

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07061

研究課題名(和文) 転写因子Neurog1/2による大脳皮質神経サブタイプ決定機構

研究課題名(英文) Subtype specification of cortical neurons by transcription factors Neurog1/2

研究代表者

大石 康二(Oishi, Koji)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任講師

研究者番号：80420818

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)：大脳皮質は、性質の異なる種々の神経細胞(サブタイプ)から構成され、これらは共通の神経前駆細胞から時期依存的に次々と生み出される。この様式は、神経前駆細胞の分化能の時間的な変化によって説明されてきたが、その分子的機構はほとんど解明されていなかった。この仕組みの解明のため、本研究では転写因子Neurog1/2に注目した。Neurog1/2は、神経発生のすべての時期で前駆細胞に発現するが、深層サブタイプの決定に特異的に関与する。研究の結果、深層サブタイプの産生に、Neurog1/2の活性制御とエピジェネティック因子のポリコム抑制複合体が重要であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Neurog1/2による特異的サブタイプ決定メカニズムの分子機構を明らかにし、さらにそれが時期選択的に活性化される機構を明らかにした。すなわち、Neurog1/2によるCTニューロンの分化決定は特定の時期だけで“ON”になるが、この“ON”の状態は、Neurog1/2の転写活性の制御、及びポリコム抑制複合体によって制御されることが分かった。これまで神経前駆細胞の分化能の時間的な変化に関しては、時期依存的な転写因子の発現という単純なモデルが考えられていた。本研究の結果から、「時間的な変化」が転写レベルとエピジェネティックなレベルという多階層で制御されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The cerebral cortex is composed of hundreds of different subtypes of neurons, which are sequentially generated from common neural progenitor cells. This sequential specification has been interpreted as a result from the sequential changes of differentiation potential of progenitor cells. However, the molecular mechanisms regulating this sequential changes have been poorly understood. We focused on transcription factors Neurog1/2, which are expressed by neural progenitor cells throughout cortical neurogenesis but only participate in subtype specification of deep layer neurons. We found the importance of the temporal regulation of transcriptional activity of Neurog1/2 and the epigenetic regulation by polycomb repressive complexes.

研究分野：神経発生分野

キーワード：大脳皮質 神経系前駆細胞 神経分化 転写因子

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質は、形態・神経連絡様式・遺伝子発現などが異なる種々の神経細胞（サブタイプ）から構成される。すべての大脳皮質の神経サブタイプは、共通の神経前駆細胞から時期依存的に次々と生み出される。神経細胞が生まれるタイミングと、最終的に分化するサブタイプに高い相関性があることから、神経細胞は生まれたときにどのサブタイプになるか既に運命付けされていると考えられてきた。すなわち、神経前駆細胞の時期依存的な分化能の変化が、異なる神経サブタイプを生み出すとの仮説が考えられてきた。しかしながら、その分子的機構はほとんど解明されていなかった。

一方で、分化・成熟過程の神経において特定のサブタイプへ分化する分子機構については、近年の研究から複数の因子が明らかになってきた。我々は、浅層神経のサブタイプ決定メカニズムについて研究を行い、Pcdh20やRorb-Brn1/2が重要であることを報告した。しかしながら、これらの遺伝子のほとんどは、最終分裂を終えた神経細胞で発現を開始するものであり、前駆細胞でのサブタイプ決定の制御については、依然未解明のままであった。

この時期依存的なサブタイプ産出メカニズム解明のため、本研究では、神経前駆細胞に特異的に発現し、サブタイプ決定に関与する転写因子 Neurogenin1/2 (Neurog1/2)に注目した。Neurog1/2は、神経前駆細胞が神経へ分化するのに極めて重要な因子であり、神経発生のすべての時期で前駆細胞に発現する。一方、この転写因子が神経発生の早期に起こる深層のサブタイプの決定に関与することが報告されていた。

2. 研究の目的

これまでの研究から、Neurog1/2による深層サブタイプ決定機構が神経前駆細胞で時期依存的に制御される可能性が考えられた。そこで本研究では、Neurog1/2による深層サブタイプ決定の分子機構を明らかにし、さらにそれが時期依存的にどのように制御されるか解明を目指した。

(1) Neurog1/2による深層サブタイプ決定の分子機構

Neurog1/2は転写因子であり、何らかの下流遺伝子の発現誘導を介して機能する。独自のデータベースから、Neurog1/2によって制御され得る候補分子を複数同定しており、実際にどの分子を介してサブタイプ決定を制御するか明らかにする。

