

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24113006

研究課題名(和文) シリア・中心体系による神経幹細胞分裂の非対称化機構

研究課題名(英文) Regulation of neural stem cell asymmetric division by the cilia-centrosome system

研究代表者

松崎 文雄 (MATSUZAKI, Fumio)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・チームリーダー

研究者番号：10173824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 120,100,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の脳は進化の過程で複雑化と巨大化を遂げてきたが、脳の大きさを決める仕組みはいまだに不明である。小頭症というヒトの遺伝病の多くは中心体成分の変異が原因であることが判明している。マウスの騒動遺伝子変異は大きな表現型は示さないことがなぞとされてきた。本研究では小頭症の原因遺伝子のひとつASPMをとりあげ、その原因を追求した。マウスのASPM変異にLGN遺伝子変異を導入した2重変異体はヒト同様に脳のサイズが大きく減少することを見出した。LGN変異は幹細胞の分裂方向をランダムにすることにより、霊長類様の移動幹細胞を生み出すことから、哺乳類の小頭症の原因は移動幹細胞に原因のあることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A hallmark in the human brain development is the formation of a new germinal zone, outer subventricular zone (OSVZ) during neurogenesis, in addition to the common germinal zone (VZ). The OSVZ expands the population of neural progenitors extensively undergoing proliferative and neurogenic divisions to generate a massive amount of neurons. Thus, the formation of the OSVZ, which is absent in rodents, highly contributes to brain expansion in gyrencephalic mammals such as primates. We have attempted to make double mutants of mouse recessive autosomal primary microcephaly (MCPH) genes and the LGN gene. Its defect randomizes spindle orientations, consequently generating scattered progenitors just like those in the OSVZ. Here we show that a double mutant for a MCPH gene, *Aspm*, and LGN exhibits a dramatic reduction in the brain size. We will discuss the detailed phenotype of the double mutant.

研究分野：発生生物学

キーワード：gyrencephaly microcephaly neural stem cell cell death

### 1. 研究開始当初の背景

脳の発生は単純な一層の上皮細胞からなる神経管から出発し、神経幹細胞は対称分裂によって幹細胞の数を増やしてゆくが、その後、より幹細胞自身と分化した神経前駆細胞を作り出す非対称な細胞分裂を繰り返す。脳のサイズ等の基本構築は神経幹細胞の対称分裂と非対称分裂の制御に依存している。

#### 非対称分裂モード

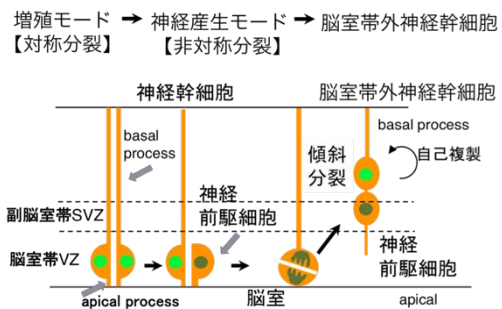
脊椎動物の神経幹細胞は、radial glia と呼ばれ、増殖期の脳室面 (apical 面) に水平な対称分裂から、神経産生期には、分裂面が回転し、apical-basal 軸方向と一致した分裂により、脳室側 (apical) の幹細胞と basal 側の神経細胞が生まれると考えられてきた。我々は、分裂方向制御因子の変異マウスにおける発生期マウス神経幹細胞の振舞いを脳スライス培養系を用いて詳細に解析した結果、神経発生期の神経幹細胞は、ショウジョウバエモデルと異なり、分裂面を回転させるのではなく、多少の揺らぎはあるものの、脳室面に対してほぼ水平に分裂することで (分裂面はほぼ垂直)、上皮性を保持した神経幹細胞 (radial glia) と basal 側のプロセスを失った神経前駆細胞 (あるいは神経細胞) を生むことを明らかにした (Konno *et al. Nat Cell Biol* 2008, 図1参照)。この結果は、神経産生期の幹細胞では、細胞極性と分裂軸の一致による非対称分裂という古典的なモデルが成り立たないことを示しており、実験事実に基づいた新たなモデルの確立が必要とされる。

#### 分裂モードの遷移

分裂方向が乱れる変異マウス (LGN 遺伝子変異) の作成とその解析から、神経幹細胞が apical-basal 軸方向へ分裂すると (典型的な非対称分裂モード)、basal process のみを保持し、脳室帯の外で非対称分裂を行う幹細胞を生じることを見出した (脳室帯外神経幹細胞、図1)。さらに、このような神経幹細胞は野生型マウスにも少数ながら存在することが判明した。これらの結果は、神経幹細胞には、増殖モードから神経産生モードへの転移に引き続き、第2の相転移が存在し、分裂方向が水平方向から大きく外れることにより、上皮構造を持った神経幹細胞から apical process を失った脳室帯外神経幹細胞が形成

