

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17024001

研究課題名（和文）脳の発生発達過程における神経幹細胞の増殖と分化を制御する分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Study on molecular mechanisms for regulating proliferation and differentiation of embryonic neural stem cells

研究代表者

大隅 典子 (OSUMI NORIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00220343

研究成果の概要（和文）：脳が発生・発達する過程において、「神経幹細胞」というタネのような細胞が分裂して数を増やし（増殖）、神経機能を営むのに特殊化した細胞に変化する（分化）することが必要である。本研究では神経幹細胞の増殖と分化において重要な働きをする分子である Pax6 の下で働く分子群を同定し、その機能について解析した。また、神経幹細胞を維持する機構として、細胞周期を制御する Cyclin D2 という因子の細胞内局在が重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We investigated molecular mechanisms of proliferation and differentiation of neural stem cells especially focusing on Pax6 transcription factor, a key regulator of brain development, and its downstream molecules. We also revealed that subcellular localization of Cyclin D2, a cell cycle regulator, is crucial to keep the neural stem cells proliferative.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	18,800,000	0	18,800,000
2006年度	14,200,000	0	14,200,000
2007年度	14,200,000	0	14,200,000
2008年度	14,800,000	0	14,800,000
2009年度	15,400,000	0	15,400,000
総計	77,400,000	0	77,400,000

研究分野：神経発生学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：神経発生、細胞増殖、細胞分化、転写因子、Pax6、タイムラプス解析、マイクロアレイ解析、神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の神経発生は、外胚葉が肥厚して神経板が形成されることに始まり、やがて神経板が陥入し神経管が形成される。神経管の上皮層すなわち神経上皮は盛んに細胞分裂を行うとともに、神経細胞やグリア細胞を産み出す。すなわち、神経上皮細胞は胎生期において神経幹細胞として機能する。その細胞周期は非常にダイナミックなプロセスであり、基底膜側と脳室側を結ぶ細長い細胞質を細胞核がエレベーターのように往復し、先端側すなわち神経管の内側に到達したときに

分裂期に入り、そこで二つの姉妹細胞に分裂する。神経上皮細胞の核はこのエレベーター運動を繰り返しながら、幹細胞としての性質を保持すると同時に、より分化した神経前駆細胞や神経細胞を生じる。生後においても、側脳室前方上衣下層や海馬歯状回の顆粒細胞下層には神経幹細胞が存在し、神経新生（neurogenesis）が生じていることが明らかになってきた。発生過程における神経新生に関して、神経上皮細胞で特異的に発現する転写因子が多数知られており（例えば Pax, Sox, POU, Mash, Ngn など）、本計画研究代表者は

とくに脳のパターンニングに重要であり、神経上皮で発現する転写因子 Pax6 の機能について解析してきた (総説 Osumi, 2001 およびその引用論文参照)。しかしながら、神経発生における転写因子同士の相互関係や直接の標的因子については未だ未知の部分が多い。さらに、細胞周期と細胞分化の調和を保つ分子機構に関してはほとんど手が付けられていないのが現状である。このような背景をもとに、本研究ではイメージングやマイクロアレイなどの最新の方法論も取りこむことにより分子細胞生物学的な解析を行い、哺乳類脳の発生発達過程における神経幹細胞の増殖と分化を制御する分子メカニズムを統合的に理解することを目指した。

2. 研究の目的

脊椎動物の中樞神経系の原基である神経管は、神経上皮から構成されている。この神経上皮を形成している神経上皮細胞は盛んに分裂を行うとともに、神経細胞やグリア細胞を産み出す。すなわち、神経上皮細胞は胎生期において神経幹細胞として機能する。この神経上皮細胞の核は細胞周期依存的な運動すなわち、エレベーター運動を繰り返しながら、幹細胞としての性質を保持すると同時に、より分化した神経前駆細胞や神経細胞を生じる。しかしながら、このような細胞周期と細胞分化の調和を保つ分子機構に関してはほとんど手が付けられていなかった。そこで本研究では、イメージングやマイクロアレイなどの最新の方法論も取りこむことによる分子細胞生物学的な解析を行い、哺乳類脳の発生発達過程における神経幹細胞の増殖と分化を制御する分子メカニズムを統合的に理解することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 神経上皮細胞の挙動のイメージング解析