(2) 深層サブタイプ決定機構の時期依存的制御

Neurog1/2は神経前駆細胞に恒常的に発現するが、Neurog1/2が関与する深層神経の産出は、神経発生の早期にしか起こらない。そこで、この分化機構の時期依存的な制御を明らかにする。

3. 研究の方法

マウス

Neurog1、Neurog2のノックアウトマウスは過去に報告されたものを用いた(Schuermans et al., 2004)。野生型マウスとしてはICRマウス(日本SLC)を用いた。プラグ確認日を胎生0.5日目とした。

プラスミド

過剰発現ベクターはpCAGGSを用い、chicken b-actinプロモーターで発現を誘導した。ノックダウンベクターはpSuperを用い、H1プロモーターによってshRNAを発現させた。レポーター遺伝子はpGL4ベクターを用いた。

子宮内エレクトロポレーション法

妊娠マウスの手術および子宮内の胚操作は、日本神経科学会による動物実験に関するガイドラインに準拠した。胎生12.5日目、あるいは13.5日目妊娠マウスを深く麻酔し、帝王切開の後に子宮を露出させた。精製したプラスミドDNAをPBSに1-5 µg/µlの濃度で溶解し、Fast Green溶液(0.1%)を1:10の比率でプラスミド溶液に添加し、注入液を可視化した。先端を尖らせたガラス製マイクロピペットを用いて、約1 µlのプラスミド溶液を注入した。子宮内の胚を、先端に直径3 mmのディスク電極を有するピンセット型電極(CUY650P3)の間に置いた。電子パルス(31V(胎生12.5日目)、32V(胎生13.5日目); 50 ms)をエレクトロポレーター(NEPA21)を用いて950 msの間隔で5回与えた。子宮を腹腔内に戻し縫合の後、妊娠マウスを温め、麻酔から回復させた。

免疫組織化学染色

生後マウスを4% PFA溶液で灌流固定した後、脳を取り出しさらに数時間固定を行った。20% ショ糖溶液に溶液を置換し、OCT-compound中に包埋し、低温下で凍結した。クライオスタットを用い、凍結脳から14 µmの切片を作製した。

免疫組織化学染色は常法に従って行った。使用した一次抗体は、抗Satb2抗体(Abcam)、抗Bcl11b抗体(Abcam)、抗Foxp2抗体(Santa Cruz Biotechnology)、抗Zfp2抗体(Santa Cruz Biotechnology)、抗Tbr1抗体(Abcam)、抗GFP抗体(MBL)である。

4. 研究成果

(1) Neurog1/2 による深層サブタイプ決定の分子機構

Neurog1/2 が大脳皮質深層サブタイプの決定に関与することが報告されていたが、深層には複数のサブタイプが含まれるため、Neurog1/2 が実際にどのサブタイプの分化を制御するか検討した。Neurog1/2 欠損マウスにおけるサブタイプ特異的なマーカーを用いた解析から、この因子が深層の中でも特に第6層の皮質視床投射神経（CTニューロン）の分化に重要であることが明らかになった（図1A）。また、Neurog2 の過剰発現により、CTニューロンへのサブタイプ決定が亢進することも明らかになった（図1B）。

