

令和 元年 5月 31日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07375

研究課題名(和文) 脳組織構築にはたす神経分化のペース調節の役割

研究課題名(英文) Roles for the pace control of neurogenesis in brain histogenesis

研究代表者

嶋村 健児 (Shimamura, Kenji)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：70301140

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)：幼若ニューロンのアピカル突起によって神経幹細胞の分化が制御されていることを見出し、突起の保持時間によって、一定時間におけるニューロンの産生数が調節されていることを明らかにした。さらに、このしくみの脳の組織構築における意義を検討するため、マウスの大脳皮質構築にはたす役割を調べた。その結果、大脳皮質の各層の適切な厚みはアピカル突起の保持時間によって調節されていることを明らかにし、雑誌Cerebral Cortex誌に発表した。保持時間を調節するしくみについては明らかにできなかったが、皮質以外の脳組織構築について検討を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニューロン産生量の時間的調節機構について、およびそれが大脳皮質構築にはたす役割について初めて明らかにした。皮質構築異常は、多くの先天性脳疾患、精神疾患等で報告されており、これらの疾患の病因・病態解明、治療法の開発に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We found that the transient retention of the apical endfoot of differentiating cells regulates the pace of neuron production through Notch signaling. We extend this notion to explore its role in brain histogenesis. We found that the retention period is correlated with the pace of neuron production in developing cerebral cortex and that the proper time length of retention is crucial for formation of well-proportioned six-layered structure of cerebral cortex. These results were published in Cerebral Cortex.

研究分野：発生生物学

キーワード：神経発生 組織構築 神経幹細胞 神経分化 ニューロン 脳発生 大脳皮質

1. 研究開始当初の背景

胎児の脳では、神経幹細胞が分裂によって増殖し、また神経細胞（ニューロン）、グリアなど、後に脳を構成する細胞を産み出す。神経幹細胞は脳壁の内側（脳室側）に存在し、産生されたニューロンは脳壁の外側へ移動しそこに堆積する。これは脳全体に共通した組織を構築する基本原理である。しかし、完成した脳では、皮質（ニューロンの層）や神経核（ニューロンの塊）など、領域ごとに全く異なる組織タイプが見られる。したがって、この基本原理からいかにして異なるタイプの組織を生じるか、またそれが領域によってどのように決まっているかは、脳発生における極めて重要な問題だが、その多くは未解明である。私たちは、神経幹細胞の増殖と分化の量的な違いがこの問題に答える鍵と考え、そのプロセスについて研究を行ってきた。これまでに、分裂によって誕生した幼若ニューロンは、一過的に突起を介して親細胞である神経幹細胞と相互作用し、その分化を調節していることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、幼若ニューロンの突起の保持時間がニューロンの産生ペースを決めているという知見をもとに、このしくみが実際の脳の組織構築にはたす役割は何か、突起の保持時間を決めるしくみは何か、領域性があるか、また領域ごとに異なる組織の構築に関与するか、の3点について明らかにし、脳を創り上げるしくみについて理解を深めることが目的である。

3. 研究の方法

マウス的大脑皮質をモデル系とし、ニューロン突起の保持時間を変化させたときに、ニューロンの産生ペースがどのように変化するか、さらにその結果大脑皮質の層形成にどのような影響が生じるかを解析した。これに並行し、安価で実験操作に適したニワトリ胚を用いて、突起の保持時間とニューロン産生ペース、およびそれらによる領域特異的な組織構築について研究を行った。それぞれ皮質と神経核様式を呈する中脳背側部（視蓋）と腹側部（被蓋）について解析した。さらに、ニューロンの突起の脱着を制御するしくみを明らかにするため、細胞骨格、細胞接着を制御することが知られているRhoファミリーの低分子量Gタンパク質に注目し、様々な機能アッセイを行ってニューロン産生ペースへの影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 新たな Notch シグナルの調節機構

Notch シグナルは、発生の様々な局面で細胞系譜の調節に中心的な役割を果たすシグナル経路であり、神経幹細胞の分化調節にもきわめて重要である。そのシグナル伝達経路、および関与因子の詳細について非常によく研究されているが、神経幹細胞においては、シグナルを送る細胞と受ける細胞がどのように相互作用しているかが不明であった。私たちは、神経幹細胞から分裂によって生じた幼若ニューロンが、アピカル突起の末端で接着帯を介して隣接する神経幹細胞と相互作用し、Notch シグナルを活性化して神経幹細胞の未分化性を維持することを明らかにした (Hatakeyama et al., 2014)。これは神経分化制御における全く新しい概念である (図1)。

