

令和元年6月14日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04268

研究課題名(和文) 小脳神経細胞の個性獲得および分化の制御機構

研究課題名(英文) Neuronal specification and differentiation 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) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はいくつかの癌を引き起こすことが知られているMeis1遺伝子が発達途上の小脳顆粒細胞とその前駆細胞で発現することを見出した。この遺伝子を破壊したノックアウトマウスでは、小脳が小さくなり、その内部構造が乱れてしまう。さらにMEIS1タンパク質がPax6遺伝子の発現を誘導すること、誘導されたPAX6がBMPシグナルを促進すること、そしてBMPシグナルがATOH1の分解を引き起こし、その結果として前駆細胞から顆粒細胞への分化を促進することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の知見により、これまで個別に明らかにされてきた小脳顆粒細胞の発生の分子機構を、MEIS1というハブによって統合的に理解することが可能となった。これは小脳にとどまらず、様々な脳部位での神経前駆細胞から神経細胞が生み出されるしくみの理解につながると考えられる。また、MEIS1は一部の髄芽腫において異常に強く発現しており、髄芽腫の発症に関与している可能性も考えられるために、今回の研究成果は広く今後の小脳癌研究の発展に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cerebellar granule cell precursors (GCPs) and granule cells (GCs) represent good models to study neuronal development. We found that Meis1 is expressed in granule cell lineage cells and astrocytes in the cerebellum during development. Targeted disruption of the Meis1 gene specifically in the GC lineage resulted in smaller cerebella with disorganized lobules. Knockdown/knockout experiments for Meis1 as well as in vitro assays show that Meis1 binds to an upstream sequence of Pax6 to enhance its transcription in GCPs/GCs. Furthermore, we found that the Meis1-Pax6 pathway increases the expression of Smad proteins to upregulate BMP signaling, leading to degradation of Atoh1 in the inner EGL, which contributes to differentiation from GCPs to GCs. Thus, this work reveals multiple functions of Meis1 in GC development and gives insights into the general understanding of the molecular machinery underlying neural differentiation from neural progenitors.

研究分野：神経科学

キーワード：小脳 転写因子 発生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経前駆細胞は発生途上において適切な回数だけ分裂し、適切な数の神経細胞を生み出す。この過程がうまくいかないと、巨脳症・小脳症になったり、あるいは脳腫瘍を引き起こされたりする。このように、神経前駆細胞の分裂と神経細胞への分化は厳密に制御されているが、その分子機構については未だに不明な点が多い。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)は胎生期において菱脳唇から発生し、胎生後期から生後初期において External Granule cell Layer(EGL)という2層からなる層構造を形成する。GCPsはEGLの上層(outer EGL)で増殖を繰り返し、その後、細胞周期を停止し神経細胞である顆粒細胞(Granule cells, GCs)に分化すると下層(inner EGL)に移動する。最終的に、GCsはさらに内顆粒層(IGL)へと移動し神経回路に組み込まれる。本研究課題では、小脳顆粒細胞系(GCP-GC系)をモデルとして、神経前駆細胞の増殖と分化についての研究を行うこととした。

2. 研究の目的

GCPの増殖性と未分化性の維持(つまり神経前駆細胞としての形質の維持)のためには、転写因子 ATOH1 が関与することが知られている。そこで、ATOH1と相互作用するタンパク質を探索し、その機能を調べることによってGCPの増殖性・未分化性の維持とGCへの分化の制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ATOH1-GST融合タンパク質を固相化したアフィニティカラムおよびプロテオミクス技術を用いて、ラット脳抽出液からATOH1結合分子を抽出する。次に、それらの分子の遺伝子・タンパク質発現がGCPsで認められるものでスクリーニングする。

(2) その中で興味深い遺伝子を決め、in vivo エレクトロポレーション法を用いてノックダウン(KD)ベクターを発生途上の小脳GCPsへと遺伝子導入し、その影響を調べる。

(3) そのノックアウトマウスを手に入れて、その表現型を解析する。

(4) MEIS1の下流で働く遺伝子を同定し、さらにATOH1のタンパク質分解とその分子との関連についても調べる。

4. 研究成果

(1)アフィニティカラム精製とプロテオミクス解析からATOH1結合候補分子が多数同定された。その中に白血病などの癌発症に関わることが知られている転写因子MEIS1が見つかった。免疫沈降実験、in vitro 結合実験により、ATOH1およびMEIS1が小脳で結合していることが確かめられた。免疫染色により、MEIS1は発生途上の小脳のすべてのGCPsおよびGCsで発現していることが明らかになった。

(2) Meis1遺伝子に対するKDベクターをin vivo エレクトロポレーション法によって発生途上小脳のGCPsへと遺伝子導入したところ、(a)GCPsの細胞周期からの離脱の遅延、(b)GCPsの異常な小脳内側(inner EGL, ML)への落ち込み、(c)ATOH1の発現領域の小脳内側(inner EGL, ML)への拡大、(d)GCの軸索である平行線維の形態異常が観察された。このことから、MEIS1がATOH1の発現を抑制し、GCPsの細胞周期からの離脱とGCsへの分化を促進すること、GCsの神経突起形態形成に必要であることが明らかになった。

(3) Meis1遺伝子の顆粒細胞系(GCPs, GCs)特異的なノックアウトマウスを、Atoh1-Creマウス系統との交配で作成したところ、上記(2)の表現型他に、(a)小脳の縮小、(b)小葉構造の破綻、が観察された(図1)。このことから、Meis1の顆粒細胞系での遺伝子発現が小脳形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

