

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20770173

研究課題名（和文） 大脳皮質形成初期の神経前駆細胞の性質の解析

研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanisms regulating neural progenitor cells in the early neocortex

研究代表者

室山 優子 (MUROYAMA YUKO)

千葉大学・大学院医学研究院・特任講師

研究者番号：20422248

研究成果の概要（和文）：大脳皮質の形成過程において初期の神経前駆細胞は多種類の神経細胞を生み出す能力を持つ。研究代表者はその機構を明らかにするため、初期の神経前駆細胞で発現する遺伝子を多数同定してきた。本研究ではそれらのうち *Nepro* (*YNESI*) を中心として機能解析を行った。マウス大脳皮質の神経前駆細胞で *Nepro* を働かせると神経細胞への分化が抑えられ、*Nepro* の機能を抑えると神経分化は促進された。さらに、*Nepro* の発現は神経幹細胞の維持に中心的な役割を果たす Notch シグナルによって制御され、その機能において重要であることが明らかとなった。以上の結果から、*Nepro* は Notch の下流で大脳皮質の神経前駆細胞の維持に重要な役割を果たす因子であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the developing neocortex, neural progenitor cells (NPCs) produce neurons of the six cortical layers in a temporal order. Maintenance of NPCs is essential for the generation of distinct types of neurons at the required time. In this study, we identified *Nepro*, a gene expressed in the developing mouse neocortex at early stages. Misexpression of *Nepro* inhibits neuronal differentiation only in the early neocortex. Knockdown of *Nepro* by siRNA causes precocious differentiation of neurons. Expression of *Nepro* is regulated by Notch, which has been shown to be important for the maintenance of NPCs. These results indicate that *Nepro* is involved in the maintenance of NPCs in the early neocortex downstream of Notch.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：マウス、大脳皮質、神経前駆細胞、in vivo electroporation、Notch

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類の高次脳機能を担う大脳皮質は異なる種類の神経細胞が正しく生み出され、六層に配置されることにより形成される。大脳皮質の神経前駆細胞はくり返し分裂しながら、時間とともに生み出す細胞の種類を変えている。さらに、早い時期の神経前駆細胞は複数の種類の神経細胞を生み出す多分化能をもつが、その能力は発生の時間が進むにつれて失われていくことが示されている。このことから早い時期の神経前駆細胞は遅い時期の神経前駆細胞とは異なり、特徴的な分化能力をもつと考えられる。このような時間軸における神経前駆細胞の変化は分泌性シグナル分子に代表される細胞外からのシグナルと、それに応答する神経前駆細胞の内在性の性質の両者が必要であることが示されている。大脳皮質形成機構を分子レベルで明らかにするには、ダイナミックに変化する神経前駆細胞の性質の分子基盤を明らかにすることが重要である。

(2) 研究代表者は平成18年度から平成19年度に科学研究費補助金(若手研究B)「大脳皮質の発生過程における神経幹細胞の応答能」を受け、大脳皮質形成初期の神経前駆細胞の性質に関わる分子を明らかにすべく、大脳発生過程の早い時期と遅い時期の脳組織のESTライブラリーを *in silico* で比較することにより大脳発生過程の早い時期に発現する遺伝子を網羅的に探索した。その結果、時期特異的に神経前駆細胞で発現する遺伝子を多数得た。さらにそれらの発現パターンを解析した結果、大脳発生過程の早い時期に神経前駆細胞の存在する脳室層に特異的に発現し、機能が未知の遺伝子を多数得た。これらの遺伝子群は大脳皮質の形成初期の神経前駆細胞に発現することから *YNES*(genes expressed in young neural stem cells)と名づけた。*YNES* 遺伝子群は大脳皮質形成初期の神経前駆細胞の分子的な特徴の一端を担うと考えられ、これらの機能解析が神経前駆細胞の性質の理解に重要と考えられる。一部の遺伝子について電気穿孔法によりマウス大脳に強制発現させて予備的な機能解析を行った結果、その一つである *YNES1* が神経前駆細胞の分化を抑える作用をもつことを見出した。*YNES1* はヒトからゼブラフィッシュまで脊椎動物で保存され、既存のモチーフと相同性をもたない蛋白質