(2) 突起の保持時間によるニューロン産生ペースの調節

次に、この現象の脳組織構築における生理的意義について探求した。突起先端の接着帯によって Notch シグナルが安定に活性化される一方で、接着帯を乖離することで迅速に Notch シグナルが遮断される可能性を想定し、アピカル突起の保持時間がニューロン産

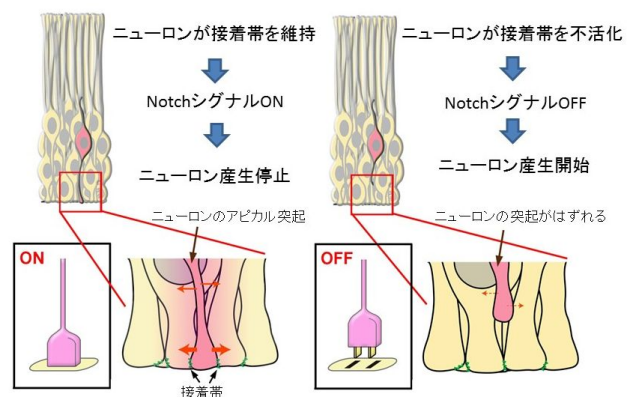


図1 幼若ニューロンのアピカル突起の保持による神経分化制御

生のペースを制御するという作業仮説をたてた。この仮説を検証する実験系としてマウス胚の大脑皮質を選んだ。マウス的大脑皮質原基では、神経幹細胞が長期間に渡って周期的にニュー

ロンを産生し、ニューロンは誕生時期に応じて異なる形質を獲得することから、神経分化の時間的制御を解析する良い実験系として知られている。まず、皮質ニューロンの産生ペースとニューロンのアピカル突起の保持時間に何らかの相関があるか調べた。その結果、皮質形成過程において、一定時間内に産生されたニューロン数、すなわちニューロンの産生ペースは一定ではなく、経時的に変動することを見出した(図2)。さらに、またこの過程におけるアピカル突起の保持時間は、ニューロン産生ペースとはおよそ逆相関となることを見出した(図2)。次に、接着帯の阻害、あるいは安定化によってアピカル突起の保持時間がそれぞれ短縮、延長することを利用して、それらの操作がニューロンの産生ペースに及ぼす影響を調べた。その結果、保持時間の短縮により一定期間に産生されるニューロン数は増加し、保持時間を延長するとニューロン数は減少することがわかった(図3)。

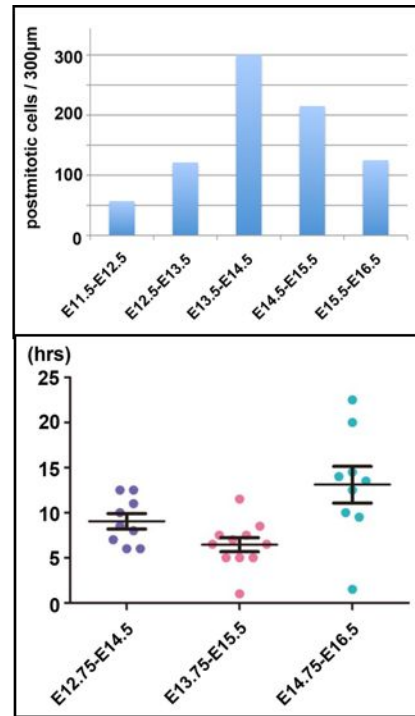


図2. ニューロンの産生量と保持時間の逆相関。各ステージにおける、24時間のニューロン産生量(上)と突起の保持時間(下)。

(3) ニューロン産生ペースの変化が大脳皮質の層形成に及ぼす影響

次に、これらの人為的操作が実際に大脳皮質の層形成に与える影響を詳しく解析した。大脳皮質の深層に位置するニューロンは発生の早期に産生されるが、親細胞である神経幹細胞は一定時間後に大脳皮質の表層に分布するニューロンを産生するようになることが知られている。接着帯の阻害によってアピカル突起の保持時間を短縮すると、早期に誕生するニューロンが増加して深層の厚みが増し、後期に誕生する表層ニューロンが減少した(図4)。一方、接着帯の安定化によって保持時間を延長すると、およそ逆の表現型が観察された。これらの結果から、アピカル突起の保持時間によってニューロン産生ペースが制御され、皮質の各層の適正な比率が保たれることが明らかとなり、分化する細胞から未分化な細胞へのフィードバック制御の実態が示された。また、いずれの操作も細胞周期や細胞死には影響を及ぼさないことから、これらの表現型は神経前駆細胞の分裂モード(対称/非対称)が変化した結果であると結論した。以上を論文にまとめて雑誌 *Cerebral Cortex* に発表した(Hatakeyama and Shimamura, 2018)。

