

令和元年5月9日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06727

研究課題名(和文) 核内因子 Dmrt が支える大脳神経前駆細胞の個性獲得・維持機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying acquisition and maintenance of cerebral cortical progenitor identity by Dmrt factors

研究代表者

今野 大治郎 (Konno, Daijiro)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：00362715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類大脳皮質の発生過程において、神経前駆細胞が適切なタイミングで適切な細胞運命を獲得するメカニズムは、大脳皮質を構築する多様な神経細胞の産生を支える最も基本的なメカニズムの一つである。我々は本研究課題を通して、Dmrtファミリー転写因子群がホメオボックス型転写因子であるGsx2およびPax6の発現を抑制することで、神経前駆細胞に大脳皮質としての細胞運命を与え、さらに位置情報依存的な神経細胞の産生を調節していることを明らかにした。これらの知見は、哺乳類が如何にして大脳皮質を獲得したのかという長い間未解明の問いに新しい知見を与える画期的な成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個体発生において多分化能を持つ胚性幹細胞からより運命の限定された体性幹細胞・前駆細胞に分化する過程の分子的理解は、発生現象を制御する分子機構の解明だけでなく、体性幹細胞を用いた再生医療の実現においても重要な意味を持つ。本研究では、胎生期大脳皮質神経前駆細胞の個性獲得・維持に必須の分子メカニズムを明らかにし、神経幹細胞・前駆細胞を用いた再生医療の実現に向けて新たな知見を提供する画期的な成果となった。

研究成果の概要(英文)：The spatio-temporal identity of neural progenitors and the regional control of neurogenesis are essential for the development of cerebral cortical architecture. This research project revealed a novel transcriptional network in which mammalian DM-domain containing transcription factors (Dmrt) confer the identity of the cerebral cortical progenitors by providing the positional information via dose-dependent suppression of developmental patterning factors including Gsx2 and pax6. Our results indicate that differential suppression of Gsx2 and Pax6 expression by Dmrt factors is a key mechanism not only for acquiring the cerebral cortical identity of progenitors but also for regulation of brain region size by negatively regulating neurogenesis. Thus, our findings provide new insights into the long-standing question of how vertebrate species acquired the cerebral cortex and how it enlarged in mammals during evolution.

研究分野：発生生物学

キーワード：神経前駆細胞 大脳皮質

## 1. 研究開始当初の背景

生物の発生過程において、幹細胞から多様な種類の細胞が生まれるメカニズムは生体機能を支える最も基本的かつ重要なプロセスの一つである。哺乳類における大脳新皮質形成過程においても、グルタミン酸および GABA 作動性ニューロンを生み出す原点となる大脳背腹軸の獲得、さらにはそれに続く多様な大脳皮質層特異的ニューロンの産生が、高次脳機能を支える基盤となっている。これまでの報告から、ニューロン多様性の獲得には、時期・領域特異的にその発現が厳密に制御されている様々な分泌因子 (Shh, Wnt, Bmp, Fgf, RA) が関与する事が明らかとなっている (Rash and Grove., 2006., O'leary *et al.*, 2007., Sansom and Livesey., 2009)。これらのシグナルは、ニューロンを生み出す源である神経前駆細胞に作用することにより、どのようなニューロンを産生するのかという神経前駆細胞の“個性 (アイデンティティ)” を獲得するための情報を提供する。一度獲得された神経前駆細胞の個性は、*In vitro* の分散培養系においても維持されることから、これらの“個性” は、上記の液性因子群による細胞非自立的なシグナルと、それに続く細胞自律的な機構の組み合わせにより維持されると考えられている。しかしながら、その分子メカニズムの詳細は、発生段階の哺乳類胚を扱う技術的な困難さもあり、謎に包まれていた。

これらの問いに挑戦する手がかりとして我々は、大脳新皮質神経前駆細胞を材料とした遺伝子発現プロファイル解析を行い、機能未知な 2 つの核内因子 *Dmrt3* および *Dmrta2* が、大脳背側領域の神経前駆細胞において特異的に発現することを見いだした (Konno *et al.* 2012)。さらに、*Dmrt3* および *Dmrta2* に対する特異抗体の作製や、*Dmrt3/Dmrta2* 遺伝子欠損マウスの作製・組織学的解析を進め、*Dmrt3* および *Dmrta2* が大脳新皮質形成に重要な役割を担っている事を明らかにした (一部未発表)。*Dmrt3* および *Dmrta2* のノックアウトマウスは共に明らかな大脳の形成異常を示すが、両遺伝子の二重変異体では特に顕著な大脳領域の形成異常が認められた。興味深いことに、二重変異体での表現型は両遺伝子単独の変異体における表現系とは大きく異なり、大脳新皮質神経前駆細胞が本来の性質とは異なる大脳腹側領域の神経前駆細胞に特異的な転写因子である *Gsx2* や *Dlx2* などを異所性に発現し、さらには GABA 作動性ニューロンを大量に生み出していた。これらの結果は、*Dmrt3* および *Dmrta2* は協調的に機能して大脳新皮質神経前駆細胞の“個性” を維持することで、大脳新皮質におけるグルタミン酸作動性ニューロンの産生を保証していることを示唆している (未発表)。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、上記の予備実験により見出された新規な大脳背腹軸の形成・維持機構に着目することで、大脳新皮質の形成基盤を神経前駆細胞の個性獲得・維持機構という視点から再検証し、その分子メカニズムの全容解明を試みた。