をコードする。これまでの解析により *YNES1* は胎生10日のマウス大脳領域に発現しはじめ、胎生11.5日前後の大脳神経前駆細胞に強く発現し、胎生15.5日の大脳神経前駆細胞でほぼ消失することから、大脳皮質形成過程の初期において特異的に発現すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は大脳皮質形成初期の神経前駆細胞の性質に焦点を絞り、神経前駆細胞で特異的に発現する *YNES* 遺伝子群の機能解析を行うことを目的とする。これにより、大脳皮質形成初期の神経前駆細胞の性質の分子基盤を作る。具体的にはマウス胎児大脳への遺伝子導入法などの独自の研究手法を駆使して、下記の実験を行う。1) 強制発現実験および機能阻害実験によりマウス大脳の神経前駆細胞における *YNES1* の役割を解析する。2) *YNES1* と Notch シグナル経路因子などの分化制御因子との関係を調べる。3) *YNES1* 蛋白質の細胞内局在および分子機能を明らかにする。4) 他の *YNES* 遺伝子群について神経前駆細胞における機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) *YNES1* の強制発現解析

YNES1 の作用を詳細に解析するため、*YNES1* と共に *EYFP* (Enhanced Yellow Fluorescent Protein) を発現させるダブルプロモーターベクターを発生の様々な時期のマウス大脳の神経前駆細胞で電気穿孔法により発現させ、*YNES1* の神経前駆細胞への作用を *EYFP* の蛍光を指標に解析する。細胞の増殖や分裂状態を知るため、胎児に *BrdU* を取り込ませて活発に分裂している細胞を標識し、*EYFP* と *BrdU* 抗体による染色像を比較し、*YNES1* の細胞増殖への影響を検討する。また *EYFP* と神経細胞のマーカー分子に対する抗体を用いた免疫染色により、*YNES1* を発現した細胞の分化の様子を詳細に解析する。

(2) *YNES1* の機能阻害実験

発生過程の大脳における *YNES1* の必要性を検証するため、*YNES1* の翻訳領域に対する *siRNA* を *EYFP* の発現ベクターとともに電気穿孔法によりマウス胎児の大脳に導入し、*siRNA* が導入された神経前駆細胞やそれ由来する神経細胞の挙動を *EYFP* の蛍光をもとに解析する。導入細胞に異常がみられる

場合は、神経前駆細胞や神経細胞のマーカー分子に対する抗体を用いた免疫染色により、*YNESI* の機能を抑制された細胞の分化状態を詳細に解析する。

(3) *YNESI* と Notch シグナル経路やプロニューラル遺伝子との関係の解析

YNESI の強制発現による神経分化抑制作用は Notch シグナル経路のエフェクター分子である *Hes1* の強制発現の作用と類似している。そこで *YNESI* と Notch シグナルの遺伝子発現での上下関係を明らかにするため、活性化型の Notch 分子を強制発現させた大脳での *YNESI* の発現の変化を検証する。さらに Notch シグナルを阻害する γ -セクレターゼ阻害剤を脳室内に注入した脳組織での *YNESI* の発現の変化を検証する。機能上の関係を明らかにするため、活性化型の Notch あるいは *Hes1* の発現ベクターとともに *YNESI* の siRNA を導入し、Notch シグナル経路の活性化を阻害できるかどうかを検証する。さらに *YNESI* を強制発現させる際にドミナントネガティブ体の *Hes1* 分子を共に発現させ、*YNESI* の分化抑制作用が阻害されるかについて検証する。神経前駆細胞から神経細胞に分化する過程でプロニューラル遺伝子が必要であることから、*YNESI* を強制発現させた脳におけるプロニューラル遺伝子の発現量を調べ、*YNESI* 遺伝子とプロニューラル遺伝子との関係を解析する。

(4) *YNESI* 蛋白質の分子機能の解析

YNESI のN末端あるいはC末端にタグを融合した蛋白質の発現ベクターを構築し、生体脳に遺伝子導入して発現させ、タグに対する抗体を用いて細胞内局在を調べる。細胞内器官等に特異的なマーカーに対する抗体と二重染色し、その局在を詳細に解析する。神経前駆細胞の分化の状態に応じた局在の変化についても検証する。核への局在が観察された場合には、*YNESI* の機能阻害や強制発現で発現変化がみられる遺伝子に対しての転写活性化能をルシフェラーゼアッセイにより調べると同時に、下流候補遺伝子の転写制御領域への結合をクロマチン免疫沈降法により検討する。

