

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23700378
 研究課題名(和文) 発生時期特異的に変化する神経幹細胞の分裂パターンを制御しているメカニズムの解析
 研究課題名(英文) Analysis of the regulation mechanism of the progenitor cell division pattern along developmental stages.
 研究代表者
 岡本 麻友美 (OKAMOTO Mayumi)
 名古屋大学・医学系研究科・COE 特任助教
 研究者番号：30551965

研究成果の概要(和文)：本研究では、大脳発生の進行に伴って変化する分裂パターンや挙動等の神経幹細胞の特性を制御しているメカニズムを明らかにすることを目的として行った、単一細胞由来のマイクロアレイデータより得られた候補分子のスクリーニングより、発生初期において神経幹細胞の形態を制御していることが考えられる接着分子、TAG-1 を発見した。TAG-1 をノックダウンすると発生初期においてのみ神経幹細胞の basal 突起が消失し、その核移動の範囲が狭くなった。核移動の異常により VZ において細胞が混み合った結果、神経幹細胞は脳室面から離脱し、basal 側で異所的に細胞産生を行った。そしてその結果、大脳層形成は大きく乱れた。以上の観察より、神経幹細胞はその形態依存的に正しく核移動を行うことで、細胞が混み合うことを防いでおり、そのことが大脳組織形成を行う上で非常に重要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)： We found that knockdown of the cell-surface molecule TAG-1, which is enriched basally in early mouse cerebral walls, causes retraction of progenitors' basal processes. Basally disconnected stem-like progenitors failed to undergo basalward INM and overcrowded in the periventricular space. Surprisingly, the overcrowded progenitors left the apical surface and migrated into basal neuronal territories. Although the heterotopic progenitors unexpectedly remained stem-like, sequentially producing neurons until late embryonic period, histogenesis was severely disrupted. Thus, progenitors' morphology-dependent INM is essential to prevent nuclear/somal overcrowding, thereby ensuring normal brain histogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経発生学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：神経幹細胞、非対称分裂、interkinetic nuclear migration、basal 突起、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物大脳発生過程において、より未分化な神経前駆細胞である神経幹細胞 (apical progenitor) は、発生時期に応じて自身の分裂パターンを変化させることが知られている。

胎生初期には、対称分裂により2つの神経幹細胞を生み出し、胎生中期になると、非対称分裂により神経幹細胞とニューロン、もしくは神経幹細胞とより分化傾向にある中間前駆細胞 (basal progenitor) を生み出すようになる。これまでに、未分化状態の維持に関わる

因子、分化を誘導するような因子の存在はいくつか知られているが、発生時期特異的に分裂パターンが変化する具体的な分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。このような分裂パターンの差を生み出すためには、神経幹細胞内で発生時期に応じて異なる分子制御がされており、時期特異的にキーとなる分子が存在していることが予想される。そこで、本研究計画では、神経幹細胞内での遺伝子発現の変化に注目するために、不均一な前駆細胞群を区別することが可能な単一細胞 (single-cell) レベルでのマイクロアレイデータを利用して、神経幹細胞の分裂パターンを制御している因子を同定し、その分子メカニズムを解明することを目標とする。

2. 研究の目的

発生過程の脳において、神経幹細胞が対称分裂と非対称分裂を行うことは、多数の細胞からなる脳組織を作り出すために重要なステップである。これらの分裂は、発生時期に応じて秩序立って起こることが知られているが、神経幹細胞の分裂パターンが時期特異的に制御されているメカニズムは、まだ十分明らかになっていない。本研究計画では、単一細胞レベルでのマイクロアレイ解析のデータを利用して、神経幹細胞内での遺伝子発現の変化に着目することで、発生時期特異的な神経前駆細胞の分裂パターンの制御に関わる遺伝子を同定し、その分子メカニズムを明らかにすることを目標とする。

3. 研究の方法

発生ステージごとに行った単一細胞由来のマイクロアレイのデータから、発生時期に応じて発現が変化するような候補遺伝子を選択し、それらの遺伝子について、過剰発現実験および、RNAi法を用いた機能抑制実験を行う。その中から、神経幹細胞の分裂パターンやその挙動、その後の運命等に影響を及ぼすような因子を同定する。変化が得られた遺伝子に関して、さらに詳細に過剰発現実験や機能抑制実験を行い、これらの遺伝子の機能を解明する。また、スライス培養法を用いたライブイメージングを行うことにより、実際の神経幹細胞の挙動にどのように影響しているのかを調べる。別儀、マイクロアレイデータ等を利用しながらシグナル因子や他の関連因子との関係や脳発生過程に及ぼす影響を調べることで、発生時期特異的に発現が変化する分子がどのように神経幹細胞の挙動を制御しているか、その全貌を明らかにし、脳発生におけるその重要性を包括的に議論する。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイのデータから得られた候補分子の機能的スクリーニング