神経上皮細胞は細胞周期に伴い非常にダイナミックな動態を示す。すなわち、基底膜側と脳室側を結ぶ細長い細胞質を細胞核がエレベーターのように往復し、先端側すなわち神経管の内側に到達したときに分裂期に入り、そこで2つの娘細胞に分裂する。神経上皮細胞の核はこのエレベーター運動を繰り返しながら、幹細胞としての性質を保持すると同時に、より分化した神経前駆細胞や神経細胞を生じる。そこで野生型およびエレベーター運動に異常が生じる変異体の脳原基のスライス培養系において、細胞分裂と分化の様相をタイムラプス観察した。

(2) 神経幹細胞の増殖と分化を統合する分子機構の網羅的解析

発生過程における神経発生に関して、神経上皮

細胞で特異的に発現する転写因子が多数知られている (例えば Pax, Sox, POU, Mash, Ngn など)。しかしながら、これら転写因子間の相互関係や、転写因子の下流で神経上皮細胞の増殖や分化を制御する因子に関する知見は、未だ断片的なものに留まっている。そこで、野生型脳と Pax6 遺伝子変異動物脳で発現する遺伝子のプロファイルをマイクロアレイ法を用いて比較し、定量 RT-PCR および *in situ* ハイブリダイゼーション法により発現様式を確認した。また脳の表現型に関するデータと照合することにより、神経幹細胞の増殖と分化を統合する分子機構を網羅的に解析した。また、得られた知見をもとに、電気穿孔法による遺伝子導入を行い、RNA 干渉法 (siRNA 法) による機能阻害や過剰発現による機能亢進法を用いて、細胞周期、核移動、細胞分化の制御をコーディネートする候補因子の機能解析を行った。

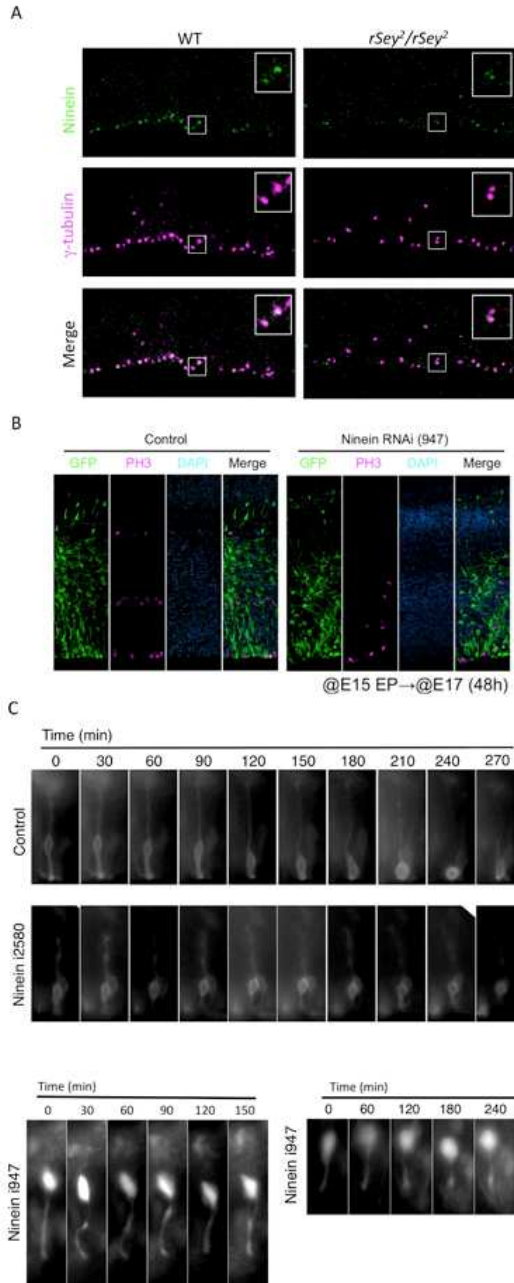
4. 研究成果

(1) Pax6 変異ラット終脳の核運動と中心体の挙動

本研究を開始する以前に、転写制御因子 Pax6 遺伝子の変異ラット終脳における神経上皮細胞のイメージング解析を行い、Pax6 は S-G2 期における中心体位置を正確に定めることにより、細胞周期依存的な核運動であるエレベーター運動を制御している可能性を指摘した (Tamai et al. 2007)。さらに Pax6 変異胚の神経幹細胞において中心体を中心とした微小管形成能の低下が認められた。そこで、神経発生におけるエレベーター運動の制御機構をさらに明らかにするために、Pax6 変異胚における、終脳の脳室面側タンパク質の局在変化に注目した。これまでに中心体構成因子の一つである ninein は、Pax6 変異胚の神経上皮細胞において、その発現が減少していることを明らかにした (図 1A)。

