes1 発現動態を調節することにより神経幹細胞の分化を制御する、Genes Cells 17(12): 952-961, 2012、査読有、doi: 10.1111/gtc.12009.

Siok-Lay Tan、西美幸、大塚俊之、他 6 名、ヒストンメチルトランスフェラーゼ ESET は発生過程における神経前駆細胞のエピジェネティックな制御に必須である、Development 139(20): 3806-3816, 2012、査読有、<http://dev.biologists.org/content/139/20/3806.long>

大塚俊之、下條博美、松永充博、他 5 名、大脳皮質発生過程における神経幹細胞の遺伝子発現プロファイリング及び神経分化制御因子の同定、Stem Cells 29(11): 1817-1828, 2011、査読有、doi: 10.1002/stem.731.

坂本雅行、今吉格、大塚俊之、他 3 名、成体脳における持続的なニューロン新生は生得的嗅覚反応に必須である、Proc. Natl. Acad. Sci. 108(20): 8479-8484, 2011、査読有、doi: 10.1073/pnas.1018782108.

〔学会発表〕(計 3 件)

下條博美、播磨有希子、前田勇樹、大塚俊之、他 2 名、神経発生過程における遺伝子発現ダイナミクスによる神経分化制御機構の解明、第 36 回日本分子生物学会、神戸、2013 年 12 月 13 日

大塚俊之、影山龍一郎、Hes1 強制発現による大脳皮質ニューロン産生遅延および生後脳における神経幹細胞の増加、第 5 回国際幹細胞学会、エルサレム、イスラエル、2013 年 10 月 8 日

大塚俊之、他 6 名、神経幹細胞における遺伝子発現プロファイリングおよび大脳皮質形成過程における神経分化制御因子の同定、第 34 回日本分子生物学会、横浜、2011 年 12 月 13 日

〔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

大塚 俊之 (TOSHIYUKI OHTSUKA)
京都大学・ウイルス研究所・准教授
研究者番号：20324709

(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：