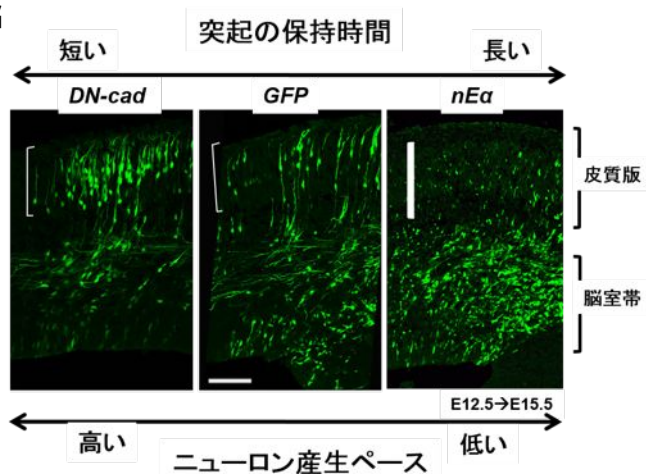


図3. 突起の保持時間によるニューロン産生ペースの調節

(4) アピカル突起の保持時間の制御機構

次に、突起の保持時間を決定する機構について、一般に細胞骨格、および細胞接着の制御に関わる Rho ファミリーの低分子量 G タンパクに注目して検討を行った。しかし、Rho、あるいはそのエフェクターを阻害、あるいは活性化しても、一定時間内に産生されるニューロンの量に変化は認められなかった。この結果を受けて、アクトミオシン経路による突起先端の自切現象、

および細胞小胞輸送の動態制御に注目して解析を継続中である。

(5) FGF シグナルによる脈絡叢形成

これらの研究の過程で、脊髄で FGF シグナルが亢進すると、蓋板（ループプレート）が著しく拡張し、菱脳様の外観を呈することを発見した。このとき領域性は脊髄のままであり、単純に菱脳に運命転換したわけではない。逆に、菱脳において FGF シグナルを阻害すると、同じく領域性は変化しないものの、蓋板の拡張が著しく阻害されることがわかった。正常発生において、蓋板の拡大は脳の3つの部位で見られ、脈絡叢と呼ばれる脳脊髄液を産生する器官との高い相関が認められている。興味深いことに、これらの部位はすべて近傍に *Fgf8* が発現しているが、脈絡叢形成への関与については不明である。そこで、脈絡叢形成について検討したところ、脈絡叢特異的な遺伝子発現は誘導されないことがわかった。この結果をこれまでの知見と合わせると、脈絡叢形成における細胞形質の側面と形態的側面が異なるシグナル経路（前者は BMP シグナル、後者は FGF シグナル）によって担われていることが示唆された。

参考文献

Hatakeyama, J., Wakamatsu, Y., Nagafuchi, A., Kageyama, R., Shigemoto, R., Shimamura, K. (2014). Cadherin-based adhesions in the apical endfoot are required for active Notch signaling to control neurogenesis in vertebrates. *Development* **141**, 1671-1682

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Ha, T., Moon, K.H., Dai, L., Hatakeyama, J., Yoon, K., Park, H-S., Kong, Y-Y., Shimamura, K., Kim, J.W. The retinal pigment epithelium is a Notch signaling niche in the mouse retina. *Cell Rep.* 19, 351-363, 2017. 査読有り
2. Hatakeyama, J., Sato, H., Shimamura, K. Developing guinea pig brain as a model for cortical folding. *Dev. Growth Differ.* 59, 286-301, 2017. DOI: 10.1111/dgd.12371 査読有り
3. Abe, S., Abe, K., Zhang, J., Harada, T., Mizumoto, G., Oshikawa, H., Akiyama, H., Shimamura, K. Roles of CD34+ cells and ALK5 signaling in the reconstruction of seminiferous tubule-like structures in 3-D re-aggregate culture of dissociated cells from mouse testes. *PLoS ONE* 12(11): e0188705, 2017. DOI: .10.1371/journal.pone.0188705 査読有り
4. Hatakeyama, J., Shimamura, K. The pace of neurogenesis is regulated by the transient retention of the apical endfeet of differentiating cells. *Cereb. Cortex*, bhy252, 2018. DOI: 10.1093/cercor/bhy252 査読有り
5. Acebedo, A.R., Suzuki, K., Hino, S., Alcantara, M.C., Sato, Y., Haga, H., Matsumoto,