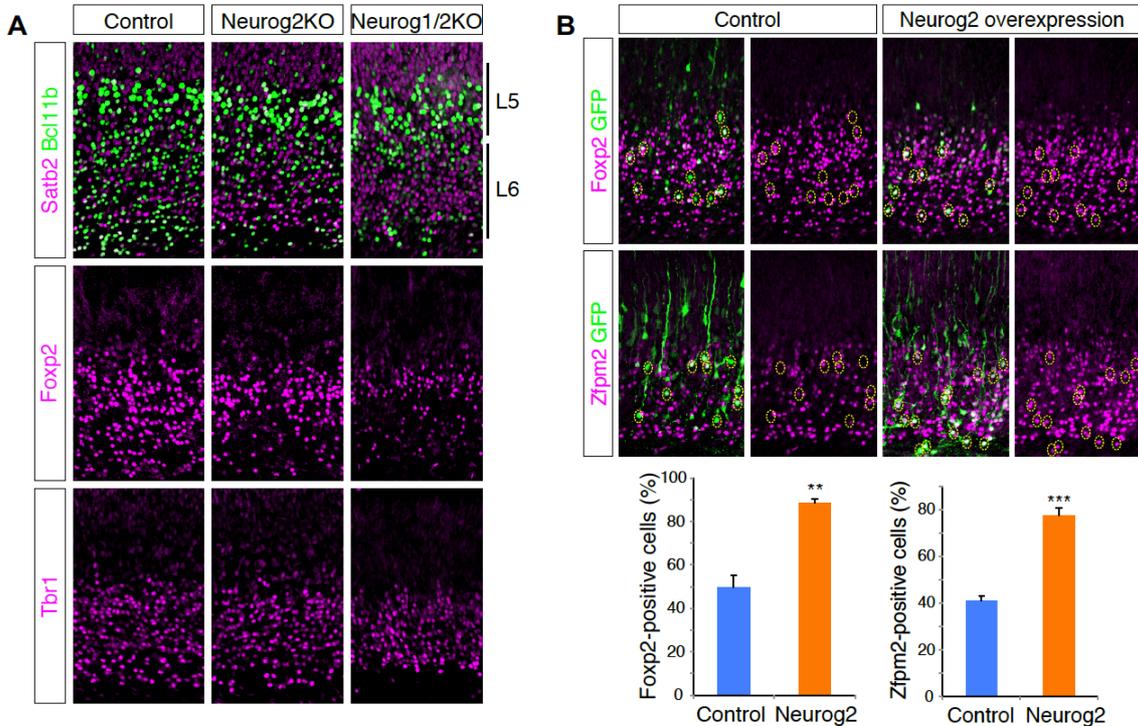


図1. Neurog1/2 による皮質視床投射神経（CTニューロン）のサブタイプ決定

(A) Control、Neurog2KO、Neurog1/2KO の大脳皮質を示した。CTニューロンのマーカーとして Bcl11b、Foxp2、皮質間投射ニューロンのマーカーとして Satb2 を用いた。Tbr1 は6層のサブタイプに共通して発現している。
(B) 野生型の胎生12.5日目マウス脳に Neurog2 を過剰発現し、6日後CTニューロンマーカー（Foxp2、Zfp2）の発現を調べた。

さらに、Neurog1/2 がどのようにして CTニューロンサブタイプを決定するのか解析を行った。まず、既に所有していたデータベースの解析などから、候補遺伝子を見出した。さらなる解析の結果、深層サブタイプの分化に重要な転写因子である Fezf2 遺伝子の近傍に Neurog2 が結合すること、Fezf2 の発現量は Neurog1/2 欠損マウスで減少し、逆に Neurog2 の過剰発現で上昇することを見出した。さらに、Neurog2 の過剰発現による皮質視床投射神経への分化決定の亢進が、Fezf2 の発現抑制時には起きないことが明らかになった。これらの結果から、Neurog1/2 が直接 Fezf2 の発現を誘導することによって CTニューロンの分化決定を制御することがわかった。

(2) 深層サブタイプ決定機構の時期依存的制御

Neurog1/2 による CTニューロンの分化決定機構が明らかになったため、次にどうしてこの機構が大脳皮質発生の早期にしか起こらないのか検討を行った。

まず、Neurog1/2 の転写活性化能が時間に伴い変化しているか解析を行った。Neurog1/2 のレポーター遺伝子を早期と後期の神経前駆細胞に導入したところ、その転写活性化能が約半分に減少することが明らかになった（図2A）。そこで、この減少分を補うべく Neurog2 を過剰したところ、転写活性化量は回復したものの、CTニューロンへの分化は起こらなかった（図2B）。したがって、Neurog1/2 の活性は変化しているものの、これだけでは Neurog1/2 による CTニューロン分化決定の時期選択性は説明できないことが分かった。