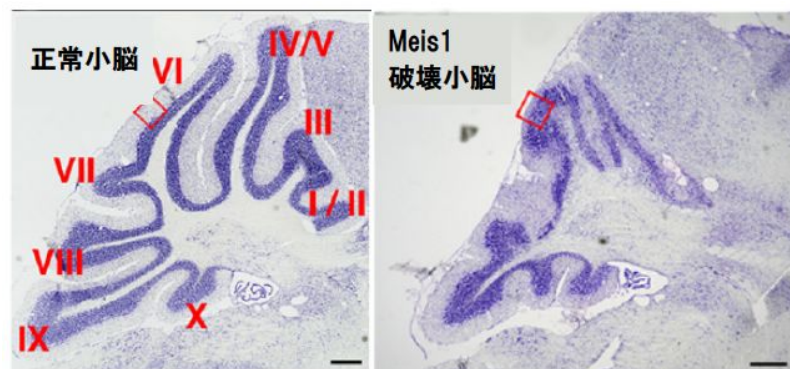


図1 (左) 正常なマウス小脳、(右) Meis1を破壊したマウスの小脳
ローマ数字(I-X)は小葉(小脳のひだ)番号

(4) 転写因子 MEIS1 が Pax6 遺伝子に結合し、その遺伝子発現を直接上昇させることを見出した (図2)。

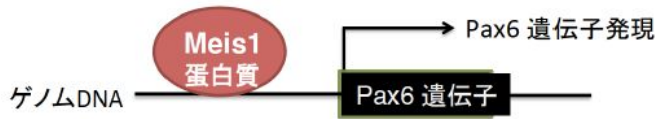


図2 Meis1 蛋白質は Pax6 遺伝子の発現調節領域に結合し、Pax6 の遺伝子発現を誘導する。

さらに転写因子である PAX6 タンパク質が SMAD1 の発現を上昇させることによって、GCPs における BMP シグナルを活性化させること、その活性化された BMP シグナルが ATOH1 タンパク質の分解に働くことを見出した。つまり、MEIS1-PAX6-BMP シグナル系によって ATOH1 の分解が促進され、それによって MEIS1 が GCPs から GCs への分化を促進していることが明らかになった (図3)。

以上から、転写因子 MEIS1 が顆粒細胞系の細胞で働き、ATOH1 の分解を制御することによって神経前駆細胞の増殖を抑制し適切なタイミングで神経細胞へと分化させること、さらに神経細胞の神経突起形態形成をにも関与することが明らかになったといえる (図3)。

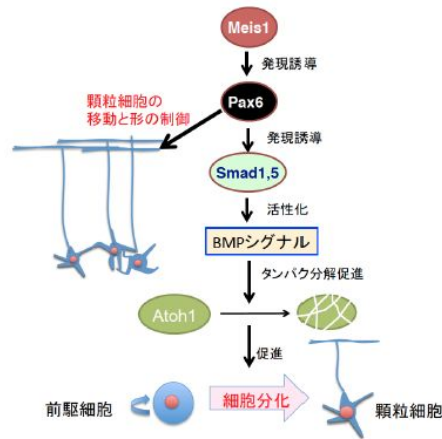


図3 顆粒細胞の分化と成熟を支配する遺伝子経路

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

- Owa T, Taya S, Miyashita S, Yamashita M, Adachi T, Yamada K, Yokoyama M, Aida S, Nishioka T, Inoue YU, Goitsuka R, Nakamura T, Inoue T, Kaibuchi K, Hoshino M: Meis1 Coordinates Cerebellar Granule Cell Development by Regulating Pax6 Transcription, BMP Signaling and Atoh1 Degradation. *J Neurosci*, 38 (5): 1277-1294, 2018
- Miyashita S, Adachi T, Yamashita M, Sota T, Hoshino M: Dynamics of the cell division orientation of granule cell precursors during cerebellar development. *Mech Dev*, 147 : 1-7, 2017
- Fujiyama T, Miyashita S, Tsuneoka Y, Kanemaru K, Kakizaki M, Kanno S, Ishikawa Y, Yamashita M, Owa T, Nagaoka M, Kawaguchi Y, Yanagawa Y, Magnuson MA, Muratani M, Shibuya A, Nabeshima Y, Yanagisawa M, Funato H, Hoshino M: Forebrain Ptf1a is required for sexual differentiation of the brain. *Cell reports*. 24 (1): 79-94, Jul 2018

[学会発表](計 65 件)

- 星野幹雄: 小脳神経細胞の発生プログラム. 2016年度 第7回小脳研究会 学術集会・総会, 東京都千代田区(アルカディア市ヶ谷), 1.20, 2017
- Owa T, Taya S, Miyashita S, Nishioka T, Kaibuchi K, Hoshino M: Role of Meis1 in the cerebellar development. *Neuroscience2016*, San Diego, CA, USA(San Diego Convention Center), 11.14, 2016(11.12 -11.16)
- Hoshino M, Hori K: AUTS2 gene and psychiatric disorders. 第41回日本神経科学大会, 神戸, 7.28, 2018
- 星野幹雄: 精神疾患関連遺伝子 AUTS2 の生理機能と病理. 第39回日本神経科学大会 シンポジウム, 横浜市(パシフィコ横浜), 7.21, 2016(7.20-7.22)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

https://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_diag/index.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大輪智雄、宮下聡

ローマ字氏名：OWA, tomoo、 MIYASHITA, satoshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。