

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500389

研究課題名(和文) 神経細胞産生を制御する増殖因子シグナルの新たな作用機序解明

研究課題名(英文) Investigation of a new mechanism of growth factor signaling for regulation of neurogenesis

研究代表者

佐藤 智美 (Sato, Tomomi)

京都大学・再生医科学研究所・研究員

研究者番号：50373311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞は、脳室(V)領域で神経幹/放射状グリア(NS/RG)細胞から産生されるだけでなく、RG細胞から生み出された神経前駆(NP)細胞も、脳室垂(SV)領域で神経細胞の産生を行う。しかし、NP細胞から神経細胞が産生される過程を制御するメカニズムについては、ほとんど明らかにされていない。

私は、ゼブラフィッシュ視蓋をモデル系とし、NP細胞からの神経細胞の産生は時空間的に制御されており、増殖因子 Neuregulin1 (NRG1)に依存することを示した。NRG1は、SV領域におけるNP細胞の細胞分裂を制御し、神経細胞の産生を制御する細胞外シグナルとして、保存された役割を担うことが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Brain development starts with neurogenesis from neural stem/radial glial (NS/RG) cells in the ventricular (V) region. RG cells not only self-renew in the V region, but also give rise to neural progenitor (NP) cells, which also self-renew and/or produce post-mitotic neurons in the subventricular (SV) region. However, little is known about regulatory mechanisms for the generation of neurons from NP cells.

Here, we showed that neuronal generation from NP cells is a spatially and temporally regulated process and depends on Neuregulin 1 (NRG1) using the optic tectum (OT) of zebrafish embryos as a model system. NRG1 regulates cell divisions of NP cells in the SV region. Rescue of NRG1-depleted embryos with recombinant human NRG1 suggested a conserved role for NRG1 as an extrinsic signal for neuron production. Moreover, live imaging showed that a removal of the ErbB inhibitor from embryos triggered neuron-generating divisions of NP cells in the SV region.

研究分野：総合領域

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 増殖因子 視蓋 ゼブラフィッシュ

## 1. 研究開始当初の背景

### (1)本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

初期の発生過程において、神経細胞は、未分化な神経上皮細胞から、前駆細胞である放射状グリア細胞と基底前駆細胞を経て産生される。これらの神経幹・前駆細胞は、核の上下移動(エレベーター運動)を行いながら、脳室帯で対称分裂により増殖し、非対称分裂により自己複製と神経細胞の産生を行う。この様に、神経細胞の産生は、増殖と分化、移動が連動した非常に動的な過程である(Goetz and Huttnner, 2005)。これまで、神経細胞を産生するメカニズムは、対称・非対称分裂や細胞周期、転写因子の制御など、細胞自律的なメカニズムについて詳細に解析されている。しかし、どのような細胞外シグナルが神経細胞の産生を制御しているのかという細胞非自律的なメカニズムについては、まだ不明な点が多い。成体の神経産生においては、増殖因子 EGF が、細胞間相互作用を介して、神経幹・前駆細胞の数を制御することが報告されている(Aguirre et al., 2010)。本研究は、発生過程において、神経細胞の産生を制御する増殖因子シグナルの、新たな役割と作用機構を明らかにする。

### (2)これまでの研究内容

申請者はこれまで、神経投射の分子メカニズムを研究し、その中で、生きた個体を用いて、複雑な神経回路網の構築機構を検証できるモデル動物として、ゼブラフィッシュの有用性を示し、神経回路網の構築における、細胞間相互作用の分子実体の一つを明らかにした(Sato et al., 2007)。本研究は、その有用性を、神経回路網構築の初期段階である、神経細胞の産生機構における細胞間相互作用に適用し、特に、意外にも未だ未解明な、神経細胞の分化に関わる細胞間シグナリングに焦点を当て、その分子機構を解明する。既に、増殖因子受容体である ErbB 受容体が、その分化のひとつの鍵となることを見出している(口頭発表 O2-4-2-2、Neuro2010、2010年9月、神戸)。本研究は、ゼブラフィッシュおよびマウスを用いて、神経分化における ErbB シグナルの作用機序を解明し、神経細胞産生の新たな機構を明らかにする。

## 2. 研究の目的

中脳視蓋の神経細胞が GFP で可視化されたトランスジェニック系統 Tg(*brn3a-hsp70:GFP*) (Sato et al., 2007) の胚を、ErbB 阻害剤で処理すると、GFP 陽性の神経細胞が消失するという表現型が観察された。Tg(*brn3a-hsp70:GFP*)胚は、分裂終了後の分化した神経細胞で GFP を発現する。ErbB 阻害剤で処理された胚では、頭部の形態形成に大きな異常なし。神経細胞が消失し、脳室が拡大。

脳室帯の細胞増殖は存在。

神経細胞死は亢進せず。

阻害剤の除去により、神経細胞が回復。

以上の結果から、申請者は、ErbB シグナルが、神経細胞の産生を制御する、新たな役割を果たすのではないかとの仮説を持った。本研究は、ErbB シグナルが神経細胞の産生をどのように制御しているのか、その分子機構を明らかにすることを目的とする。

これまでの研究結果に基づき、本研究では、以下の3つの疑問点について明らかにすることを目的とする。

(1) ErbB シグナルは、神経細胞の産生を、どのようなメカニズムで制御しているのか?

(2) この ErbB シグナルに対応するリガンド分子は、どの細胞に由来し、どのように ErbB シグナルを活性化するのか?

(3) この ErbB シグナルの作用機序は、視蓋以外の脳部位や、マウス脳においても保存されたメカニズムなのか?

## 3. 研究の方法

神経細胞の産生における、ErbB シグナルの新たな作用機序とその普遍性を明らかにするために、まず、ゼブラフィッシュ脳において、(1)神経前駆細胞の分化、(2)エレベーター運動、(3)細胞周期や細胞分裂における影響を、ErbB 阻害剤の処理、ErbB の発現阻害、ErbB の過剰発現により調べ、ErbB シグナルの作用機序を明らかにする。

次に、リガンド分子の発現部位を明らかにし、切断による ErbB シグナルの活性化機構を調べる。

さらに、マウス脳において、ErbB 阻害剤投与による(1)脳の形態や層構造、(2)神経前駆細胞の分化、分布や分裂パターン、(3)細胞周期における影響を、免疫染色や Fucci 系統を用いた画像解析を行うことで、神経発生における ErbB シグナル作用機序の普遍性を明らかにする。

## 4. 研究成果

神経細胞は、脳室(V)領域で神経幹/放射状グリア(NS/RG)細胞から産生される(直接経路)だけでなく、RG 細胞から生み出された神経前駆(NP)細胞も、脳室亜(SV)領域で神経細胞の産生を行う(間接経路)。しかし、NP 細胞からの神経細胞の産生を制御するメカニズムについては、ほとんど明らかにされていない。

私は、胚が透明で、胚発生が体外で進行し、様々な細胞を生きたまま可視化したトランスジェニック系統が利用可能なモデル生物ゼブラフィッシュを用い、ゼブラフィッシュの脳の中で最も発達した部位、中脳視蓋に着目し、解析を行った。視蓋の神経細胞で GFP を発現する Tg(*brn3a-hsp70:GFP*)、全身の神経細胞で光感受性の蛍光タンパク質 Kaede を発

現する Tg(*huC:Kaede*)システムを用い、まず、視蓋で神経細胞が産生される過程を解析した。その結果、神経細胞の産生は、基底側から頂端側へ、即ち、脳の外側から内側へと神経細胞が蓄積されていく、時空間的に制御された過程であることを示した。分裂期の細胞を特異的に標識する抗リン酸化ヒストン H3 (pH3)抗体を用いた免疫染色から、視蓋には、頂端表層と基底垂領域の2種類の分裂層があることが判明した。NP細胞を選択的に標識した胚のタイムラプスイメージング解析により、頂端表層における分裂はNP細胞の増殖に寄与し、基底垂領域におけるNP細胞の分裂が、神経細胞の産生に寄与していることが明らかになった。このような視蓋における神経細胞の産生過程に、ErbBシグナルがどのように関与しているのかを明らかにするために、以下の3つの課題に取り組んだ。

(1) ErbBシグナルは、神経細胞の産生を、どのようなメカニズムで制御しているのか？

ErbB阻害剤処理により、ErbBシグナルを阻害された胚は、視蓋における神経細胞の発生が抑制されることから、神経細胞の産生にErbBシグナルが関与していることが示唆された。神経細胞産生までのどの過程にErbBシグナルが関与しているのかを明らかにするために、全胚 *in situ* ハイブリダイゼーション法により、増殖期のRG細胞で発現する *her6*、NP細胞で発現する *neurogenin1*、分裂後の神経細胞で発現する *neurod* の発現を調べたところ、ErbB阻害剤処理胚では、*her6* の発現は変化せず、*neurogenin1* の発現は増加し、*neurod* の発現は減少していることが判明した。このことは、ErbB阻害剤の処理により、NP細胞から神経細胞への分化が抑制されていることが示唆された。また、抗pH3抗体染色により、ErbB阻害剤処理胚では、基底垂領域の分裂細胞数が有意に減少していることが示された(図1)。このErbBシグナル依存

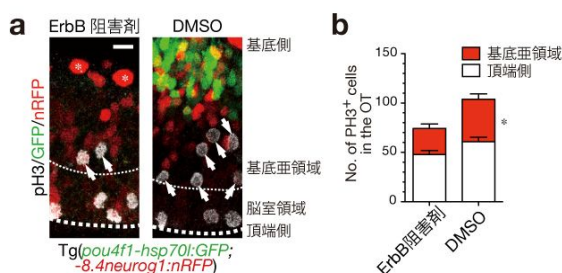


図1 ErbB阻害剤処理により視蓋における神経細胞産生と基底垂領域の分裂細胞数が減少する

a, 矢印: 基底垂領域のpH3陽性分裂細胞。GFP: 神経細胞  
b, pH3陽性細胞の定量化

性の分裂が、神経細胞を生み出す分裂であるかどうかを明らかにするために、ErbB阻害剤を除去後、表現型の回復過程を、抗pH3抗体染色とタイムラプスイメージングにより解

析した。その結果、ErbB阻害剤を除去後、まず基底垂領域の分裂細胞数が回復し、続いて神経細胞の数が回復することが明らかとなった。以上の結果から、ErbBシグナルは、基底垂領域におけるNP細胞の細胞分裂を促進することにより、神経細胞の産生を制御していることが示唆された。

(2) ErbBシグナルに対応するリガンド分子は、どの細胞に由来し、どのようにErbBシグナルを活性化するのか？

受精卵にアンチセンスモルフォリーノオリゴ(MO)を導入することにより、目的の遺伝子の発現阻害を行った。ErbB受容体に対するリガンド分子の一つである増殖因子ニューレグリン1(NRG1)は、選択的RNAスプライシングにより、様々なアイソフォームが存在することが知られており、ゼブラフィッシュでは、少なくとも3つのタイプがある(図2)。

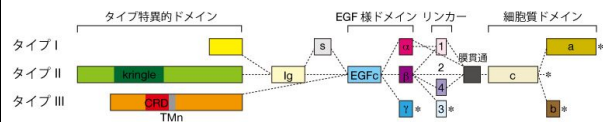


図2 NRG1のドメイン構造とアイソフォーム

全NRG1と膜型NRG1の発現阻害をそれぞれに特異的なMOで行ったところ、視蓋における神経細胞の発生が抑制されることが判明した。また、あるタイプのNRG1に特異的な発現阻害を行うと、ErbB阻害剤で処理した胚と同様に、基底垂領域の分裂細胞数が有意に減少し、神経細胞の産生が抑制されることが判明した。この結果は、あるタイプの膜型NRG1が、ErbB受容体のリガンド分子である可能性を示唆した。

次に、全胚 *in situ* ハイブリダイゼーション法により、NRG1 mRNAの発現を調べたところ、視蓋の頂端側に局在していることが示された。頂端側には、主にNS/RG細胞が分布することから、NRG1は、NS/RG細胞から産生されることが示唆された。

また、ErbB受容体の一つであるErbB4の発現阻害では、ErbB阻害剤処理と同様に、神経細胞の発生が抑制され、*erbB4* mRNAは、より基底側に広く分布しており、NRG1のタイプ特異的な発現阻害では、リン酸化ErbB4が有意に減少していることが判明した。

さらに、NRG1発現阻害胚に、分泌型NRG1タンパク質を脳室内投与すると、視蓋における神経細胞の発生が部分的に回復することが判明した。膜型NRG1は、メタロプロテアーゼによって細胞膜外ドメインが切断され、分泌型として機能することが知られている。このことから、視蓋においても、膜型NRG1は分泌型の細胞外シグナル分子として作用している可能性が示唆された。

以上の結果から、NRG1は、頂端側のNS/RG

細胞から産生され、分泌型として作用し、ErbB4 受容体を活性化して、基底垂領域に分布する NP 細胞の分裂を促進し、神経細胞の産生を制御することが示唆された ( 図 3 )。

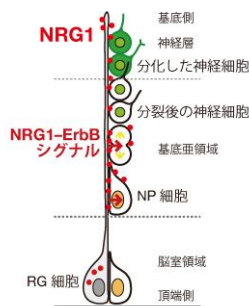


図 3 神経細胞の産生における NRG1-ErbB シグナルの作用機序

( 3 ) この ErbB シグナルの作用機序は、視蓋以外の脳部位や、マウス脳においても保存されたメカニズムなのか？

ErbB 阻害剤処理胚では、網膜、前脳、後脳においても、視蓋と同様に、神経細胞の発生が抑制される傾向が観察されたことから、これらの脳部位においても、ErbB シグナルが神経細胞の産生に参与している可能性が示唆された。

同様の ErbB 阻害剤を、妊娠マウスに腹腔内投与すると、マウス胚の大脳皮質においても、脳室が拡大し、皮質板の厚みが有意に減少することが示された。このことは、マウス胚の大脳皮質においても、ErbB シグナルが神経細胞の産生に参与している可能性を示唆する。

また、MO 導入により NRG1 の発現を阻害したゼブラフィッシュ胚に、ヒト NRG1 の分泌型タンパク質を脳室内投与すると、表現型が部分的に回復することから、神経細胞の産生における ErbB シグナルの機能は、ヒトからゼブラフィッシュまで保存された役割であ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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 5 件 )

Tomomi Sato, Kazuya Sakaguchi, Ryoma Tanigome, Fuminori Sato, Hiroyuki Arai, Tomohiro Kurisaki, Atsuko Sehara  
ErbB signaling regulates differentiation of neurons in the developing tectum.  
Neurogenesis 2011、2011年06月02日、神戸  
Tomomi Sato, Fuminori Sato, Kazuya Sakaguchi, Ryoma Tanigome, Tomohiro Kurisaki, Atsuko Sehara  
A role of NRG1-ErbB signaling in the generation of neurons during development of

the optic tectum in zebrafish.

18th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting、2012年09月23日、京都  
Tomomi Sato, Fuminori Sato, Kazuya Sakaguchi, Ryoma Tanigome, Tomohiro Kurisaki, Atsuko Sehara

A regulatory role of NRG1-ErbB4 signaling in generation of neurons in the developing zebrafish brain.

Kyoto University Global COE “Center for Frontier Medicine” International Symposium / Retreat 2012、2012年10月05日、淡路  
佐藤 智美、佐藤 文規、坂口 和弥、谷米 竜馬、亀崎 青沙、栗崎 知浩、瀬原 淳子

発生過程のゼブラフィッシュ脳の神経細胞の産生における ErbB4 シグナルの役割  
第 35 回日本分子生物学会年会、2012年12月13日、福岡

Tomomi Sato, Fuminori Sato, Aosa Kamezaki, Kazuya Sakaguchi, Ryoma Tanigome, Koichi Kawakami, Atsuko Sehara  
NRG1-ErbB4 signaling regulates cell divisions of neural progenitor cells in the developing zebrafish brain.

5<sup>th</sup> Cell Biology, Developmental Biology, and Systems Biology Course Meeting、2013年09月27日、京都大学

[ 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

佐藤 智美 ( SATO, Tomomi )  
京都大学・再生医科学研究所・研究員  
研究者番号：50373311

(2)研究分担者

栗崎 知浩 (KURISAKI, Tomohiro)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号： 9 0 3 1 1 4 2 2

(3)連携研究者

(4)研究協力者

佐藤 文規 (SATO, Fuminori)  
京都大学・再生医科学研究所・研究員  
研究者番号： 1 0 5 8 8 2 6 3

坂口 和弥 (SAKAGUCHI, Kazuya)  
京都大学・再生医科学研究所・大学院生  
研究者番号：

谷米 竜馬 (Tanigome, Ryoma)  
京都大学・再生医科学研究所・大学院生  
研究者番号：

亀崎 青沙 (KAMEZAKI, Aosa)  
京都大学・再生医科学研究所・大学院生  
研究者番号：