されること示している (Shitamukai *et al. J Neurosci* 2011)。脳室帯外神経幹細胞 (outer subventricular zone (OSVZ) progenitor) は、霊長類やフェレットなどの“より複雑な脳”の発生過程では主要な幹細胞集団であることが知られており (図2)、脳室帯外神経幹細胞を多数生じる LGN 変異マウスは霊長類型の

図1. 神経幹細胞の遷移



脳発生と脳室帯外神経幹細胞を研究するためのよいモデル系となると考えられる (Shitamukai *et al. J Neurosci* 2011)。

### 2. 研究の目的

本研究では以下の問題を追及する。

#### 分裂モードの遷移メカニズムにおける中心体/シリア関連因子の果たす役割

大脳が正常の半分程度のサイズまでしか発達しないヒト遺伝性小頭症の原因遺伝子群の産物はいずれも分裂時に神経幹細胞の中心体に局在することから、中心体機能を通して、未分化性の維持に關与する可能性が指摘されている。これらの変異はマウスの脳の発生には大きな影響を与えないが、これらの遺伝子変異がマウスに少数しか存在しない脳室帯外神経幹細胞 (霊長類型) により強い影響を与えるとすると、この現象を説明できる。そこで、脳室帯外神経幹細胞の形成における遺伝性小頭症の原因となる中心体局在因子の役割を解析する。

### 3. 研究の方法

小頭症原因遺伝子 ASPM 変異マウス脳に

においても、LGN の不活化や *Inscuteable* の発現を行い、幹細胞の分裂方向のランダム化 (H24 の実験の逆の組合せ) による脳室帯外神経幹細胞の形成に対する影響を解析する。さらに ASPM / LGN 2 重変異体を解析することにより、ASPM と LGN の遺伝的相互作用を検証する。また、他の小頭症原因遺伝子にも解析を広げる。これらの結果を総合し、radial glia から脳室帯外幹細胞への遷移に関して、中心体に局在する小頭症原因遺伝子産物の役割を明らかにする。また、脳室帯外神経幹細胞を正常な状態で豊富に産生するフェレットを用いて、モデルマウスで得られた解析結果を検証する。フェレットの実験系はすでに確立済みである。

#### 4 . 研究成果

小頭症原因遺伝子の変異マウスと分裂軸に異常をきたす LGN 変異を掛け合わせることでできる 2 重変異体では、細胞死が劇的に増加することを見出した。ヒトに比べ、マウスの小頭症原因遺伝子変異は表現型が弱いことが知られていた。マウスとヒトの脳発生の大きな違いのひとつは、霊長類や肉食類の脳発生途上には形成される新しい幹細胞層 (外脳室帯) がマウスでは形成されないことであった。LGN 変異により脳室外に幹細胞が分散することから、この 2 重変異では、霊長類などの複雑脳における小頭症原因遺伝子変異による小頭症発症のメカニズムを再現していることが考えられる。従って、この 2 重変異体はマウスにおける小頭症の研究の良いモデルとなる可能性を示唆している。実際に小頭症原因遺伝子の一つ ASPM (Abnormal Spindle-like microcephaly) の変異と LGN 変異の 2 重変異体は生存可能であるが、ASPM 単独変異に比べて大きく減少していた。脳のサイズは野生型や LGN の変異体の 70% ほどであった。また、複雑脳をもつフェレットで、in utero electroporation を用いて、CRISPR/Cas9 システムを直接胎児脳に導入し ASPM KO クローンを作成すると、幹細胞のクローンサイズが減少していることが観察された。マウスの 2 重変異をさらに詳しく調べると、DNA damage check point が活性化され、細胞死も著しく増加していた。この原因として、(1) LGN と ASPM がともに中心体付近

に局在することから互いに相互作用があり、その障害が移動幹細胞でより大きい可能性、(2) LGN 変異の効果により幹細胞が脳室外に移動を行うため、その移動過程あるいは移動した幹細胞の分裂に ASPM 変異が特に影響を与える可能性がある。現在詳細な細胞レベルの解析を行い分子機構を明らかにするを試みを行っている。