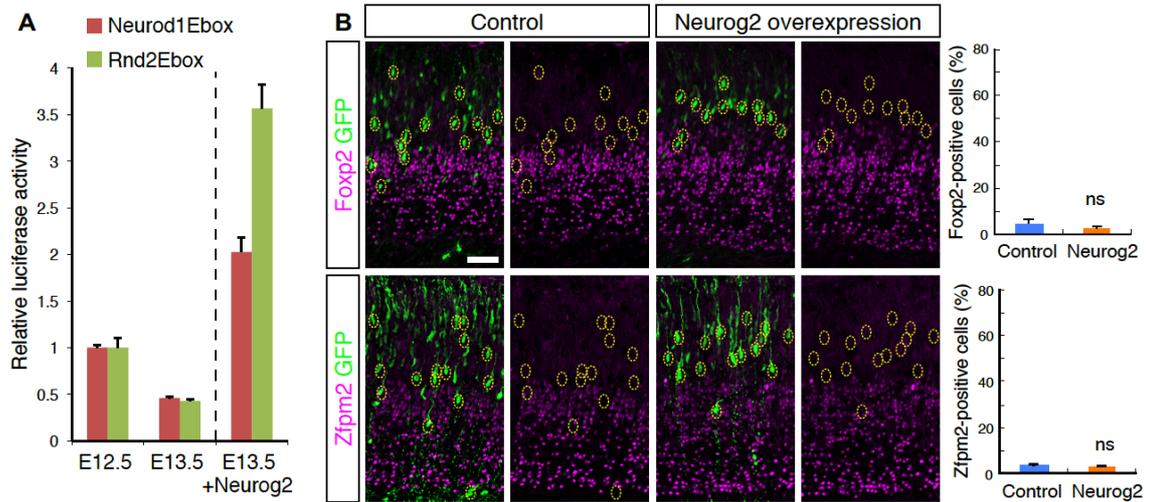


図2. 後期神経前駆細胞における Neurog1/2 による CT ニューロンサブタイプ亢進の抵抗性
 (A) 胎生 12.5 日目、13.5 日目マウス脳にレポーター遺伝子 (Neurod1Ebox-Luc、Rnd2Ebox-Luc) を導入し、Neurog1/2 の転写活性化能を測定した。
 (B) 野生型の胎生 13.5 日目マウス脳に Neurog2 を過剰発現し、5 日後 CT ニューロンマーカー (Foxp2、Zfp2) の発現を調べた。

そこで次に、別の分子機構の関与を解析した。ポリコム抑制複合体 (PRC) がサブタイプ分化のタイミング決定に関与するという報告があり、この複合体の関与について検討した。まず、PRC2 の必須コンポーネントある Eed をノックダウンし、サブタイプ分化に対する影響を検討した。その結果、CT ニューロンのマーカー発現などを含め、CT ニューロンの特徴は観察されなかった (図 3A)。Neurog1/2 の機能が遅い時期では抑制されていることを一方で明らかにしていたため、次に Eed のノックダウンと共に Neurog2 の過剰発現を行い、サブタイプ分化に対する影響を検討した。その結果、多くの細胞で CT ニューロンのマーカーの発現が観察された (図 3A)。さらに、CT ニューロンに特徴的な軸索投射パターンも観察された (図 3B)。

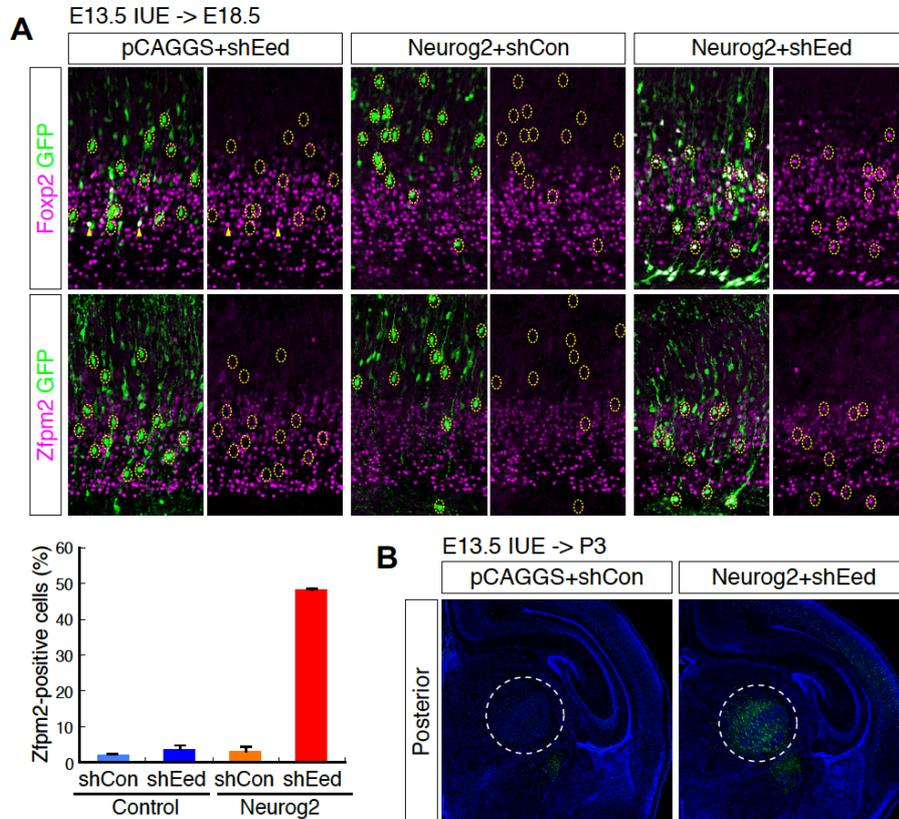


図3. 後期神経前駆細胞から CT ニューロンサブタイプへの分化誘導
 (A) 胎生 13.5 日目マウス脳に Control shRNA (shCon)、Eed shRNA (shEed)、Neurog2 遺伝子を導入し、5 日後 CT ニューロンマーカー (Foxp2、Zfp2) の発現を調べた。
 (B) (A) と同様な遺伝子導入を行い、生後 3 日齢の脳を観察した。Neurog2+Eedsh を発現したニューロンの軸索が背側視床 (丸点線で表した) に観察された。

