

令和元年6月24日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08479

研究課題名(和文) 発生期大脳皮質の脳室面および非脳室面の前駆細胞で区別される血管由来微小環境の解明

研究課題名(英文) Surface- and Non-surface dividing progenitors utilize different vascular niche during neocortical development

研究代表者

水谷 健一 (Ken-ichi, Mizutani)

神戸学院大学・薬学研究科・特命教授

研究者番号：40469929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、血管の酸素養分の運搬路という基本的な機能に加えて、血管によって構築される微小環境(niche)の概念が提唱されており、組織形成の理解において、幹細胞を支持する生物学的適所としての血管の役割に注目が集まっている。

大脳皮質は多種多様な神経細胞からなり、これらは全て発生期の神経幹細胞・前駆細胞から生み出されるが、皮質表面積の拡大を可能にする神経系幹細胞の系譜が如何なる分子機構によって調節されるのかは不明である。本研究では、発生期の大脳皮質において、脳室面と非脳室面で分裂する幹細胞(前駆細胞)が異なる血管由来の微小環境を利用して発生分化を調節する現象が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管は、組織細部にわたり養分や酸素を運搬する極めて重要な器官の一つであり、木の枝のごとく一定の組織空間に分布する。血管が空間に如何に伸展し、その伸展を止めるのかという、血管発生を調節する分子機構は未だ未解明の問題が数多く残されている。組織内に構築される血管がどのようにつくられ、これが周囲の組織幹細胞と如何に連携しながら組織・臓器を構築するのかという問いは、効率的な幹細胞の培養法の確立や幹細胞を用いた再生医療の実現化に重要な知見が見出されることが期待される。

研究成果の概要(英文)： Mammalian neocortical development encompasses an entire set of events that leads to the generation of excitatory and inhibitory neurons from neural progenitors in the dorsal and ventral telencephalon. During these processes, the developing neocortex acquires its vasculature by angiogenesis, a process consisting of proliferation of endothelial cells in existing blood vessels or vascular plexuses, and leading to formation of new blood vessels. Recent studies have suggested that neocortical angiogenesis progresses in a spatially and temporally restricted manner to construct a specialized vascular niche that supports ongoing neurogenesis during neocortical development. Here we showed that periventricular blood vessels selectively influence neocortical progenitors behavior and neurogenesis, highlighting how CNS angiogenesis is utilized to construct neocortical cytoarchitecture.

研究分野：神経発生学、血管発生学、組織学、管細胞生物学

キーワード：神経幹細胞 血管発生 微小環境 神経発生 大脳皮質

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

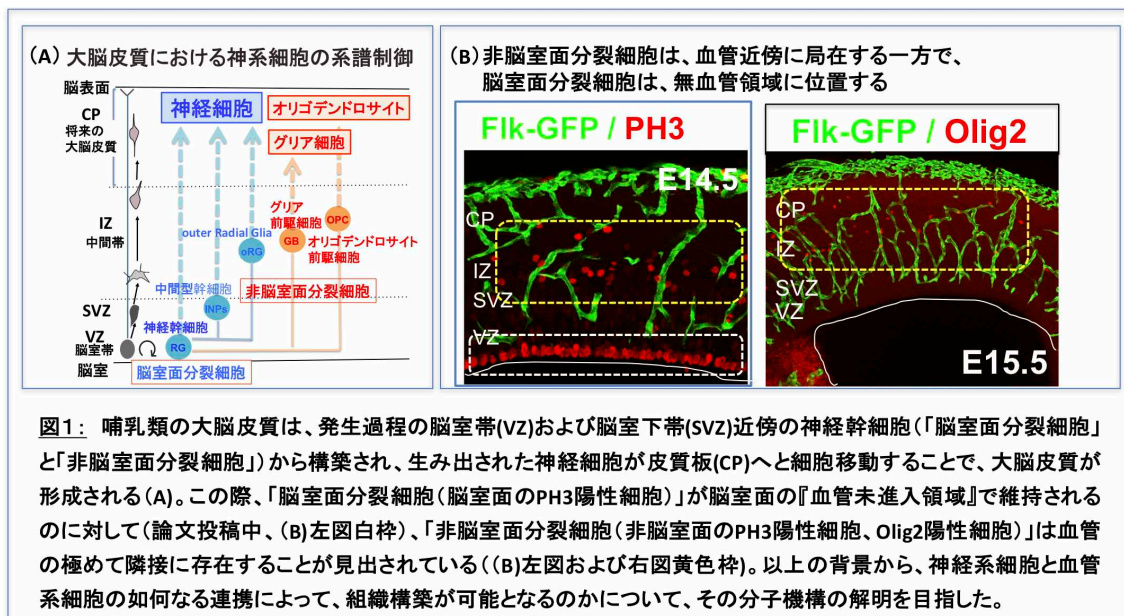
血管系と神経系は哺乳類の生体内で隈無く巡る二大ネットワークであるが、両者は生理的に(Mukoyama, *Cell* 2002)、また、病的な状態(Lambrechts, *Nat Genet* 2003)において密接に相互作用し、共通の誘導因子をもつ(Lu, *Nature* 2004)ことが報告されている。血管発生は、極めて精確なパターンニングで内皮前駆細胞の増殖と共に、神経堤由来の周皮細胞が動員されることで脈管形成(Vasculogenesis)が進行し、これが動脈と静脈の違い、血流を調節する生理機能に繋がると考えられている。

