

令和 2 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07011

研究課題名(和文) 大脳皮質興奮性ニューロンの分化過程と細胞系譜の関係解析

研究課題名(英文) Cell type analysis of clonally related cortical neurons using initial axonal projection pattern

研究代表者

畠中 由美子 (Hatanaka, Yumiko)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：40271548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質神経幹細胞が多様なニューロンタイプを産生する過程については未解明な点が多い。本研究では神経幹細胞とそこから派生する中間神経前駆細胞の細胞系譜を調べるため、標識法を確立したのち標識ニューロンタイプについて、初期軸索投射とマーカー発現の観点から解析した。その結果、神経幹細胞が産生するニューロン数やニューロンタイプの組成は幹細胞毎に不均一であること、一方、中間神経前駆細胞は主として2つのニューロンを産生し、これらは非常に類似したタイプであることがわかった。今後、分化過程の時間軸についても合わせて調べることで、皮質ニューロンタイプ決定における細胞自律的制御と時間軸の関係解明が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

”初期軸索投射”という独自の視点から2つに分類した皮質ニューロンタイプを元に、多様な皮質ニューロンが生じる基礎過程を細胞レベルで明らかにしようとした研究である。皮質ニューロンタイプは主としてその配置を元に、深層・浅層と大きく2つに分けて考えられてきたが、本研究では、ニューロンの機能に即した投射パターンを適応して1つの皮質幹細胞から生じるニューロンの分類を行った。解析の結果は、皮質幹細胞がニューロンタイプの産生に関して不均一であることを示唆しており、ニューロン多様性を生み出す機構解明の研究に関して1つの方向性を示すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：We first established the genetic methods for labeling cell lineages of the ventricular zone (VZ) cells and intermediate neuronal progenitors (INPs) in the developing mouse cerebral cortex. Then, we analyzed their daughter cell types, focusing on initial axonal projection pattern and cell type marker expression. Our analyses suggested that (1) VZ cells are heterogeneous for ability of producing neuronal types and number of neurons, and (2) INPs are mostly committed to produce pair cells sharing the same property. These results, together with future analyses clarifying the timeline for VZ cell differentiation, would help us to understand the mechanisms underlying the production of divergent neuronal types in the cerebral cortex.

研究分野：神経発生学

キーワード：大脳皮質形成 発生・形態形成 細胞系譜 神経細胞分化 ニューロンサブタイプ

## 1. 研究開始当初の背景

大脳皮質は6層構造をもち、各層には特徴的な投射タイプの興奮性ニューロンが配置している。その投射には大きな多様性があるが、投射のパターンにより、皮質外投射と皮質内投射(交連性・同側性)の2つに大きく分けることができる。前者ニューロンは深層(Ⅴ、Ⅵ層)に、後者ニューロンの大部分は浅層(Ⅰ-Ⅳ層)に分布するが一部は深層にも分布する。発生過程では、深層ニューロンが先に、浅層ニューロンが後から生まれることが知られている。これらのニューロンの多様性が生じるメカニズムについて、遺伝学的な解析から *Fezf2/Ctip2/Satb2/Tbr1* などの転写因子の相互作用や、幹細胞におけるクロマチン構造の変化が重要なことが明らかになってきている。一方、個々の神経幹細胞の分化レベルで、様々なニューロンタイプが産生される時系列などには不明な点が多い。

これら興奮性ニューロンは、皮質脳室帯(VZ)の幹細胞から直接あるいは中間神経前駆細胞を介して分化する。その分化過程について、タイムラプスイメージング法を用いた観察により、VZを離れた幼若ニューロンはまず中間帯(IZ)に留まっている間に軸索を形成し始め、その後、表層に向かって移動を開始することを明らかにした。さらにこの時の軸索伸長方向は外側あるいは内側の二者択一的で、外側投射が内側投射よりも先に現れること、起始ニューロンはそれぞれ将来の皮質外・皮質内投射ニューロンに該当することがわかった。これらの結果は、同じ深層であっても皮質外投射ニューロンが皮質内投射ニューロンより先に分化することを示唆する。そこで、Ⅴ層内の2つのタイプのニューロンの“誕生日”を調べたところ、予想通り、皮質外投射ニューロンが皮質内投射ニューロンよりも先に誕生のピーク日を迎えることがわかった。すなわち、同じ層のニューロンであってもその性質は生まれた時期に強く関連している。

これまでニューロンタイプの多様性を検証する時には層の配置を指標にすることが多かった。しかし、上記結果は、発生過程におけるニューロンの多様性を検証するには“層”よりも投射方向等に象徴される“ニューロンタイプ”を調べる必要性を示している。また、ニューロンタイプと誕生日は密接に関連したが、その一方で、同じ領野内のⅤ層の2タイプのニューロンの誕生日は分離せず、大きく重なっていた。ニューロンタイプと誕生日の関連性についてさらに理解するためにも、1つの幹細胞から生じるニューロンを標識し、その細胞系譜に含まれるニューロンタイプを明らかにすること、また、時間軸を含めたその分化過程を明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