この ninein は中心体と微小管を繋ぐ役割を果たしていることから、Pax6 変異ラット終脳において認められるエレベーター運動の異常は、このような ninein の中心体局在低下によって説明できるのではないかと考え、RNAi による ninein 機能低下実験によって解析を行なった。その結果、ninein 発現低下領域において、それぞれ S 期、M 期のマーカーである BrdU、PH3 陽性細胞の分布に異常が認められた (図 1B)。さらにスライス培養系におけるタイムラプスイメージング解析により、ninein が発現低下した神経上皮細胞は、非脳室面における分裂などのエレベーター運動の異常が認められた (図 1C)。

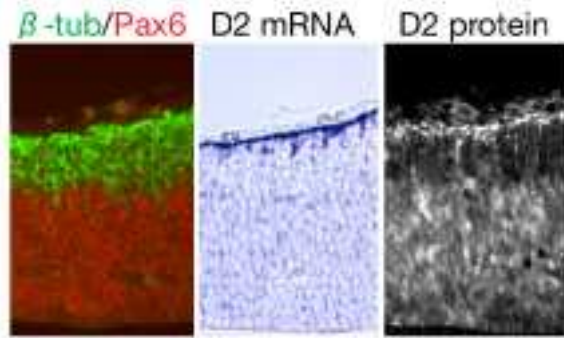
以上のことから、Pax6 の下流で中心体タンパク質 ninein がエレベーター運動の制御に関与していると考えられる。



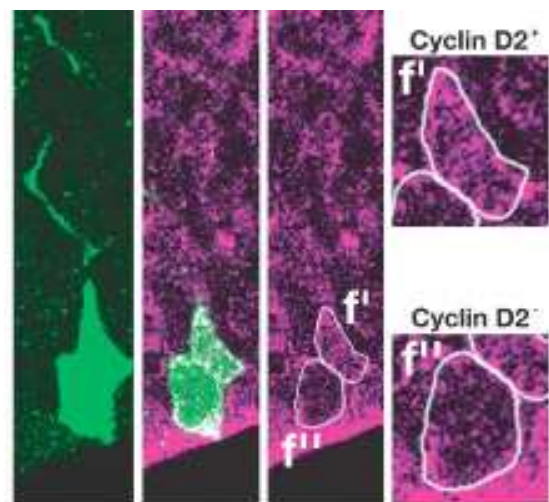
(2) 細胞周期調節因子の細胞内局在と神経上皮細胞のニューロン分化に対する機能についての解析

細胞の増殖と分化は細胞内において機能する細胞周期調節因子サイクリンの核内におけるタンパク質量や活性の時間的および空間的な制御のもとに成り立つと考えられる。G1/S 期移行に関与すると考えられている CyclinD2 (図 2) 遺伝子に注目し、ニューロン分化制御における局在機構の意義について解析を行った。

これまでに、EGFP に *CyclinD2* mRNA 3' UTR 配列を結合させた各種欠失コンストラクトを作製し、*CyclinD2* mRNA の細胞内輸送制御



機構を解析した。mRNA の輸送 cis 配列は *CyclinD2* mRNA (1-6274bp) のうち 3965-4015bp 以内に存在し、これらは新規の制御配列であることが明らかとなった。さらに siRNA を用いた *CyclinD2* mRNA のダウンレギュレーション実験により、細胞内で局所的に輸送された *CyclinD2* mRNA は局所的に翻訳されていることが強く示唆された。これらにより我々は、*CyclinD2* mRNA およびタンパク質が神経上皮細胞の基底膜側の細胞突起の末端に局在することを突き止めてきた。さらに、細胞をウイルスでまばらに標識した後分裂直後の細胞において *CyclinD2* タンパク質の局在パターンを観察したところ、*CyclinD2* は基底膜側の細胞突起と一緒に非対称に娘細胞に局在していることが観察された。さらに、*CyclinD2* を過剰発現させ、娘細胞間での *CyclinD2* タンパク質非対称性を乱すと、神経上皮細胞はより未分化性を維持し、逆に *CyclinD2* の発現を抑え両方の娘細胞が *CyclinD2* を発現していないと、よりニューロンに分化することが新たに分かった (図 3)。