マイクロアレイのデータから各発生段階によって発現量の変化する遺伝子について、過剰発現法やRNAi法を用いて機能的スクリーニングを行った。その中で3種類の遺伝子について、フェノタイプを得た。

(2) 神経前駆細胞の形態を制御する因子、TAG-1 の機能解析

機能的スクリーニングにより得られた分子の一つ、イムノグロブリンスーパーファミリーのメンバーである GPI アンカー型の接

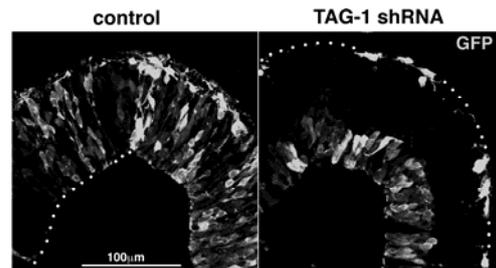


図1 発生過程の脳における TAG-1 ノックダウンの影響

着分子、TAG-1 の shRNA 発現ベクターをエレクトロポレーション方によって脳に導入することによりノックダウンすると、共導入した GFP 陽性細胞の局在が、apical 面付近に限局した (図1)。

これらの異常な細胞は、Pax6 陽性の未分化な神経前駆細胞であることがわかり、これらの細胞ではその basal 突起が失われていた。

TAG-1 ノック

ダウンによる basal 突起の消失は、E10 および E11 におけるエレク

トロポレーションにより誘導できたが、E12以降になると basal 突起を失った神経幹細胞の数は激減した (図2)。このことより、TAG-1 は発生時期特異的に神経前駆細胞の形態を制御している可能性が考えられた。

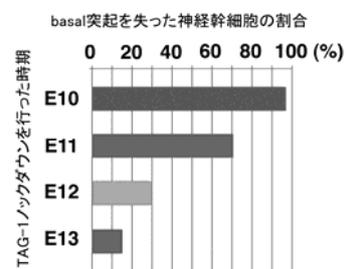


図2 各発生段階での TAG-1 ノックダウンによる basal 突起消失の割合

(3) 脳組織形成における神経前駆細胞の形態、挙動の重要性

神経幹細胞は細胞周期依存的に apical-basal 方向に核移動 (interkinetic nuclear migration) を行っている。TAG-1 のノックダウンにより basal 突起を失った神

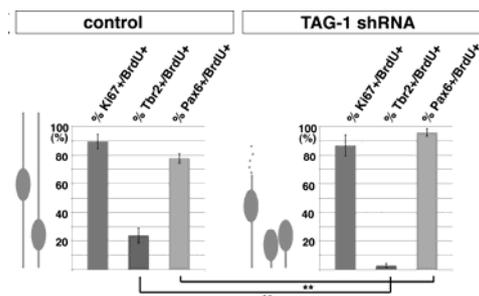


図3 TAG-1ノックダウンによりbasal突起を失った神経幹細胞の細胞産生能

神経幹細胞は、スライスカルチャーを用いたライブイメージング観察より、その核移動の範囲が apical 面付近に局限していることが明らかになった。これらの異常な神経幹細胞は、正常な神経幹細胞と同様に apical 面で分裂し、その分裂方向は正常であった。しかし、一過的に Pax6 陽性の未分化な神経前駆細胞を生み出す割合が増加した (図3)。これらの結果から、basal 突起を失った神経幹細胞でも、その未分化性を維持できることが明らかになった。