申請者らは、これまで、神経幹細胞の未分化性の維持に必須の役割を果たす Notch シグナルを解析し(Mizutani, *Development* 2005)、『多分化能を有する神経幹細胞 (脳室面分裂細胞)』と『制限された能力を持つ中間型幹細胞 (非脳室面分裂細胞など)』が Notch シグナルの強弱によって調節され(Mizutani, *Nature* 2007)、②この中で、強い Notch シグナルを利用する幹細胞では、HIF 応答配列を有する遺伝子群の発現が顕著に高いことを見出した。こうした背景から、神経幹細胞・前駆細胞の周囲に局在する毛細血管との間に働く分子機構に着目するに至った。

2. 研究の目的

血管は、組織細部にわたり養分や酸素を運搬する極めて重要な器官の一つであり、木の枝のごとく一定の組織空間に分布する。血管が空間に如何に伸展し、その伸展を止めるのかという、血管発生を調節する分子機構は未だ未解明の問題が数多く残されている。近年、血管の酸素養分の運搬路という基本的な機能に加えて、血管によって構築される微小環境 (niche) の概念が提唱されており、組織形成の理解において、幹細胞を支持する生物学的適所としての血管の役割に注目が集まっている。

大脳皮質は多種多様な神経細胞からなり、これらは全て発生期の神経幹細胞・前駆細胞から生み出されるが、皮質表面積の拡大を可能にする神経系幹細胞の系譜が (図 1 A 参照) 如何なる分子機構によって調節されるのかは不明である。近年、霊長類などの大脳皮質組織では、「非脳室面分裂細胞」の割合が顕著に増加することが明らかになっており、「非脳室面分裂細胞」の発生を制御する分子機構の明確化が期待されている。本研究では、これらの多様な神経幹細胞・前駆細胞の制御機構に迫るために、神経発生と血管発生の相互依存的な役割に着目した。これまでの申請者らの研究で、「脳室面分裂細胞」は『無血管領域』に存在する一方で、逆に「非脳室面分裂細胞」は密な血管網の分岐点に接する (図 1 B 参照) ことを明らかにしている (論文投稿中)。そこで、本研究では、神経系の幹細胞・前駆細胞系譜において、血管を必要としたり、逆に遠ざけたりするのは何故なのか? を明らかにすることで、大脳皮質の神経発生制御機構を新たな視点で明確化することを研究の目的とした。



3. 研究の方法

「脳室面分裂細胞」が無血管領域に位置する一方で、「非脳室面分裂細胞」は血管の極めて近傍に位置することが確認されている (上述)。この「非脳室面分裂細胞」には、ニューロン産生に寄与する Intermediate neural progenitors (INPs) や outer radial glia (oRG)、グリア細胞となる Glioblast (GB)、Oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) (図 1 A 参照) などの前駆細胞のいずれもが含まれる。発生期大脳皮質における、これら「非脳室面分裂細胞」の血管ニッチの実体は何なのか? また、血管近傍であれば、どこでも良いのか? こうした「非脳室面分裂細胞」の分子環境の実体を明確化することを目指す。まず、「非脳室面分裂細胞」と血管網の位置関係について、血管リポーターマウス (Flt-DsRed BACtg) を透明化処理し、200 μm 厚切片を

用いて(血管網の走行は薄切切片では分からないため)免疫染色を行い、コンフォーカル画像を取得後に三次元構築ソフトウェア(IMARIS)で画像解析を行う。これまでの研究で、ニューロン産生に寄与する中間型前駆細胞(INPs)とオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPCs)は極めて高頻度で血管と接触することが確認されている。そこで、INPsやOPCsは非特異的に血管と接触するのか、あるいは特異性を持って接触するのかについて、詳細に評価する。特異性が見出された場合は、*in vitro*で評価を加え、神経系前駆細胞-血管系細胞間の物理的な接触の意義を明確化する。

一方、「脳室面分裂細胞」は無血管領域に位置し、低酸素誘導因子HIF-1 α の制御を強く受けていることが、これまでの研究で明らかなることから、HIF-1 α -flox::Nestin-Cre^{ERT2}コンディショナルノックアウトマウスを作成し、脳室面分裂細胞におけるHIF1 α の欠損が、脳室面分裂細胞の分化調節に如何なる影響を与えるかについて解析を加える。以上により、脳室面と非脳室面で区別される血管由来の微小環境の生理的意義を追求する。