大脳皮質の興奮性ニューロンは、多様性に富むが、その分化過程については未解明な点が多い。先行研究において、これらニューロンの初期軸索形成過程を調べ、最も早く検出できる多様性は、外側あるいは内側投射の2種の投射タイプであることを明らかにした。また、外側投射ニューロンが内側投射ニューロンよりも先に誕生のピークを迎えることも示し、投射タイプと分化タイミングの間に強い相関があることも明らかにした。本研究では、さらにこの強い相関が、個々の神経幹細胞の分化レベルでどの様に表現されているのかを調べる方法を確立し、皮質ニューロン分化過程の基本法則を見出すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

神経幹細胞ならびに中間神経前駆細胞から分化するニューロンの標識と解析  
神経幹細胞の標識には、*Nestin-CreERT2*(京都大学・影山・今吉博士作成)マウス、中間神経前駆細胞の標識には *Neurogenin(Ngn)2-CreERT2*(遺伝学研究所、平田博士作成)マウスを用いた。それぞれの細胞系譜を調べるため、これらマウスは、相同染色体間組換えを利用したレポーターである *Mosaic Analysis with Double Markers (MADM)* ジャクソンより導入)マウスと交配した。深層の外側・内側投射ニューロンを対象として解析するため、深層ニューロンが産まれる妊娠12.0-13.5日目の親マウスにタモキシフェンを腹腔内投与した。その後、遺伝子組換えにより標識されたニューロンが皮質板に配置する妊娠16.5日目に胎仔を回収した。固定した脳からマイクロスライサーを用いて、100 μm厚の連続スライスを作成し、抗GFPと抗RFP抗体、ならびに外側・内側投射ニューロンのマーカーである抗 *Ctip2* と抗 *Satb2* 抗体を用いて蛍光4重染色を行なった。染色スライスは封入後、まず低倍で全体像を記録した。その後、GFPあるいはRFPで標識された細胞の初期投射とマーカー発現について調べるため、共焦点走査型レーザー顕微鏡でZ-stack画像を取得し、これらの画像を統合後、連続スライス上に投影して1つの神経幹細胞あるいは中間神経前駆細胞の子孫細胞を同定し、その解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 神経幹細胞に由来する子孫細胞の標識法と解析法の確立  
神経幹細胞は増殖期には対称分裂をするがニューロン産生時期に入ると非対称分裂を開始し、幹細胞を維持しながらニューロンを産生するようになる。この非対称分裂期に入った幹細胞の細胞系譜の解析をするため、まず時期特異的に幹細胞を標識できる系を確立した。既報に従い *Nestin-CreERT2* マウスと *MADM* レポーターマウスを交配し、*Nestin-CreERT2(+/-):MADM-*

11GT(+/+)マウスを準備した。これをさらに MADM-11TG(+/+)と交配し、妊娠 11.5 日目あるいは妊娠 12.5 日目にタモキシフェンを投与した。この手順により、幹細胞の分裂に伴う組換えによって、娘細胞がそれぞれ緑色(GFP)と赤色(RFP)の蛍光タンパク質で標識できる(あるいは黄と無色となるがこれは解析対象としない)ことを確認した。また、緑と赤で標識される細胞数を調べ、妊娠 11.5 日目の投与では主として対称分裂が、妊娠 12.5 日目では非対称分裂が起きていることがわかった。さらに、投与するタモキシフェンの濃度を調節することで、各脳における幹細胞を散発的に標識し、1つの幹細胞に由来する細胞群の追跡が可能になった。妊娠 16.5 日目に回収した脳スライスに対し、2次抗体の選定を含む染色法の条件を検討し、蛍光4重染色によって標識細胞の形態観察とマーカー発現の解析が出来る系を確立した。

#### (2) 中間神経前駆細胞に由来する子孫細胞の標識法と解析法の確立

中間神経前駆細胞由来のニューロンを時期特異的に標識する目的で、Ngn2-CreERT2 マウスを用いた。まず CreERT2 の発現を抗 Cre 抗体で調べたところ、基本的に内在的 Ngn2 細胞に重なるが全体としてはより IZ 側で発現が高くなり、VZ と IZ の境界にいる分裂期の細胞でも発現していることがわかった。よって、CreERT2 はニューロン分化へ方向性が決まった細胞で発現し、その発現は中間神経前駆細胞の分裂期まで継続すると考えられた。また、Cre 細胞と Tbr2 細胞の分布を比較すると、VZ 内ではほぼ重なるが、IZ 内では、広く分布する Tbr2 細胞に対し Cre 細胞はその一部に留まり、Tbr2 細胞よりも分化状態の若いニューロンに局限して発現すると考えられた。この Ngn2-CreERT2 マウスを用い、上記(1)同様 MADM レポーターマウスを交配して、Ngn2-CreERT2(+/-):MADM-11GT(+/+)を準備したのち MADM-11TG(+/+)と交配した。妊娠 12.5 日目あるいは妊娠 13.5 日目に高濃度のタモキシフェンを投与することで、深層ニューロンを散発的に標識できる条件を決定した。形態観察や抗体染色法は(1)の方法を適応した。

