

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790186

研究課題名（和文） 海馬歯状回形成における形態形成因子の役割の解明

研究課題名（英文） The roles of morphogen during the development of dentate gyrus.

研究代表者

駒田 致和（KOMADA MUNEKAZU）

福井大学・医学部・特命助教

研究者番号：90523994

研究成果の概要（和文）：哺乳動物の大脳皮質の形成においては、適切な時期に適切な数の細胞が増殖・分化することが重要である。近年、終脳背側においては radial glial cell（RGC）のほかに、intermediate progenitor cell（IPC）が存在していることが報告されている。我々は終脳背側の Hedgehog シグナルが神経幹細胞の増殖や生存、分化を制御していることを報告し、さらに本研究では、特に RGC の IPC や神経細胞への分化、さらには IPC から神経細胞への分化を調節していることを示した。その作用は胎生 16.5 日においてより顕著であり、細胞周期を調節することによって RGC から IPC、さらには神経細胞への分化を制御している可能性がある。ヒトの大脳皮質では 2、3 層が高度に発達している。IPC は主にこの領域の神経細胞を産生することから、本研究は高次脳機能の形成や精神疾患の発症のメカニズムの解明に寄与することができる。

研究成果の概要（英文）：Normal morphogenesis of the mammalian cerebral cortex requires orchestration of the proliferation and differentiation of the appropriate number of cells at the appropriate developmental period. Several lines of studies demonstrated that neural stem cells (radial glias: RGs) and neural precursor cells (Intermediate progenitor cells: IPCs) locate in the developing dorsal telencephalon. In particular, IPCs have important roles in the lamination of cerebral cortex layers II and III. We previously reported that Hedgehog (Hh) signaling in the dorsal telencephalon maintains the proliferation, survival, and differentiation of RGs and IPCs (Komada et al., 2008). The findings of the present study suggest that Hh signaling controls cell cycle length and regulates the transition from RG to IPCs or neurons and from IPCs to neurons at embryonic day 16.5 in mice. In the primate cerebral cortex, layers II and III are highly developed and these layers are generated from neurons produced from IPCs. Elucidation of this mechanism is likely to contribute to a better understanding of the constitution of higher brain functions and the pathogenesis of mental disorders.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：解剖学一般（含組織学・発生学）
 科研費の分科・細目：発生学・形態形成学

キーワード：ソニックヘッジホッグシグナル、大脳皮質、中間前駆細胞、細胞分化

1. 研究開始当初の背景

海馬歯状回は記憶・学習に重要であり、成熟した後も神経新生が行われていることが知られている。マウスの海馬歯状回の発生は胎生 15 日ごろから始まり、生後に外的要因による神経刺激の入力などにより、急速に成熟が進む。この生後の成熟過程においては母獣との関係などの外的要因が重要であり、海馬歯状回だけではなく中枢神経系の他の器官の形成にも影響していることも示唆されている。統合失調症などの精神疾患モデルマウスでも海馬歯状回の分化異常や細胞増殖の減少が報告されており、これまで器質的な原因が明らかにならなかった精神疾患の病因や、疾患に対する脆弱性につながるものが示唆されている(Maekawa et al, *PLoS One*, 2009)。

哺乳動物の大脳皮質の形成においては、適切な時期に適切な数の細胞が増殖・分化を行うことが重要である。マウスでは胎生中期以降、終脳背側の脳室面で radial glial cell (RGC) と intermediate progenitor cell (IPC) が増殖と分化を繰り返し、分化した神経細胞は脳表面に向かって法線状に移動することで、6 層構造を持つ大脳皮質が形成される。大脳皮質を構成する神経細胞は、産まれた時期によってどの層を構成するかが決定されることも知られており、適切な増殖・分化が正常な層構造の形成に重要である。このように大脳皮質の発生は神経細胞の増殖や分化、移動、局在、神経ネットワークの構築が複雑に制御されており、その制御は様々なシグナルが複雑に関与することで調節されている。

分泌タンパク質である Sonic Hedgehog (Shh) は形態形成因子として様々な組織の発生において重要な役割を果たしている。申請者はこれまでに先行研究において、Cre-loxP システムを利用して終脳背側特異的に Shh シグナルの発現を抑制するコンディショナルノックアウト (CKO) マウスを作成しその表現型を解析したが、大脳皮質のほかに海馬歯状回が形成不全であることを確認した。これまでに、Shh シグナルが海馬歯状回の維持に関与していることが報告されているが (Han et al, *Nat. Neurosci.*, 2008)、海馬歯状回の発生初期から成熟していく間の Shh の発現パターンやその機能は分かっていない。