4. 研究成果

(1) 非脳室面分裂細胞であるBPとOPCsは、異なる血管ニッチを利用する

非脳室面分裂細胞は、SVZおよびIZ近傍で血管と高頻度で接触することから、接触の頻度、接触する領域を詳細に定量評価した。その結果、非脳室面分裂細胞は脳室面分裂細胞と比較して、極めて高頻度で血管近傍に位置することが確認された。また、BPはSVZ近傍、OPCsはIZ近傍で血管と接触する特徴が見出された。さらには、接触する血管系の細胞は、BPは周皮細胞と優先的に接触する一方で、OPCsは周皮細胞の巻き付きが緩い領域の内皮細胞へ直接接触する傾向が高いことが明らかとなった。そこで、BPと周皮細胞、OPCsと内皮細胞の共培養実験を行い、神経-血管の接触が及ぼす影響を評価したところ、周皮細胞と接触したBPは分化が一過的に抑制されることが見出された。また、内皮細胞と接触したOPCsについても、分化マーカーの発現が有意に抑制されることが確認された。これらの実験結果は、非脳室面で分裂する神経系の前駆細胞は、規則的に血管内皮細胞や周皮細胞と接触することで、組織構築の調節に寄与する可能性が見出された。

(2) 脳室面分裂細胞から非脳室面分裂細胞への移行は、HIF-1 α が重要な役割を果たす

これまでの研究で、脳室面分裂細胞である未分化な神経幹細胞は無血管領域に位置しており、脳室面分裂細胞は低酸素の影響を強く受けることが見出されている。そこで、神経幹細胞特異的にHIF-1 α をノックアウトしたマウス(HIF-1 α -flox::Nestin-Cre^{ERT2})を作成し、評価した。その結果、HIF-1 α コンディショナルノックアウトマウスの大脳皮質では、血管の規則性が大きく損なわれ、脳室面分裂細胞が減少する一方で、非脳室面分裂細胞であるBPやOPCsが増加することが明らかとなった。今後、脳室面と非脳室面で区別される血管環境がどのような分子機構によって制御されるのかについてさらなる知見が得られることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- ① K Mizutani, Physiological significance of the multipolar cells generated from neural progenitors for the establishment of neocortical cytoarchitecture. [review article] *Genes to Cells* 2018;23: 6-15. (査読有)
- ② Iwai R., Tabata H., Inoue M., Nomura K., Okamoto T., Ichihashi M., Nagata K. & Mizutani K. A Prdm8 target gene Ebf3 regulates multipolar-to-bipolar transition in migrating neocortical cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2018;495: 388-394. (査読有)
- ③ 水谷健一、神経と血管の連携がもたらす幹細胞の維持と分化の制御機構、生化学(基礎と臨床をつなぐ血管生物学) 2017;89: 384-390. (査読有)
- ④ Inoue M., Iwai R., Tabata H., Konno D., Suzuki-Komabayashi M., Watanabe C., Iwanari H., Mochizuki Y., Hamakubo T., Matsuzaki F., Nagata K. & Mizutani K. Prdm16 is crucial for progression of the multipolar phase during neural differentiation of the developing neocortex. *Development* 2017;144: 385-399. (査読有)
- ⑤ Matsushita J., Inagaki S., Nishie T., Sakasai T., Tanaka J., Watanabe C., Mizutani K., Miwa Y., Matsumoto K., Takara K., Naito H., Kidoya H., Takakura N., Nagai T., Takahashi T. & Ema M. Fluorescence and Bioluminescence of Angiogenesis in Flk1-Nano-lantern Transgenic Mice. *Scientific Reports* 2017;20:46597. (査読有)

[学会発表] (計8件)

- ① 水谷健一、大脳皮質における神経-血管の協調的な発生機構、日本薬学会 第139年会(シンポジウム)、2019年3月
- ② 水谷健一、神経分化過程の多極性形態期を制御する分子機構の解明、第41回日本分子生物学会(ワークショップ)、2018年11月
- ③ 水谷健一、Cross-talk between nervous and vascular systems is essential for neocortical development. 第61回日本神経化学会(アジア太平洋神経化学会/日本神経化学会ジョイントシンポジウム)、2018年9月

- ④ 水谷健一、大脳皮質神経分化過程における多極性形態細胞を制御する分子機構、第 2 回 Neuro-Vascular 研究会、2018 年 3 月
- ⑤ 水谷健一、大脳皮質における規則的な血管網の構築は、神経幹細胞および前駆細胞の分化を調節する、第 40 回日本分子生物学会（ワークショップ）、2017 年 12 月
- ⑥ 岩井亮太、井上真悠子、田畑秀典、今野大治郎、鈴木真理子、浜窪隆雄、松崎文雄、永田浩一、水谷健一、幹細胞で発現する Prdm16 はミトコンドリア ROS 量を規程することで、神経分化を調節する、第 40 回日本分子生物学会、2017 年 12 月
- ⑦ 水谷健一、発生期大脳皮質における血管発生の規則性は、神経分化を調節する、第 39 回日本分子生物学会（フォーラム）、2016 年 12 月
- ⑧ 水谷健一、Interdependency between neurogenesis and angiogenesis during neocortical development、第 88 回日本生化学会（シンポジウム）、2016 年 9 月

〔図書〕（計 2 件）

- ① 水谷健一、神経幹細胞、脳科学辞典（オンライン辞書）DOI:10.14931/bsd.2101
- ② 水谷健一、神経前駆細胞、脳科学辞典（オンライン辞書）DOI:10.14931/bsd.2102

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等