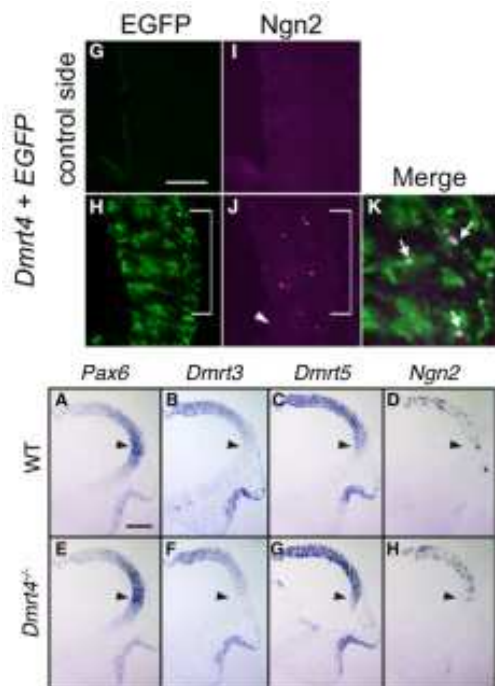
これらの結果を合わせて考察すると、*CyclinD2* は基底膜面側の細胞突起に局在することによって細胞分裂の際娘細胞に非対称に分配され、それが神経上皮細胞の分化と増殖の運命を決定している可能性が示唆された。

(3) 神経幹細胞の増殖と分化を統合する分子機構の網羅的解析

胎齢 11.5 日のラット胚前脳を用いたマイクロアレイ解析により、Pax6 の下流因子として転写因子 Dmrt4 (doublesex and mab related transcription factor 4) を見いだした。Dmrt4 は終脳背側領域に特異的な発現を示し、Pax6 変異ホモ接合胚ではほとんど発現が見られなかった (図 4)。Dmrt4 の発現領



域は Pax6 の標的分子である、bHLH 型転写因子 Neurogenin2 (Ngn2) の発現領域と重なっていた。アフリカツメガエル胚の嗅上皮において、Ngn2 の発現が Dmrt4 によって制御される報告はあるが、哺乳類脳において Dmrt4 の機能は未だ明らかにされていない。本研究では、Dmrt4 の機能獲得および機能喪失実験により、Pax6 が Dmrt4 を介して Ngn2 の発現を制御する新規遺伝子カスケードの存在について検証した。Dmrt4 を野生型ラット胚終脳腹側領域に電気穿孔法により強制発現させると、Ngn2 の発現が異所的に誘導され、さらに Dmrt4 を *rSey²/rSey²* 胚の終脳背側領域に強制発現させると、Ngn2 の発現が救済された (図 5)。しかしながら、Dmrt4 knockout (KO)



マウス胚での Ngn2 の発現様式は、野生型と比べて変化は見られなかった。終脳には他の Dmrt ファミリー遺伝子である Dmrt3 および Dmrt5 が発現し、Dmrt4 KO マウス胚において Dmrt3 および Dmrt5 の発現は維持されていた (図 5)。これら結果から、Ngn2 の発現を誘導する Dmrt4 の機能を Dmrt3 および Dmrt5 が代償する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 22 件)

- ① Takahashi, M. and Osumi, N.: The Method of Rodent Whole Embryo Culture using the Rotator-type Bottle Culture System. *Journal of Visualized Experiments*. 査読有, **42**, 2010.
- ② Numayama-Tsuruta, K., Arai, Y., Takahashi, M., Sasaki-Hoshino, M., Funatsu, N., Nakamura, S. and Osumi, N.: Downstream genes of Pax6 revealed by comprehensive transcriptome profiling in the developing rat hindbrain. *BMC. Dev. Biol.* 査読有, **10(6)**, 2010.
- ③ Takahashi, M. and Osumi, N.: Expression study of cadherin 7 and cadherin 20 in the embryonic and adult rat central nervous system. *BMC. Dev. Biol.* 査読有, **8(1)**, e87, 2008.
- ④ Takahashi, M., Nomura, T. and Osumi, N.: Transferring genes into cultured mammalian embryos by electroporation. *Dev. Growth Differ.* 査読有, **50(6)**, 485-497, 2008.
- ⑤ Osumi, N., Shinohara, H., Numayama-Tsuruta, K. and Maekawa, M.: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells*. 査読有, **26(7)**, 1663-1672, 2008.
- ⑥ Nomura, T., Takahashi, M., Hara, Y. and Osumi, N.: Patterns of neurogenesis and amplitude of Reelin expression are essential for making a mammalian-type cortex. *PLoS ONE*. 査読有, **3(1)**, e1454, 2008.
- ⑦ Takahashi, M. and Osumi, N.: Live Imaging of neuroepithelial cells in the rat spinal cord by confocal laser-scanning microscopy. *Bionanotechnology Based Future Medical Engineering Proceedings of the Final Symposium of the Tohoku University 21st Century Center of Excellence Programme*, Imperial College Press. 査読無, 1, 211-220, 2007.