(5) 大脳皮質で発現する他の *YNES* 遺伝子の機能の解析

研究代表者が同定した大脳発生の早い時期で発現する他の *YNES* 候補遺伝子について発現ベクターを作製し、電気穿孔法により神

経前駆細胞で強制発現させる。それぞれの遺伝子は *EYFP* とともに発現させることで、*EYFP* の蛍光をもとに神経前駆細胞の形態や分布の異常を観察する。異常がみられた遺伝子については、細胞種特異的なマーカー分子の抗体染色によりその作用の詳細を示す。さらにそれぞれの *YNES* 遺伝子に特異的な siRNA を導入することにより、大脳皮質形成における必要性を解析する。神経前駆細胞に作用することが示唆される場合は、Notch シグナル経路等との関係を調べ、分化制御機構との位置づけを示す。また、同時期に発現する *YNESI* との関係を検証するため、*YNESI* と共に他の *YNES* 遺伝子の発現ベクターや siRNA を発現させ、両者の関係を示す。

4. 研究成果

研究代表者は *YNESI* の機能が神経幹細胞の維持に関わることから、*Nepro* (*a gene expressed in neural progenitor cells*) と名付けた。

(1) *YNESI* の強制発現解析

in vivo electroporation 法を用いて様々な時期のマウス大脳皮質の神経幹細胞で *Nepro* を強制的に発現させた結果、*Nepro* は初期の神経前駆細胞では分化を抑制したが、後期の神経前駆細胞で神経分化の抑制作用が見られなかった (図1)。このことから *Nepro* の作用は時期特異的であると考えられた。さらに *Nepro* によって脳室層に維持された神経前駆細胞は神経前駆細胞のマーカーである Nestin や分裂中の細胞のマーカーである Ki67 で標識されたことから、*Nepro* は神経細胞の移動を抑えているのではなく、神経前駆細胞を維

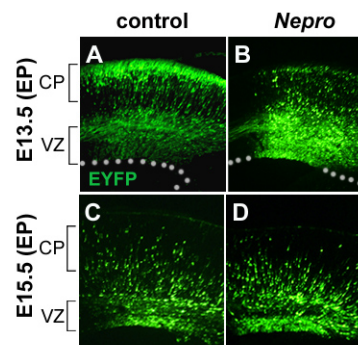


図1. *Nepro* の作用。(A,B)マウス胎生13.5日の大脳神経前駆細胞で *EYFP* あるいは *Nepro* と *EYFP* を共に発現させて、三日後に大脳切片を作製し、*EYFP* 陽性細胞の分布を解析した。コントロールでは *EYFP* 陽性細胞は神経細胞に分化して、皮質板(CP)に移動する(A)。*Nepro* を働かせると、神経前駆細胞は脳室層(VZ)で維持される(B)。この作用は胎生15.5日に *Nepro* を導入した脳では見られない(C,D)。

持っていることが明らかとなった。さらに、*Nepro* を強制発現させると、神経分化に必須であるプロニューラル遺伝子の発現が減少することから、*Nepro* はプロニューラル遺伝子の発現を制御し、神経細胞への分化を抑えていることが示唆された。

(2) *YNES1* の機能阻害実験

Nepro の生体内での機能を明らかにするため、特異的な siRNA を用いて *Nepro* の機能阻害実験を行ったところ、神経前駆細胞は正常に維持されず、分化して皮質板に移動した。これらの細胞は皮質神経細胞のマーカである *Tbr1* に対する抗体で染色されることから、*Nepro* の機能阻害によって神経細胞への分化が促進されたことが示唆された (図 2)。このことから、神経幹細胞の維持において *Nepro* が必要であることが明らかになった。