## 3. 研究の方法

本研究では、*Dmrt* ファミリー因子がどのようなメカニズムで神経前駆細胞の背腹軸情報を獲得・維持しているのかを明らかにすることで、神経前駆細胞の多様性維持機構を制御するメカニズムの解明を目指した。具体的には以下に示す 3 つの課題に答えることにより

その全貌の解明を試みた。

*Dmrt3* および *Dmrta2* 遺伝子と、*Sonic hedgehog(Shh)* 遺伝子および *Smoothed(Smo)* 遺伝子の条件的遺伝子欠損マウスとの組み合わせにより、Shh シグナルと Dmrt 因子の拮抗関係の詳細を明らかにする。

*Dmrt3* および *Dmrta2* 遺伝子の二重欠損 ES 細胞を用いて、Dmrt ファミリー因子の発現量と各種大脳領域化シグナルとの関連性を検討する。

*Dmrt3/Dmrta2* による Pax6 の発現制御を介した大脳皮質領野形成機構を明らかにする。

また、これらの研究計画を実行する過程で、クロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) を用いた転写因子結合 DNA 配列についての高精度な解析が可能となったことから、これら ChIP 法と次世代シーケンサー解析との組み合わせにより (ChIP-seq 法)、マウスゲノムにおける *Dmrt3/Dmrta2* の結合領域の同定を試みた。さらに、各種ヒストン修飾抗体を用いた ChIP-seq 法を用いることで、*Dmrt3/Dmrta2* が結合しているゲノム領域が持つ機能的重要性の解明を試みた。

#### 4. 研究成果

##### Dmrt ファミリー転写因子による Shh シグナルを介さない腹側化抑制メカニズムの発見

*Shh* の条件的遺伝子欠損マウスと、申請者らがこれまでに作製した *Dmrt3* および *Dmrta2* 遺伝子の条件的二重欠損マウスとの組み合わせにより、*Dmrt3/Dmrta2* の機能における *Shh* シグナルの関連性を検討した。具体的には、*Dmrt3/Dmrta2* 遺伝子の条件的欠損マウスと *Shh* 遺伝子の条件的欠損マウス交配しさらにこれらと *Nestin-Cre* マウスを交配させることにより得られた条件的三重欠損マウスの表現型を解析した。我々のこれまでの研究から、*Dmrt3/Dmrta2* 遺伝子欠損マウス胎仔では、大脳皮質領域において異所的な GABA 作動性ニューロンの産生が認められることが明らかとなっているが、上記の条件的三重欠損マウスにおいては表現型の顕著な回復 (レスキュー) は認められなかった。これらの結果は、*Dmrt3/Dmrta2* が抑制している大脳皮質領域の腹側化シグナルは、大脳皮質領域腹側化抑制分子である Pax6 が制御する Shh シグナルなどとは異なるものであり新しい背側維持機構の存在を示唆している。

*Dmrt3* および *Dmrta2* 遺伝子を同時に欠損したマウス大脳背側神経前駆細胞では、腹側神経前駆細胞の運命決定に必須の分子である *Gsx2* の異所的な発現上昇が認められ、前述の通りこれらは Shh 非依存的な腹側化メカニズムで制御されていることが示唆された。そこで、*Dmrt3/Dmrta2* 遺伝子二重欠損 ES 細胞を用いた in vitro 分化培養法 (大脳オルガノイド法) により、*Dmrt3/Dmrta2* がどのようなシグナル伝達経路を調節することで神経前駆細胞における大脳背側アイデンティティの維持を担っているかを解析した。その結果、in vitro 分化培養系では *Dmrt3/Dmrta2* 遺伝子二重欠損細胞においても Pax6 や *Emx1/2* などの大脳皮質神経前駆細胞マーカーの正常な発現が認められ、*Gsx2* など大脳腹側神経前駆細胞マーカーの発現は全く認められなかった。これらの結果は、二重欠損マウスにおいて認められた背側領域の運命転換は何らかの細胞外シグナルに依存していることが明らかとなった。前述の通りこれら運命転換の表現型には Shh シグナルは関与していな

いことが明らかとなっていることから、Fgf シグナル等、他の腹側化シグナルの関与も検討したが、これらのシグナル伝達が *Dmrt3/Dmrta2* 遺伝子欠損マウスにおける表現型の出現に關与する証拠は得られなかった。