#### 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 10 件)

1. Inoue M, Iwai R, Tabata H, Konno D, Komabayashi-Suzuki M, Watanabe C, Iwanari H, Mochizuki Y, Hamakubo T, Matsuzaki F, Nagata KI, Mizutani KI. Prdm16 is crucial for progression of the multipolar phase during neural differentiation of the developing neocortex. **Development**. 144(3):385-399. (2017). 査読有
2. Delaunay D, Kawaguchi A, Dehay C, Matsuzaki F. Division modes and physical asymmetry in cerebral cortex progenitors. **Curr Opin Neurobiol**. 42:75-83. doi: 10.1016/j.conb.2016.11.009. Epub 2016 Dec 12. (2016). 査読有
3. Suzuki K#, Tsunekawa Y#, Hernandez-Benitez R#, Wu J #, ..., Matsuzaki F, et al. In vivo genome editing via CRISPR-Cas9 mediated homology-independent targeted integration. **Nature**. 540(7631):144-149. #equal contribution. (2016). 査読有
4. Tsunekawa Y#, Terhune RK#, Fujita I, Shitamukai A, Suetsugu T, Matsuzaki F. Developing a de novo targeted knock-in method based on in utero electroporation into the mammalian brain. **Development**. 143(17):3216-22. doi: 10.1242/dev.136325. #equal contribution. (2016). 査読有
5. Okamoto M, Miyata T, Konno D, Ueda HR, Kasukawa T, Hashimoto M, Matsuzaki F\*, and Kawaguchi A\*. Cell cycle-independent transitions in temporal identity of mammalian neural progenitor cells. **Nat Commun**. 7:11349. doi: 10.1038/ncomms11349. \*corresponding authors. (2016). 査読有
6. Matsuzaki F, Shitamukai A. Cell division modes and cleavage planes of neural progenitors during mammalian cortical development. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 7(9):a015719. (2015) 査読有
7. Klotz L, Norman S, Vieira JM, Masters M, Rohling M, Dubé KN, Bollini S, Matsuzaki F, Carr CA, Riley PR. Cardiac lymphatics are heterogeneous in origin and respond to injury. **Nature**. 522(7554):62-7. (2015). 査読有
8. Mora-Bermúdez F, Matsuzaki F, Huttner WB. Specific polar subpopulations of astral microtubules control spindle orientation and symmetric neural stem cell division. **Elife**. 3. doi: 10.7554/eLife.02875. (2014). 査読有

9. Pilz GA, Shitamukai A, Reillo I, Pacary E, Schwausch J, Stahl R, Ninkovic J, Snippert HJ, Clevers H, Godinho L, Guillemot F, Borrell V, Matsuzaki F\*, Götz M\*. Amplification of progenitors in the mammalian telencephalon includes a new radial glial cell type. **Nat Commun.** 4:2125. doi: 10.1038/ncomms3125. (2013). \* co-corresponding
10. Konno D, Iwashita M, Satoh Y, Momiyama A, Abe T, Kiyonari H, and Matsuzaki F. The mammalian DM domain transcription factor Dmrt2 is required for early embryonic development of the cerebral cortex. **PLoS One.** 7(10):e46577. doi: 10.1371 (2012). 査読有

〔学会発表〕(計 10件)

1. Aug 20-24 2017. Fumio Matsuzaki: Cortical expansion in the development of complex mammalian brains. Meeting of the International Society for Neurochemistry and the European. Paris, France
2. May 17-20 2017. F. Kusumoto, F. Ikumi, A. Shitamukai, D. Konno and F. Matsuzaki\*: Regenerative plasticity of epithelial structure in mouse radial glia during the early development. Cortical Development Conference 2017 “Neural stem cells to neural circuits”. Crete, Greece. \*speaker.
3. July 24-30 2016.7. Matsuzaki F: Cortical expansion during the development of mammalian complex brains. Volga Neuroscience Meeting 2016, St. Petersburg Russia.
4. May 11-14 2016. M.Okamoto, T Miyata, D.Konno, H.R.Ueda, T.Kasukawa, M.Hashimoto, F.Matsuzaki\*, A.Kawaguchi: Temporal identity of mammalian neural progenitor cells. Symposium of cellular diversity. 21st Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience. Juan les Pins, France. \*speaker.
5. Dec 1-4 2015. Fumio Matsuzaki: Cortical expansion during the development of mammalian complex brains Joint annual meeting of the Biochemical Society and Molecular Biology Society, 2015 Kobe, Japan. Symposium organizer
6. Oct 11-15 2014. Fumio Matsuzaki: A feedback mechanism from neurons to progenitors regulates cortical layer proportion. Conference Jacques Monod 2014 “Cell cycle: bridging scales in cell division”, Roscoff, FRANCE (HOTEL LE GULF STREAM).
7. May 22-25 2014. Fumio Matsuzaki: A feedback mechanism from neurons to progenitors regulates cortical layer proportion. Cortical Development Conference 2014. Crete, Greece (MAICH)
8. Nov 25-27 2014. Fumio Matsuzaki, Atsunori Shitamukai, Daijiro Konno, Tomomi Shimogori, Shinji Takada: A feedback mechanism from neurons to progenitors regulates cortical layer proportion 37th Annual meeting of Japanese Society of Molecular Biology Yokohama, Japan. Symposium organizer
9. June 6-10 2014. Fumio Matsuzaki: A feedback mechanism from neurons to progenitors regulate cortical layer proportion. Workshop for the 2014 American Society of Cell Biology meeting, Philadelphia, USA (Pennsylvania Convention Center)
10. Dec 15-16 2014. Fumio Matsuzaki: “Single-cell analysis of temporal identity progress in mammalian neural progenitors” 2<sup>nd</sup> UK-JAPAN Workshop on Neural Epigenetics: Epigenetics and transcription in the brain: towards single cell analysis. London, UK (University College London).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cdb.riken.jp/research/laboratory/matsuzaki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 文雄 (MATSUZAKI Fumio)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・チームリーダー

研究者番号：10173824

(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：

(4) 研究協力者

なし( )