#### (3) 神経幹細胞に由来する子孫細胞に含まれるニューロンタイプ

妊娠 12.5 日目に標識した際に非対称分裂となった細胞系譜(緑または赤色蛍光の細胞が1または2個を含むもの)合計 23 例のうち外側投射のみ、内側投射のみ、外内側投射を両方含むものがそれぞれ 1、12、9 例であった。また、それぞれの系譜に含まれる細胞数は 2、2-9、4-9 個とばらつきがあり、平均では 2、5.3、7.1 個であった。ニューロン産生が完全に終了する前に脳を回収しているため、その後生まれる一部浅層ニューロンを欠いている可能性はあるが、これらのことから、初期投射の視点でニューロンタイプを分類した場合、1つの幹細胞から外側・内側投射ニューロンが生じることがわかった。その一方で、1例ではあるが外側投射のみ、あるいは12例で内側投射のみを含む系譜があり、幹細胞が産生するニューロンの数やタイプはかなり不均一であることが考えられた。

内側投射のみを生み出すと考えられる幹細胞では、ニューロン産生の時間軸に関して2つの可能性が考えられた。1つは、幹細胞がタモキシフェン投与時にすぐに非対称分裂を開始し、内側投射ニューロンを産生する可能性であり、もう1つは、幹細胞がタモキシフェン投与時には内側投射ニューロンを産生せず、その後、周囲にいる幹細胞が内側投射ニューロンを産生する時期に合わせてニューロンを産生する可能性である。内側投射ニューロンのみを含む細胞系譜においても、産生細胞の数から考えると7-9個の細胞を含む例が3例あり、後者の可能性は十分にある。ニューロン分化に時間軸の解析を加えることは多様性形成のメカニズムを知る上で重要な知見の1つとなる。当初予定した培養系によるタイムラプスイメージングで、この解析結果を得るまでには至らなかったが、本実験によってこの検証に必要な準備を整えることができ、今後の実験につなげることができた。

#### (4) 中間神経前駆細胞に由来する子孫細胞に含まれるニューロンタイプ

幹細胞から生じた中間神経前駆細胞は、培養系の実験から、さらに1回(ないし2-3回)分裂しニューロンになると考えられているが、個体内における分裂の回数や生じるニューロンタイプは明らかではない。この系譜についても調べるため、Ngn2-CreERT2 と MADM マウスを交配し、生じるニューロンタイプを調べた。その結果、マウスにおいては1つの中間神経前駆細胞から主に2つのニューロンが生じること、これらニューロンの初期投射ならびに分子マーカーの発現は共通していることがわかった。すなわち中間神経前駆細胞の役割は、同じタイプのニューロン数を増幅させることであると考えられる。今後、ニューロンのタイプ決定における時系列を解析する過程で、幹細胞より直接分化したニューロンと、同時期に中間神経前駆細胞を介して分化したニューロンのタイプ比較を行うことが重要になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hatanaka Y.  |
| 2. 発表標題<br>Genetic labeling of neurons derived from direct and indirect neurogenesis in the mouse cerebral cortex       |
| 3. 学会等名<br>The 8th international neural microcircuit conference, Synaptic Specificity to Circuit Dynamics (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hatanaka Y., Hirata T.   |
| 2. 発表標題<br>Genetic labeling of neurons derived from direct and indirect neurogenesis in the mouse cerebral cortex |
| 3. 学会等名<br>New Frontier in Neurosciences 2020 (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hatanaka Y., Kawaguchi Y., Hirata T.   |
| 2. 発表標題<br>Genetic labeling of neurons derived from direct and indirect neurogenesis in the mouse cerebral cortex |
| 3. 学会等名<br>Annual Meeting of Society for Neuroscience (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Hatanaka Y.   |
| 2. 発表標題<br>Labeling of neurons derived from intermediate neuronal progenitors in the mouse cerebral cortex |
| 3. 学会等名<br>新学術領域研究 スクラップ&ビルドによる脳機能の動的制御 第3回領域会議  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>畠中由美子、平田たつみ、川口泰雄  |
| 2. 発表標題<br>Labeling of neurons derived from intermediate neuronal progenitors in the mouse cerebral cortex |
| 3. 学会等名<br>第40回日本神経科学学会大会  |
| 4. 発表年<br>2017年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院 生命機能研究科 細胞分子神経生物学研究室（山本研究室）  
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/neurobiol/>

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                    | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 連携研究者 | 平田 たつみ<br><br>(Hirata Tatsumi)<br><br>(80260587) | 遺伝学研究所・遺伝形質研究系・教授<br><br><br><br>(63801) |    |