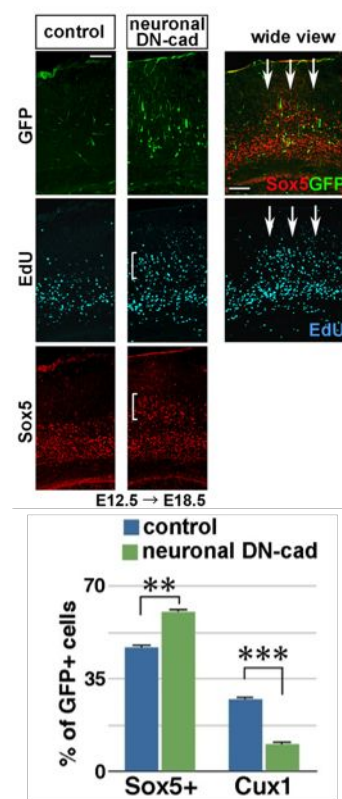


図4. 保持時間の短縮と層形成の変化
保持時間を短縮すると (neuronal DN-cad)、深層 (Sox5陽性、EdUでs標識) のニューロンが増加し、表層 (Cux1陽性) のニューロンが減少する。

K., Nakao, M., Shimamura, K., Takeo, T., Nakagata, N., Miyagawa, S., Nishinakamura, R., Adelstein, R.S., Yamada, G. Mesenchymal actomyosin contractility is required for androgen-driven urethral masculinization in mice. *Comms Bio*, in press, 2019. DOI: 10.1038/s42003-019-0336-3 査読有り

〔学会発表〕(計12件)

国際会議

K. Shimamura, J. Hatakeyama, H. Sato, R. Matsushita, H. Tsuchiya, K. Sasaki, M. Saitou, A. Isomura, H. Shimojo, R. Kageyama. "A role for the choroid plexus in the cortical expansion in primates", CDB Symposium, 2017 "Towards Understanding Human Development, Heredity, and Evolution", March 27-29, 2017, Kobe.

K. Shimamura, J. Hatakeyama, H. Sato, N. Yamamoto. "Development of mammalian cerebral cortex", The 6th Shangdong University-Kumamoto University Medical Symposium, 14~16 December, 2017, Jinan, China.

. J. Hatakeyama, K. Shimamura. Novel roles of Fgf signaling in the development of chick hindbrain. The 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, May 22-25, 2018, Nara, Japan.

. H. Sato, J. Hatakeyama, T. Iwasato, N. Yamamoto, K. Shimamura. Area-specific laminar organization is regulated by thalamocortical axons through axon-derived NRN1 and VGF in developing neocortex. The 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, May 22-25, 2018, Nara, Japan.

. K. Shimamura. Novel intrinsic and extrinsic mechanisms for the proper laminar organization of the cerebral cortex. Kumamoto-NCBS/InStem Partnership Meeting, 2019, March 6-7, 2019, Bangalore, India.

国内会議

畠山淳、佐藤晴香、松下理香、影山龍一郎、斎藤通紀、土屋英明、嶋村健児「霊長類の脳はいかにして大きくなったか？」日本進化学会第18回大会、2016年8月25~28日、東京都目黒区

K. Shimamura "A mechanism for the cerebral cortical expansion in primates" 東京医科歯科大難治研・熊大発生研ジョイントシンポジウム、2016年2月24日、熊本市

J. Hatakeyama, K. Shimamura. "Extrinsic factors and the cortical expansion in primates." 第40回日本神経科学会、2017年5月10日~13日、千葉市

H. Sato, J. Hatakeyama, T. Iwasato, N. Yamamoto, K. Shimamura. "The role of thalamic afferents in the formation of the area-specific laminar configuration in the developing neocortex." 第40回日本神経科学会、2017年5月10日~13日、千葉市

J. Hatakeyama, H. Sato, R. Matsushita, H. Tsuchiya, M. Saitou, R. Kageyama, K. Shimamura. "Roles of extrinsic factors in the cortical expansion in primates." 第50回日本発生生物学会、2017年7月20日~23日、東京都江戸川区

J. Hatakeyama, K. Shimamura. "How do humans have expanded cerebral cortex?" Key Forum: The 3rd International Symposium on Stem Cell Traits and Developmental Systems. 11-12 January, 2018, Kumamoto.

K. Shimamura. Thalamocortical axons regulate area-specific laminar configuration via secreting factor VGF. NIG Symposium “Circuit construction in the mammalian brain”、2018年12月20-21日、静岡県三島市

〔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：畠山 淳

ローマ字氏名：Jun Hatakeyama

所属研究機関名：熊本大学

部局名：発生医学研究所

職名：助教

研究者番号(8桁)：90404350

(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。