- ⑧ Tsunekawa, Y., Takahashi, M. and Osumi, N. : Labeling of neuroepithelial cells using whole embryo culture and gene transfer methods to characterize the cell cycle. *Bionanotechnology Based Future Medical Engineering Proceedings of the Final Symposium of the Tohoku University 21st Century Center of Excellence Programme, Imperial College Press.* 査読無, **1**, 203-210, 2007.
- ⑨ Numayama-Tsuruta, K. Arai, Y. and Osumi, N. : The rat small eye homozygote (rSey2/rSey2) can be regarded as a Pax6 null mutant. *Bionanotechnology Based Future Medical Engineering Proceedings of the Final Symposium of the Tohoku University 21st Century Center of Excellence Programme, Imperial College Press.* 査読無, **1**, 151-162, 2007.
- ⑩ Nomura, T. and Osumi, N. : Manipulating mammalian embryos for research on the developing cerebral cortex. *Bionanotechnology Based Future Medical Engineering Proceedings of the Final Symposium of the Tohoku University 21st Century Center of Excellence Programme, Imperial College Press.* 査読無, **1**, 17-22, 2007.
- ⑪ Nomura, T., Haba, H. and Osumi, N. : Role of a transcription factor Pax6 in the developing vertebrate olfactory system. *Dev Growth Differ.* 査読有, **49(9)**, 683-690, 2007.
- ⑫ Tamai, H., Shinohara, H., Miyata, T., Saito, K., Nishizawa, Y., Nomura, T. and Osumi, N. : Pax6 transcription factor is required for the interkinetic nuclear movement of neuroepithelial cells. *Genes Cells.* 査読有, **12(9)**, 983-996, 2007.
- ⑬ Arai, Y., Funatsu, N., Numayama-Tsuruta, K., Nomura, T., Nakamura, S. and Osumi, N. : Role of *Fabp7*, a downstream gene of Pax6, in the maintenance of neuroepithelial cells during early embryonic development of the rat cortex. *J Neurosci.* 査読有, **25(42)**, 9752-9761, 2005.
- [学会発表] (計 98 件)
- ① Shinohara, H., Miyata, T., Takahashi, M. and Osumi, N. : Centrosomal protein ninein may control interkinetic nuclear migration in neuroepithelial cells. Society of Neuroscience 40th Annual Meeting, Neuroscience 2010 2010 年 11 月 14 日 San Diego, CA, USA
- ② Tsunekawa, Y., Joanne, Brito., Takahashi, M., Seng-Song, Tan. and Osumi, N. : Spatiotemporal post-transcriptional regulation of Cyclin D2 mRNA induces asymmetrical cell fates in neuroepithelial cells and self-organization of corticogenesis. Society of Neuroscience 40th Annual Meeting, Neuroscience 2010 2010 年 11 月 14 日 San Diego, CA, USA
- ③ Kikkawa, T., Fukuzaki, U., Numayama-Tsuruta, K., Takahashi, M. and Osumi, N. : Analysis of *Dmrt4* as a downstream gene of Pax6 in early development of the telencephalon. Society of Neuroscience 40th Annual Meeting, Neuroscience 2010 2010 年 11 月 14 日 San Diego, CA, USA
- ④ Shinohara, H., Takahashi, M. and Osumi, N. : Centrosomal protein ninein may control interkinetic nuclear migration in neuroepithelial cells. 第 43 回日本発生物学会年会 2010 年 6 月 21 日 京都
- ⑤ Shinohara, H., Miyata, T., Takahashi, M. and Osumi, N. : Centrosomal protein ninein may control interkinetic nuclear migration in neuroepithelial cells. 日本分子生物学会第 10 回春期シンポジウム 2010 年 6 月 7 日 松島
- ⑥ 高橋将文、大隅典子 : Pax6 is involved in specification of rhombomere boundary cells in the rat hindbrain. 日本分子生物学会第 10 回春期シンポジウム 2010 年 6 月 7 日 松島
- ⑦ 恒川雄二、高橋将文、大隅典子 : Spatiotemporal post-transcriptional regulation of Cyclin D2 mRNA induces asymmetrical cell fates in neuroepithelial cells and self-organization of corticogenesis. 第 4 回 神経発生討論会 2010 年 3 月 19 日 岡崎
- ⑧ 大隅典子 : Molecular mechanisms of interkinetic nuclear migration and asymmetrical fate decision in neuroepithelial cells. 特定領域研究「細胞増殖制御」主催 国際シンポジウム”Cell Cycle and Development” 2010 年 3 月 17 日 京都
- ⑨ Osumi, N. : Spatiotemporal Post-Transcriptional Regulation of Cyclin D2 mRNA Induces Asymmetrical Cell Fates in Neuroepithelial Cells and Self-Organization of Corticogenesis. The 56th NIBB Conference Neocortical Organization. 2010 年 3 月 12 日 岡崎