2. 研究の目的

(1) 申請者の予備研究から、Shh シグナルが海馬歯状回の発生と形成に重要な役割を果たしていることから、海馬歯状回の初期発生に関わる Shh シグナルの異常が低形成を引き起こし、これらの異常が統合失調症などの精神疾患の原因の一つである外的因子 (ストレスなど) に対する脆弱性などに関与していることが示唆される。

(2) 今回我々は、海馬歯状回も含まれる大脳皮質の発生における Shh シグナルの役割に着目した。大脳皮質は終脳の背側に形成されるが、Shh は終脳の腹側に強く発現し、この領域のパターン形成や GABA 作動性介在ニューロンの増殖・分化を制御している。しかし弱いながらも背側に発現し、細胞の増殖や生存、分化に重要な役割を果たしていることを我々はすでに世界に先駆けて報告している (Komada et al. *Development* 2008)。また先行研究により、終脳背側における Shh シグナルは特に IPC の維持や分化に重要であることが明らかにされていることから、本研究課題では Shh シグナルが制御する IPC の増殖・分化制御メカニズムを明らかにすることを旨とする。

Shh シグナルは重篤な脳神経系の先天異常である全前脳胞症の原因遺伝子の一つであり、本研究課題では、終脳背側特異的に Shh シグナルの発現を抑制する遺伝子改変マウスを用いて、特に IPC に関連した表現型を詳しく解析するとともに、異常を引き起こす分子メカニズムを明らかにすることで、先天異常の発症メカニズムの解明にも寄与することを目指す。

3. 研究の方法

(1) Shh ノックアウトマウスは象鼻奇形症という重篤な先天異常を示し、中枢神経系も低形成となるため大脳皮質特異的な解析を行うことは困難である。そこで、Emx1-Cre ノックインマウスを用いて、胎生期の終脳背側特異的に Shh シグナルの介在因子である *Smoothed* の発現を抑制したコンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作製し、終脳背側の Shh シグナルが神経幹細胞の増殖や生存、分化を制御していることを報告した (Komada et al. *Development* 2008)。本研究においてはこのマウスを用いて、さらに詳細に解析することによって、RGC や IPC の増殖制御メカニズムの解明を目指す。

(2) 複数のチミジン類似物質 (BrdU, CldU, IdU) を併用し、投与を複数の時期で行うこ

とによって、Cell cycle kinetics についての詳細な解析を行った。また、細胞の分化段階毎のマーカー染色を同時に行うことで、分化段階毎の Cell cycle kinetics についても解析を行った。また、詳細な免疫組織化学的解析を行うことによって、神経細胞の投射やグリア細胞の分化、さらには細胞周期を制御する因子に着目しこれらの異常の原因となる因子の探索を行った。

4. 研究成果

(1) このマウスを詳細に解析することによって、Shh シグナルが制御する IPC の増殖・分化メカニズムの解明を行った。チミジン類似物質を用いた cell cycle kinetics の解析によって Shh シグナルは細胞周期と cell cycle exit のタイミングを調節することによって RGC から IPC、さらには神経細胞への分化を制御していることが明らかにした。また、これらの異常は成熟した大脳皮質において 5 層と白質の低形成を誘発し、神経細胞の分布や層構造形成に異常を引き起こしていることを示した。

(2) この SmockKO マウスはサブプレートが低形成であることも報告されており (Komada et al. *Development* 2008)、この領域を通して大脳皮質に投射するドパミン作動性神経細胞の線維の投射にも異常を観察した。さらに、アストロサイトのマーカーである GFAP の異所性の発現も見られたことから、アストロサイトの分化、あるいは活性化の異常が引き起こされていることも確認した。つまり、Shh シグナルが制御する IPC の増殖・分化制御メカニズムは、神経細胞の分布や層構造形成を調節することによって、神経投射にも影響していることが示唆された。

(3) IPC における細胞周期異常の原因を明らかにするために、胎生期に終脳背側に発現している CyclinD1、D2、E の発現について解析を行った。SmockKO マウスにおいて、特に CyclinD1 の発現異常が観察され、IPC の細胞周期の調節異常は、Shh シグナルが抑制されることによってその下流で作用する CyclinD1 の発現が減少し、細胞周期のチェックポイントを適切に通過することができず、細胞周期が延長することによって起きていることが示された。つまり、Shh シグナルは IPC における CyclinD1 の発現を制御することによって IPC の細胞周期を適切に調節することで、適切な数の神経細胞を適切な時期に産生し、大脳皮質の層構造の適切な形成やアストロサイトの産生に関与している。このことが大脳皮質へのドパミン作動性ニューロ

ンの投射にも影響しており、大脳皮質の機能的な成熟にも関与していることを示唆している。つまり、終脳背側に発現している Shh シグナルは、大脳皮質の器質的な先天異常の原因となるだけでなく、高次脳機能の異常にも関与していることが考えられる。

(4) 近年、胎児期の異常や環境が高次脳機能障害や精神疾患、生活習慣病などの成人後の疾患との関連性を示唆する DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 仮説が唱えられており、胎児・発達期の栄養状態などの環境が精神疾患や生活習慣病の発症リスクへ影響することが報告されている。本研究課題では、終脳背側に発現している Shh シグナルが細胞周期の調節を介して、大脳皮質の形態形成や、高次脳機能の成熟に重要な役割を果たしていることを明らかにするとともに、精神疾患や高次脳機能障害の発症メカニズムの一端の解明にも寄与することができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件) すべて査読有

- ① Komada M. Hedgehog signaling coordinates the proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells by regulating the cell cycle kinetics during development of the neocortex. *Congenital Anomalies*, in press, DOI: 10.1111/j.1741-4520.2012.00368.x
- ② Nagao T., Kagawa N., Saito Y., Komada M. Developmental effects of oral exposure to diethylstilbestrol on mouse placenta. *Journal of Applied Toxicology*, in press
- ③ Komada M., Asai Y., Morii M., Matsuki M., Sato M., Nagao T. Maternal bisphenol A oral dosing relates to the acceleration of neurogenesis in the developing neocortex of mouse fetuses. *Toxicology*, in press, DOI:10.1016/j.tox.2012.02.013
- ④ Sato Y., Izumi Y., Minegishi K., Komada M., Yamada S., Kakui K., Tatsumi K., Mikami Y., Fujiwara H., Konishi I. Prenatal finding in congenital leukemia: a case report. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 2011, 29(4) 325-330, DOI:10.1159/000323582
- ⑤ Komada M., Fujiyama F., Yamada S., Shiota K., Nagao T. Methylnitrosourea induces neural progenitor cell apoptosis and microcephaly in mouse

embryos. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 2010, 89(3) 213-222, DOI:10.1002/bdrb.20245

〔学会発表〕（計8件）

- ① Yagi H., Xie M., Ikeda H., Komada M., Iguchi T., Kuroda K., Okabe M., Sato M. Regulation of dendritic spine morphology by FILIP. *Neuroscience* 2011 平成23年9月17日 パシフィコ横浜（神奈川県）
- ② Komada M., Iguchi T., Kuroda K., Xie M., Yagi H., Sato M. The roles of Hedgehog signaling during the proliferation/differentiation of intermediate progenitor cells. *Neuroscience* 2011 平成23年9月16日 パシフィコ横浜（神奈川県）
- ③ Xie M., Yagi H., Kuroda K., Komada M., Iguchi T., Sato M. Dendritic growth cone activity to resume radial migration properly in the course of multipolar-bipolar transition. *Neuroscience* 2011 平成23年9月15日 パシフィコ横浜（神奈川県）
- ④ 駒田致和、猪口徳一、黒田一樹、謝敏かく、八木秀司、佐藤真 Intermediate progenitor の増殖・分化における Hedgehog シグナルの役割 第51回 先天異常学会学術集会 平成23年7月22日 シェーンバッハ・サポー（東京）
- ⑤ 八木 秀司, 謝 敏カク, 池田 弘, 駒田 致和, 猪口 徳一, 黒田 一樹, 岡部 勝, 佐藤 真 FILIP の新たな側面：FILIP 欠損による梨状葉神経細胞棘突起の形態変化 第116回日本解剖学会・全国学術集会 第116回日本解剖学会全国学術集会 平成23年3月30日 誌上開催
- ⑥ 謝 敏カク, 黒田 一樹, 八木 秀司, 駒田 致和, 猪口 徳一, 佐藤 真 大脳皮質形成期の法線方向移動における神経細胞の多極性から双極性への形態変化に成長円錐が重要である 第116回日本解剖学会全国学術集会 平成23年3月30日 誌上開催
- ⑦ 駒田 致和、浅井泰子、守井見奈、長尾哲二 低用量ビスフェノールAのマウス胎児期曝露により誘発される大脳皮質発生異常 第50日本先天異常学会学術集会 平成22年7月8日 淡路島夢舞台（兵庫県）
- ⑧ Komada M., Fujiyama F., Yamada S., Shiota K., Nagao T. Methylnitrosourea Exposure Induces Apoptosis in the Dorsal Telencephalon and Microcephaly in Mouse Embryos, The

Teratology Society 50th Annual Meeting, 2010 June 27, Marriott Louisville Downtown (アメリカ)

〔図書〕（計0件）

なし

〔産業財産権〕

なし

○取得状況（計0件）

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

駒田 致和 (KOMADA MUNEKAZU)

福井大学・医学部・特命助教

研究者番号：90523994