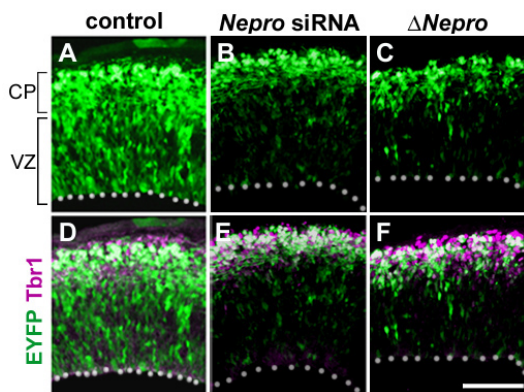


図 2. *Nepro* の機能。(A, B) マウス胎生 11.5 日の神経前駆細胞に control の siRNA を発現させて二日後の脳切片像。神経前駆細胞は一部分化して皮質板に移動しているが、多くは脳室層(VZ)に残っている。*Nepro* siRNA を神経前駆細胞で発現させると、殆んどが神経細胞に分化して、皮質板(CP)に移動し、皮質板のマーカである *Tbr1* と共染色される(D, E)。*Nepro* の C 端側の欠損体は *Nepro* siRNA と同様の作用を持つことからドミナントネガティブ体として機能することが示唆された(C, F)。

(3) *YNES1* と Notch シグナルとの関係の解析

Nepro と神経幹細胞の維持に中心的な役割を果たす Notch シグナルとの関係を調べるため、活性化型 Notch を神経幹細胞で発現させると *Nepro* の発現が増加することを見出した。反対に、 γ セクレターゼ阻害剤で Notch シグナルを阻害すると *Nepro* の発現が減少した。一方、Notch の下流因子である *Hes1* や *Hes5* を強制発現させても *Nepro* の発現は変化せず、*Nepro* の強制発現によっても *Hes1* や *Hes5* の発現は変化しなかった。さらに、 γ セクレターゼ阻害剤存在下では、*Nepro* あるいは *Hes1* 単

独では十分ではないが、共に発現させた場合に神経分化がより効率的に抑えられることを見出した。以上の結果から、*Nepro* は大脳皮質の神経幹細胞の維持に重要な役割を果たす Notch 下流因子であることが示唆された

(4) *YNES1* 蛋白質の分子機能の解析

Nepro 蛋白質の細胞内局在を明らかにするため、*Nepro* の C 末端に HA タグを不活化した融合蛋白質を大脳の神経幹細胞で発現させ、HA タグに対する抗体でその局在を検討した。その結果、*Nepro*-HA 蛋白質は核のマーカである DAPI と共に染色され、核に存在することが明らかとなった。

(5) 大脳皮質で発現する他の *YNES* 遺伝子の機能の解析

他の *YNES* 遺伝子群の機能を明らかにするため、三つの異なる *YNES* 遺伝子の全長を含む発現ベクターを作製し、*in vivo* electroporation 法を用いて胎生 13.5 日の大脳の神経前駆細胞で発現させた。これまでに顕著な活性を持つ遺伝子は得られていないが、単独で働かない可能性も考えられるため、生体内における機能を明らかにするため、各々の遺伝子に特異的な siRNA を用いて機能解析を行っている。

研究代表者は *Nepro* が Notch 下流の必須因子であることも初めて明らかにし、Notch 研究の新展開としても注目を集めている。また、*Nepro* は主に初期の大脳神経幹細胞で発現しており、大脳が発達した哺乳類ではアミノ酸配列がよく保存されている一方、無脊椎動物にはホモログが存在しない。その上、*Nepro* は、*Hes* などと異なり既知の機能ドメインを持たず、これまでの因子とは異なる多くのユニークな特性も有しており、様々な点において注目の因子であると考えられる。今後、*Nepro* や機能が未知の遺伝子群を軸に、多くのポテンシャルを有する初期の大脳神経前駆細胞の性質を明らかにすることは、精神・神経活動の中心をなす大脳の神経細胞の多様性の理解に直接的に繋がっており、神経科学の重要な分子基盤となる。

謝辞：本研究を進めるにあたり、多大なご支援をいただきました千葉大学大学院医学研究院・斎藤哲一郎教授に深く感謝いたします。

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 1 件)

① Yuko Muroyama and Tetsuichiro Saito,
Identification of Nepro, a gene required for the
maintenance of neocortex neural progenitor cells
downstream of Notch. **Development** 査読有、
Vol.136、2009、pp.3889–3893

[学会発表] (計 1 件)

① 室山優子、Nepro is involved in the
maintenance of neocortex neural progenitor cells
downstream of Notch. 第32回日本分子生物学
会年会、2009年12月10日、横浜

[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：
出願年月日：
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

室山 優子 (MUROYAMA YUKO)
千葉大学・大学院医学研究院・特任講師
研究者番号：20422248

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者