- ⑩ Osumi, N. : Molecular mechanisms of neurogenesis, a key event in development and maintenance of the brain. Construction and Reconstruction of the Brain. 2009年10月8日 淡路島
- ⑪ 恒川雄二、高橋将文、大隅典子 : Spatiotemporal post-transcriptional regulation of Cyclin D2 mRNA induces asymmetrical cell fates in neuroepithelial cells and self-organization of corticogenesis. 第32回日本神経科学大会 2009年9月17日 名古屋
- ⑫ Osumi, N. : The neurogenesis-controlling factor, Pax6, inhibits proliferation and promotes maturation in murine astrocytes. 38th Annual Meeting of Society of Neuroscientists 2008年11月16日 Washington DC, USA
- ⑬ Osumi, N. : Pax6: a multiple regulator for neurogenesis and gliogenesis. Tohoku Neuroscience Global COE The 1st Brain Science Summer Retreat in Matsushima "New Era of Neuroscience -From molecules to Society" 2008年8月20日 松島
- ⑭ Osumi, N. : The role of Pax6 and its downstream molecules in embryonic and postnatal neurogenesis. 第41回日本発生生物学学会 2008年5月28日 徳島
- ⑮ Osumi, N. : The role of Pax6 in embryonic and postnatal neurogenesis. 1st international conference of GCOE in ZA0 2008年1月23日 蔵王
- ⑯ Osumi, N. : Neurogenesis: a key for brain development and maintenance. 京都大学再生医科学研究所国際シンポジウム2007 2007年9月19日 京都
- ⑰ Tsunekawa, Y., Takahashi, M. and Osumi, N. : The localization of CyclinD2 mRNA and protein in endfeet of neuroepithelial cells during murine cortical development. IBRO world congress of neuroscience, Satellite Meetings 2007年7月9日 Cairns
- ⑱ 野村 真、大隅典子 : 発生期の哺乳類と鳥類終脳における神経細胞分化、移動過程の比較解析. 日本分子生物学学会 2006 フォーラム 2006年12月8日 名古屋

[図書] (計6件)

- ① Nomura, T., Takahashi, M. and Osumi, N. : Electroporation into cultured mammalian embryos. Springer 2009, 129-141
- ② 松本葉子、大隅典子 : 神経新生の分子生物学と生理機能 : 学習 Clinical

Neuroscience 2008, 853-856

- ③ 前川素子、大隅典子 : FABP7 遺伝子 先端医学社 分子精神医学 2008, 64-67
- ④ 松本葉子、大隅典子 : 脳発生における Pax6 の機能とその異常 医学書院 RAIN and NERVE 2008, 365-374
- ⑤ 大隅典子、久恒辰博 : 「Neurogenesis 2007」にみるニューロン新生研究の新風 羊土社 実験医学 **25(12)**, 2007, 1838-1839
- ⑥ 大隅典子 訳 : エッセンシャル発生生物学 改訂第2版 Jonathan Slack 著 羊土社 2007, 333

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称 : 神経再生剤
 発明者 : 大隅典子、前川素子
 権利者 : 大隅典子、前川素子
 種類 : 出願 (PCT)
 番号 : PCT/JP2007/075403
 出願年月日 : 2006年11月7日
 国内外の別 : 国内・国外

○取得状況 (計0件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大隅 典子 (OSUMI NORIKO)
 東北大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号 : 00220343

(2) 研究分担者

高橋 将文 (TAKAHASHI MASANORI)
 東北大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号 : 20361074

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :