

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06674

研究課題名(和文) マウス大脳皮質発生過程でのCa²⁺依存的低濃度Shhシグナル伝達経路の解明研究課題名(英文) Ca²⁺-dependent low-dosage Shh signaling pathway during mouse cortical development.

研究代表者

元山 純 (Motoyama, Jun)

同志社大学・脳科学研究科・教授

研究者番号：70321825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Ca²⁺イメージングを用いて、神経幹細胞(NPC)の発生に伴う[Ca²⁺]_i変動のパターンの時間変化を検討した。未分化NPCの[Ca²⁺]_iは神経分化に伴い減少すること、未分化NPCでは一過性の[Ca²⁺]_i変動を示すものは少ないが未熟ニューロンでは多かった。NPCの示す[Ca²⁺]_i変動はT型カルシウムチャンネルに依存し、T型カルシウムチャンネルを遮断するとNPCの分化が阻害された。in vivoでCav3.1をRNAiでノックダウンすると、未分化NPCが維持されニューロン分化が抑制された。よって未分化NPCの神経分化にはCav3.1を介した[Ca²⁺]_i変動が必要であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では神経幹細胞の未分化状態から分化状態への変化の過程で、細胞内カルシウム濃度変動パターンが変化することを発見した。この発見は細胞が生存した状態で未分化と分化の2つの状態の違いを判別することを可能にする技術の基盤となる。幹細胞医療の実用化を進めるにあたり幹細胞の状態を非破壊で把握する技術の必要性は高い。本研究の成果はその非破壊幹細胞未分化・分化検出方法の開発の糸口になる。

研究成果の概要(英文)：Using Ca²⁺ imaging, we examined temporal changes in the pattern of [Ca²⁺]_i fluctuations during neural stem cell (NPC) development. The [Ca²⁺]_i of undifferentiated NPCs decreased with neuronal differentiation; few undifferentiated NPCs showed transient [Ca²⁺]_i fluctuations, but many immature neurons did; the [Ca²⁺]_i fluctuations exhibited by NPCs were dependent on T-type calcium channels, and blocking T-type calcium channels inhibited NPC differentiation. In vivo RNAi knockdown of Cav3.1 maintained undifferentiated NPCs and inhibited neuronal differentiation. Thus, Cav3.1-mediated [Ca²⁺]_i fluctuations are required for neuronal differentiation of undifferentiated NPCs.

研究分野：発生生物学

キーワード：神経幹細胞 細胞分化 マウス胚 大脳皮質 カルシウムイオン Shh

1. 研究開始当初の背景

モルフォジェンである Shh は動物胚内で濃度勾配を形成し、濃度依存的に多様な細胞分化を誘導する。この細胞分化誘導メカニズムのうち、高濃度の Shh の作用は転写調節因子 Gli を介した標的遺伝子の誘導に依存している事がわかっている。一方、低濃度の Shh の作用では Gli1 や Ptch 1 遺伝子の発現誘導が生じない。この低濃度での Shh がどのような経路を介して細胞に作用するかは不明な点が多い。

哺乳類中枢神経系の発生過程において Shh は神経管最腹部で発現し、濃度依存的に腹側形質の細胞の分化を誘導することが知られる。一方申請者は、マウス Shh 遺伝子変異胚の大脳皮質(背側形質)が小頭症であることに注目し、背側の大脳皮質の神経前駆細胞の発生にも Shh が関与することを示した(Shikata et al., 2011)。更に胎齢 13 日(E13)のマウス胚大脳皮質に Shh 遺伝子を強制発現すると、高濃度では皮質が腹側化し、本来、大脳基底核(腹側)で発生する Dlx2 陽性中間前駆細胞が異所的に誘導されるが、低濃度での Shh 遺伝子強制発現では、正常より多くの背側の Tbr 2 陽性中間前駆細胞、すなわち腹側化が起こらず背側の幹細胞の増殖促進が生じた。その結果から、内在性の低濃度の Shh シグナルが大脳皮質神経前駆細胞の分裂・分化の調節、つまり大脳皮質の神経細胞の量のコントロールに関与していることを示唆した(Shikata et al., 2011)。しかし大脳皮質では Shh mRNA の検出も RT-PCR でなければ困難で、Gli1 や Ptch1 といった下流の遺伝子の発現も極めて低い。それらの理由から大脳皮質での低濃度の Shh シグナルの伝達メカニズムや発生での役割は明確でない。現在までに、大脳皮質内での Shh タンパク質発現細胞を探索し、分化決定後の神経細胞(Tuj1 陽性)が Shh タンパク質を低いレベルで発現していること、神経組織で特異的に Shh 遺伝子の破壊が起こる *Sox1-cre; Shh^{flox/flox}* マウス胚の大脳皮質では VZ が薄くなり神経前駆細胞と中間前駆細胞が共に減少することを発見した。しかし大脳皮質では、Shh の発現量が低いことから、この低濃度での Shh が細胞に作用する分子経路は明らかでない。

Teperino らによりヒト成体脂肪細胞において、ヘッジホッグシグナルが細胞外から細胞内への Ca^{2+} 流入を誘導することが報告された(Teperino et al., 2012)。この報告を基にマウス胚(E14)を対象に大脳皮質スライスで Ca^{2+} イメージングを行ったところ、 Ca^{2+} 濃度変動を示す細胞を多数検出し、周期的に細胞内の Ca^{2+} 濃度の増減を観察した。更に低濃度(1-10 nM)の Shh シグナルを作用させたところ、顕著な Ca^{2+} 濃度変動の活性化を観察した。これらの濃度での Shh の作用では Gli1 や Ptch1 遺伝子の発現誘導は起こらなかった。以上の観察結果は、低濃度の Shh シグナルに対し Ca^{2+} 依存的な応答を示す未分化な細胞がマウス胚大脳皮質の VZ に存在する可能性を示唆した。しかし、研究開始当時では未分化な神経幹細胞における Ca^{2+} 濃度変動の生理的意義は明らかではなく、まずその役割を明らかにする必要があった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経前駆細胞・中間前駆細胞を含むマウス胚大脳皮質の細胞に対する、低濃度 Shh シグナルの Ca^{2+} 依存的な分裂・分化制御機構の解明である。以下の 3 つのサブテーマに分割して研究を進めた。

- (1) 複数の発生段階にあるマウス胚大脳皮質に存在する神経前駆細胞・中間前駆細胞での細胞内 Ca^{2+} 濃度変動を記録し、その Ca^{2+} 濃度変動の発生機構を薬理的に調べる。
- (2) 観察された神経前駆細胞・中間前駆細胞での細胞内 Ca^{2+} 濃度変動を抑制し、発生への影響を調べる。
- (3) 低濃度 Shh の作用に対し細胞内 Ca^{2+} 濃度変動を示す細胞の種類を同定し、Shh が細胞内 Ca^{2+} 濃度変動を引き起こす機序を薬理的手法によって調べる。

3. 研究の方法

In vivo の Ca^{2+} イメージング: 複数の発生段階にあるマウス胚大脳皮質から急性スライスを作成し、神経前駆細胞・中間前駆細胞が局在する脳腔に面した VZ での細胞内 Ca^{2+} 濃度変動を記録した。発生段階として E11, 12, 14, 16 を用いた。各ステージのマウス胚大脳より急性スライスを作成し、細胞内 Ca^{2+} 検出の指示薬である Fluo4 を取り込ませた。その後、細胞内 Ca^{2+} 濃度変動を観察するためにスライスを観察用チャンバーにセットしたのち Fluo4 の蛍光シグナルを共焦点顕微鏡で一定時間記録した。記録した画像データより個々の細胞での蛍光シグナルの時間変化パターンを抽出した。そこで得られた蛍光シグナルパターンを発生段階間で比較した。

In vitro の Ca^{2+} イメージング: スライスを用いた実験では Ca^{2+} 濃度変動を観察はできるが、各細胞種を知ることができない。よって Ca^{2+} 濃度変動を観察したのちに免疫染色によって個々の細胞の発生運命を同定するため、*In vitro* の実験を実施した。マウス胚より大脳皮質組織を採取する。それらを穏やかに懸濁し細胞懸濁液を作成する。懸濁された細胞をカバーガラスに接着さ

せ、Fluo4 を取り込ませる。細胞を接着させたカバーガラスを観察用チャンバーにセットしたのち Fluo4 の蛍光シグナルを共焦点顕微鏡で一定時間記録した。Ca²⁺濃度変動の観察後、カバーガラスに接着させた細胞を固定し免疫染色によって細胞種の同定をおこなった。細胞分化状態の基準は、Pax6(+ (陽性)) : Btg2(- (陰性))細胞を分裂中神経前駆細胞、Pax6(+): Btg2(+)細胞を分化決定済み神経前駆細胞、そして Pax6(-): Btg2(+)細胞を中間前駆細胞、Tuj1(+)細胞を分化済み神経細胞とした。

Ca²⁺濃度変動の発生機構を薬理的に調べる実験：観察中のスライスもしくは細胞に対し、5mM EGTA, 5μM Thapsigargin, 2.5μM NNC55-0396, 20μM Nifedipine 等を作用させ細胞が示す Ca²⁺濃度変動に対する影響を調べた。

Ca²⁺濃度変動を抑制し神経前駆細胞の発生への影響を調べる実験：Ca²⁺濃度変動の発生機構を薬理的解析の結果、細胞内 Ca²⁺濃度変動は T 型 Ca²⁺チャンネルによって生じていることがわかったため、それを抑制し、神経前駆細胞の発生への影響を調べる実験をおこなった。以下の 2 通りの方法でおこなった。

In vitro の実験：E12 のマウス胚より大脳皮質組織を採取し、それらを穏やかに懸濁し細胞懸濁液を作成した。懸濁された細胞を所定の培養液中で培養し、sphere を形成させた。その sphere 形成過程に培養液中に 2.5μM NNC55-0396 (T 型 Ca²⁺チャンネル阻害剤) を添加し、一次 sphere 形成数と継代した場合の二次 sphere の形成数への影響を調べた。

In vivo の実験： T 型 Ca²⁺チャンネルの発現を RNAi を用いてマウス胚 VZ 内で阻害させ、T 型 Ca²⁺チャンネルの発現がノックダウンされた神経前駆細胞の発生運命への影響を調べた。T 型 Ca²⁺チャンネルの発現をノックダウンする RNA を発現するプラスミドは子宮内電気穿孔法によって大脳皮質の VZ 内細胞に導入した。一定時間経過後に胚を取り出し、免疫組織科学的に細胞の発生運命を解析した。

低濃度 Shh の作用に Ca²⁺依存的に応答する細胞の同定を行う実験：マウス胚(E12)大脳皮質から単離して解離した細胞をカバーガラスに接着させたものを用意し、上記と同じ条件で Ca²⁺イメージングを 10 分間行う。次に様々な濃度 (0.01nM ~ 10nM) の Shh シグナルの作用下での Ca²⁺濃度変動を 10 分間記録する。最後に抗体染色による細胞種同定を行う。以上より、低濃度 Shh シグナル応答細胞がどの分化状態 (分裂中神経前駆細胞、分化決定後神経前駆細胞、中間前駆細胞) なのかを明らかにする。また Shh により誘導された Ca²⁺濃度変動の発生機構を薬理的に調べるため、5mM EGTA, 5μM Thapsigargin, 2.5μM NNC55-0396, 20μM Nifedipine 等を作用させ細胞が示す Ca²⁺濃度変動に対する影響を調べた。

4 . 研究成果

本研究により、以下の事実が明らかとなった。

- (1) 複数の発生段階にあるマウス胚大脳皮質に存在する神経前駆細胞・中間前駆細胞での細胞内 Ca²⁺濃度変動を記録し、その Ca²⁺濃度変動の発生機構を薬理的に調べ、わかった事実について：

複数の発生段階の間で *in vivo* および *in vitro* の実験を行い比較した結果、未分化な神経幹細胞、すなわち Pax6(+): Btg2(-)細胞(E11, E12)では発生初期の細胞は後期の細胞(E14, E16)に比べて高濃度の細胞内 Ca²⁺濃度を示した。しかしそれらの多くは一過的な濃度変動は示さなかった。

分化決定後の神経前駆細胞 Pax6(+): Btg2(+)細胞では細胞内 Ca²⁺濃度の低下が見られ、かつ一過的な Ca²⁺濃度変動が観察された。一過的 Ca²⁺濃度変動は分化が進むにつれて高頻度になることを発見した。

薬理的解析の結果、観察された細胞内 Ca²⁺濃度変動は 5mM EGTA 共存下で消失すること、及び T-type Ca²⁺チャンネル阻害剤である NNC55-0396 により消失することから、細胞外 Ca²⁺が T-type Ca²⁺チャンネルに依存して細胞内に流入することで生じていることが示された。

- (2) 観察された神経前駆細胞・中間前駆細胞での細胞内 Ca²⁺濃度変動を抑制し、発生への影響を調べ、わかった事実について：

これらの発見を踏まえ、神経前駆細胞の発生過程における細胞内 Ca²⁺濃度変動パターンを人為的に抑制した際の、神経前駆細胞の発生運命に与える影響を調べた。

in vitro sphere 培養下での Ca²⁺濃度変動の阻害を T-type Ca²⁺チャンネル阻害剤である

NNC55-0396 を用いて行なった。NNC55-0396 の作用によって神経前駆細胞の細胞分裂が促進されたこと、その一方で sphere 内部における幼弱神経細胞数が減少したこと、NNC55-0396 の作用によって一次 sphere から生じる二次 sphere の形成数が増加することがわかった。

in vivo での神経前駆細胞の分裂と分化過程において T-type Ca^{2+} チャネルのサブユニットである Cav3.1 又は Cav3.2 の RNAi 導入によるノックダウン実験を実施した。その結果、Cav3.1 ノックダウンが生じている神経前駆細胞では、Pax6 陽性細胞から Tbr1 陽性細胞への分化が進行せず、Pax6 陽性細胞のまま分裂を継続すること、また Cav3.2 ノックダウンが生じている神経前駆細胞では、Pax6 陽性細胞から Tbr1 陽性細胞への分化が進行していることが明らかとなった。

- (3) 低濃度 Shh の作用に対し細胞内 Ca^{2+} 濃度変動を示す細胞の種類を同定し、Shh が細胞内 Ca^{2+} 濃度変動を引き起こす機序を薬理的手法によって調べ、わかった事実について：

Shh 無しの培養液での Ca^{2+} 濃度変動を 10 分間記録し、続けて 0.01nM ~ 1 μ M の Shh 添加後での Ca^{2+} 濃度変動を 10 分間記録する。その後、免疫染色による細胞種同定を行った。

In vivo 及び *in vitro* の実験の結果、0.01nM ~ 1 μ M の Shh の作用に対し、細胞内 Ca^{2+} 濃度変動を示した濃度は 1nM, 10nM のみであった。Shh の作用によって細胞内の Ca^{2+} 濃度は増加し、観察視野あたりの細胞内 Ca^{2+} 濃度変動を示した細胞数は増加した。一方で一過的 Ca^{2+} 濃度の変動数は低下したが変動幅は増加した。

Shh に応答し細胞内 Ca^{2+} 濃度変動を示した細胞は分裂中の未分化な神経前駆細胞ではなく、分化決定後の神経前駆細胞及び中間前駆細胞であった。

薬理的手法によって、Shh によって生じた細胞内 Ca^{2+} 濃度変動は、5mM EGTA 共存下で消失すること、20 μ M Nifedipine 及び 5 μ M Thapsigargin により消失することがわかった。これらの結果から、細胞外 Ca^{2+} が L-type Ca^{2+} チャネルに依存して細胞内に流入すること、さらに細胞内 Ca^{2+} ストアも Shh による細胞内 Ca^{2+} 濃度変動に関与していることが示唆された。先行研究の結果と合わせると、これらの観察結果は大脳皮質の発生過程において Shh が、分化決定後の神経前駆細胞及び中間前駆細胞に作用し、それらの細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加することにより、細胞分裂および細胞分化を促進することを示唆している。

以上の結果より以下の結論を得ることができた。

E11, E12 における分裂中未分化神経幹細胞の細胞内カルシウム濃度の状況は一定で時間経過における変動がほとんど見られないが、細胞が分化決定するに伴い (Btg2 の発現開始) 細胞内カルシウム濃度は低下し、かつ短時間での急激な増加と減少、すなわち一過的な細胞内カルシウム濃度変動を示した。分化の進行に伴い、細胞内カルシウム濃度はさらに低下し、逆に一過的細胞内カルシウム濃度変動頻度はさらに増加傾向を示した。これらの細胞内カルシウム濃度変動は細胞外カルシウムイオンの T-type Ca^{2+} チャネルを介した流入に依存しており、T-type Ca^{2+} チャネルをノックダウンすることによって分裂中未分化神経幹細胞は分化決定 (Btg2 陽性) することなく、未分化状態で分裂を続けたことから、観察された細胞内カルシウム濃度変動のパターンの変化は神経幹細胞の分化に必要であることが示唆された。

一方、Shh は大脳皮質の発生、特に分裂中未分化神経幹細胞や中間前駆細胞の細胞分裂に必須であることが先行研究により報告されているが、Shh によって細胞内カルシウム濃度の変動が誘導されたのは分化決定後の神経幹細胞だけだった。誘導された細胞内細胞内カルシウム濃度の上昇は Shh 作用後の数秒以内に生じ、細胞外カルシウムイオンの L-type Ca^{2+} チャネルを介した流入に依存すること、細胞内のカルシウムストアからの放出との両方に依存していることがわかった。先行研究では Shh が中間前駆細胞の細胞分裂に必須であることが示されている。本研究の成果によって、Shh の中間前駆細胞への作用がカルシウム変動を伴う経路で伝達され中間前駆細胞の細胞分裂を制御する可能性を示すことができた。神経幹細胞の発生過程で細胞内カルシウム濃度変動が生じているが、未分化状態では T-type Ca^{2+} チャネル、分化決定後では L-type Ca^{2+} チャネルと関与するチャネルの種類やカルシウム濃度調節のメカニズムが変化することは興味深い。神経細胞へ分化後は Ca^{2+} 濃度によって細胞の興奮と抑制の制御を行うため、細胞内

の Ca^{2+} 濃度は厳密に制御される。その制御機構が未分化神経幹細胞からの細胞分化の進行とともに発達していることが窺える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 34.Rhaditya P.A.A., Oishi K., Nishimura Y.V., Motoyama J.	4. 巻 489
2. 論文標題 [Ca2+]i fluctuation mediated by T-type Ca2+ channel is required for the differentiation of cortical neural progenitor cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 84-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2022.05.021	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 -

1. 著者名 35.Oishi K, Nakajima K and Motoyama J.	4. 巻 10
2. 論文標題 Activation of sonic hedgehog signaling promotes differentiation of cortical layer 4 neurons via regulation of their cell positioning.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jdb10040050	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0件

〔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
研究協力者	ラディティア プツウ アディ アンディカ (Rhaditya Putu Adi Andhika)	同志社大学・脳科学研究科・大学院生 (34310)	
研究協力者	大石 康二 (Oishi Koji)	同志社大学・准教授 (34310)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	西村 嘉晃 (Nishimura Yoshiaki V.)	東北医科薬科大学・助教 (31305)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関