#### Dmrt ファミリー転写因子による *Gsx2* および *Pax6* 遺伝子の発現抑制機構の解明

哺乳類大脳皮質の発生に必須の転写因子である *Dmrt3* および *Dmrta2* が如何にして大脳神経前駆細胞に特徴的な遺伝子発現を制御しているのかを明らかにするため、クロマチン免疫沈降法と次世代シーケンサーを用いた解析 (ChIP-seq 法) を進め、大脳神経前駆細胞において *Dmrt3* および *Dmrta2* が結合するゲノム領域の同定を試みた。その結果、*Dmrt3* および *Dmrta2* は、これらの因子を欠損した神経前駆細胞で発現が大きく変動する遺伝子である *Pax6* および *Gsx2* の転写終結部位からそれぞれ下流に 6kb および 22kb のゲノム領域に結合していることが明らかになった。そこで、これらのゲノム領域が大脳発生においてどのような機能を担っているのかを明らかにするため、遺伝子発現の調節に関わることが知られている各種ヒストン修飾 (H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac, H3K27me3) に対する抗体と野生型マウス胎児脳を用いた ChIP-seq 法による解析を行った。その結果、*Dmrt3* および *Dmrta2* が結合する *Gsx2* および *Pax6* 遺伝子近傍のゲノム配列は、活性化エンハンサー部位に特徴的なヒストン修飾である H3K4me1 および H3K27Ac の共局在が確認された。以上の結果から、マウス大脳発生期において *Dmrt3* および *Dmrta2* は、大脳発生に必須の転写制御因子である *Gsx2* および *Pax6* の発現を制御するエンハンサーに直接結合し、これら因子の発現を減少もしくは完全に抑制することで、神経前駆細胞に備わっている大脳皮質神経前駆細胞としての運命決定プログラムを正常に作動させるよう機能していることが明らかになった。

#### Dmrt ファミリー転写因子の発現量依存的なターゲット遺伝子の発現量制御

前述の遺伝子欠損マウスおよび ES 細胞を用いた in vitro 分化培養系を用いた解析から、*Dmrt3/Dmrta2* のターゲット遺伝子である *Gsx2* および *Pax6* 遺伝子の発現量は *Dmrt3/Dmrta2* の総発現量と反比例していることが明らかになった。これらの結果は、*Dmrt3* および *Dmrta2* の神経前駆細胞における内側外側軸 (medial-lateral axis) での発現勾配が、*Pax6* の脳領域に依存した発現量の変化を保証し、その結果として *Pax6* 依存的な大脳領野形成機構に影響を与えていることが示唆された。また、*Dmrt* ファミリー転写因子の *Gsx2* に対する発現抑制効果についてもその総発現量に依存していることが明らかとなり、*Dmrt* ファミリー転写因子は *Gsx2* の発現ドメインの広がりを制御することにより *Gsx2* が制御する嗅球介在ニューロンの産生量を決定していることが示唆された。

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

1. Kijima K, Kubota K, Hara M, Kobayakawa K, Yokota K, Saito T, Yoshizaki S, Maeda T, Konno D, Matsumoto Y, Nakashima Y, Okada S:  
The acute phase serum zinc concentration is a reliable biomarker for predicting the functional outcome after spinal cord injury.  
EBioMedicine. 2019 Mar;41:659-669. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.03.003. Epub 2019 Mar 20.
2. Saadaoui M, Konno D, Loulier K, Goïame R, Jadhav V, Mapelli M, Matsuzaki F, Morin X:  
Loss of the canonical spindle orientation function in the Pins/LGN homolog AGS3.  
EMBO Rep. 2017 Sep;18(9):1509-1520. doi: 10.15252/embr.201643048.
3. Inoue M, Tabata H, Iwai R, Konno D, Komabayashi-Suzuki M, Yamamoto S, Nanahara Y, Iwanari H, Mochizuki Y, Hamakubo T, Matsuzaki F, Nagata K, Mizutani K:  
Prdm16 is critical for progression of multipolar phase during neural differentiation of developing neocortex.  
Development. 2016 Dec 19. pii: dev.136382.
4. Okamoto M, Miyata T, Konno D, Ueda HR, Kasukawa T, Hashimoto M, Matsuzaki F, Kawaguchi A:  
Cell-cycle-independent transitions in temporal identity of mammalian neural progenitor cells.  
Nature Commun. 2016 Apr 20;7:11349. doi: 10.1038/ncomms11349.

〔学会発表〕(計3件)

H30年度:2018年度

Daijiro Konno and Fumio Matsuzaki: Dmrt transcription factors orchestrate the cerebral cortical development via integrating positional information in neural progenitors.  
22st Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, Nara, Japan 2018.5.22-25 (poster)

H28年度:2016年度

Daijiro Konno and Fumio Matsuzaki: Mammalian Dmrt factors maintain progenitor cell identity in the developing cerebral cortex.  
第39回日本神経科学大会 神奈川県横浜市 2016.7.20-22 (poster)

Daijiro Konno and Fumio Matsuzaki: Dmrt factors maintain progenitor cell identity in the developing cerebral cortex.  
21st Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (Palais des Congrès d'Antibes Juan les Pins) FRANCE 2016.5.11-14 (poster)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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。