本研究では、Neurog1/2による特異的サブタイプ決定メカニズムの分子機構を明らかにし、さらにそれが時期選択的に活性化される機構を明らかにした。すなわち、Neurog1/2によるCTニューロンの分化決定は特定の時期だけで“ON”になるが、この“ON”の状態は、Neurog1/2の転写活性の制御、及びポリコム抑制複合体によって制御されることが分かった。これまで神経前駆細胞の分化能の時間的変化に関しては、時期依存的な転写因子の発現という単純なモデルが考えられていた。本研究の結果から、「時間的変化」が転写レベルとエピジェネティックなレベルという多階層で制御されることが示唆された。

現在、さまざまな疾患に対して、iPS細胞などから作り出した、治療に必要な特定の細胞を移植して治療する細胞治療が注目されている。このような治療には、細胞分化を厳密に制御することが肝要である。本研究の対象である前駆細胞での分化制御は、分化過程の初期のイベントであり、分化のヒエラルキーの最上位に位置する可能性が高い。このような初期過程での分化制御を試験管内で神経細胞を作り出す際に応用することにより、より厳密・完全に特定の機能をもつ神経細胞を作り出すことができると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Koji Oishi, Debbie L. C. van den Berg, and Francois Guillemot	4. 巻 -
2. 論文標題 Temporal control of cortico-thalamic neuron specification by regulation of Neurogenin activity and Polycomb repressive complexes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/431684	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Koji Oishi and Kazunori Nakajima	4. 巻 43
2. 論文標題 Subtype specification of cerebral cortical neurons in their immature stages.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochem. Res.	6. 最初と最後の頁 238-244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-017-2441-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 4件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Koji Oishi and Kazunori Nakajima
2. 発表標題 Subtype specification of cortical neurons by the extracellular environment
3. 学会等名 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (ISDN2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koji Oishi and Kazunori Nakajima
2. 発表標題 In vivo reprogramming of postmitotic neocortical neurons into different neuronal subtypes
3. 学会等名 Symposium: “Developmental Biology in Stem Cell Research and Regenerative Medicine”、第70回日本細胞生物学会・第51回日本発 生生物学会合同大会（Asia-Pacific Developmental Biology Network共催）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koji Oishi and Kazunori Nakajima
2. 発表標題 Subtype specification and reprogramming of cortical neurons in progenitor cells and postmitotic immature neurons
3. 学会等名 Symposium: “Mechanisms of neuronal production and differentiation in the cerebral cortex”、第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会合同年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石康二、仲嶋一範
2. 発表標題 未成熟・成熟大脳皮質ニューロンにおけるサブタイプ転換（Fate Conversion of Subtypes in Immature and Mature Cortical Neurons）
3. 学会等名 ワークショップ: “脳発生プログラムの複雑化と、その進化”、第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koji Oishi, Kazunori Nakajima, and Francois Guillemot
2. 発表標題 Temporal control of cortico-thalamic neuron specification by regulation of Neurogenin activity and Polycomb repressive complexes
3. 学会等名 第50回日本発生生物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大石康二
2. 発表標題 未成熟な大脳皮質ニューロンにおけるサブタイプ決定
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Koji Oishi, Kazunori Nakajima, and Francois Guillemot
2. 発表標題 Temporal control of Foxp2 expression by Neurogenin and Polycomb repressive complexes regulates specification of cortico-thalamic neurons
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大石康二
2. 発表標題 未成熟神経における大脳皮質ニューロンのサブタイプ決定
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト 2017年度冬のシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉永怜史、本田岳夫、根本愛子、長谷川紘之、大石康二、久保健一郎、仲嶋一範
2. 発表標題 i-Gonadi法を用いて、発生期大脳皮質の細胞外環境が細胞に与える影響を効率的に解析する
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北澤彩子、シンミンギョン、林周宏、大石康二、久保健一郎、仲嶋一範
2. 発表標題 発生期の海馬と大脳新皮質における神経細胞の放射状グリア線維依存的な移動様式の違いについての解析
3. 学会等名 第54回TOKYOニューロサイエンス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大石康二、仲嶋一範
2. 発表標題 皮質下投射ニューロンの分化決定における転写制御機構
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会合同大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----