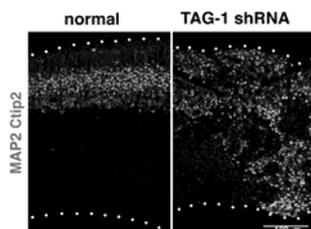


図4 TAG-1 ノックダウンによる大脳組織形成の異常

さらに、これらの異常な細胞は、やがて集団となって脳室面から離脱し、本来を生み出す割合が増加した (図3)。これらの結果から、basal 突起を失った神経幹細胞においてもその未分化状態を維持できることが明らかになった。さらに、これらの異常な細胞は、やがて集団となって脳室面から離脱し、本来神経幹細胞の存在しない basal 側において細胞産生を行った。これらの basal と apical の突起を持たない神経幹細胞でも、その未分化性は維持されており、やがて、正常にニューロンを生み出すことがわかった。しかし、その結果、大脳層構造は大きく乱れた。

以上の結果より、神経幹細胞の形態は、発生時期特異的に TAG-1 に制御されており、その形態依存的な核移動は、正常な大脳組織形成を行うために、非常に重要であることを見出した。

これらの成果は、神経幹細胞の形態と分裂様式の関係性や大脳組織形成における神経幹細胞の挙動の重要性について考察するための非常に重要な知見であり、現在論文を投稿中である。

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. Kawaue, T., Okamoto, M., Matsuyo, A., Inoue, J., Ueda, Y., Tomonari, S., Noji, S., Ohuchi, H. (2012) Lhx1 in the proximal region of the optic vesicle permits neural retina development in the chicken. *Biology Open* 1, 1083-1093 [査読有] DOI: 10.1242/BIO.20121396

[学会発表] (計23件)

1. Okamoto, M., Interkinetic nuclear migration based on neuroepithelial-cell elongation ensures brain histogenesis through 'crowd control'. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 2013.03.29 サンプルホール高松・香川国際会議場 (高松市)

2. Okamoto, M., Interkinetic nuclear migration through TAG-1-assisted progenitor elongation prevents neuroepithelial overcrowding and ensures neocortical histogenesis. 第6回神経発生討論会 2013.3.14 理化学研究所 (和光市)

3. 岡本麻友美, Interkinetic nuclear migration prevents neuroepithelial overcrowding and ensures neocortical histogenesis. 新学術領域「動く細胞と場のクロストークによる秩序の生成」第2回若手の会 2013.3.7 ホテル ラフォーレ修善寺 (伊豆)

4. 岡本麻友美, Interkinetic nuclear migration based on neuroepithelial-cell elongation ensures brain histogenesis through 'crowd control'. 第5回NAGOYAグローバルリトリート 2013.2.1 あいち健康プラザ (大府市)

5. Okamoto, M., Interkinetic nuclear migration based on neuroepithelial-cell elongation ensures brain histogenesis through 'crowd control'. The 23rd CDB Meeting Building multicellular systems from cellular cross-talk 2013.1.22 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター (神戸市)

6. Okamoto, M., TAG1 deficiency-induced shortening and resultant abnormal nucleokinesis of apical progenitors causes periventricular cellular congestion and heterotopic cytogenesis. GCOE 第4回国際シンポジウム「神経-腫瘍の医学生物学シンポ

ジウム」2012.11.16 ウェスティンナゴヤキ
ャッスルホテル (名古屋市)

7. Okamoto, M., TAG1 deficiency-induced shortening and resultant abnormal nucleokinesis of apical progenitors causes periventricular cellular congestion and heterotopic cytogenesis. Neuroscience 2012 2012.10.14 New Orleans (USA)

8. Okamoto, M., TAG1 deficiency-induced shortening and resultant abnormal nucleokinesis of apical progenitors causes periventricular cellular congestion and heterotopic cytogenesis. 第3回名古屋大学・生理研合同シンポジウム 2012.9.29 自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター (岡崎市)

9. 岡本麻友美, TAG1 の消失は apical progenitor の形態と核移動の異常を引き起こし、apical 表面での細胞の混みは異所的な細胞産生と皮質の形成異常を導く。第35回日本神経科学大会 2012.9.21 名古屋国際会議場 (名古屋市)

10. Okamoto, M., The basal process of neural stem cells helps interkinetic nuclear migration and neuron/progenitor territorialization. ISSCR, International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting 2012.6.15 パシフィコ横浜 (横浜市)

11. Okamoto, M., TAG1 shapes neural progenitor cells and regulates interkinetic nuclear migration and histogenesis in the developing neocortex. 第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会 2012.5.29 神戸国際会議場 (神戸市)

12. 岡本麻友美, Studying nascent daughter cells' neighborhood to understand the mechanism of cell fate choices in the neocortical neurogenesis. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会 2012.3.26 山梨大学甲府キャンパス (甲府市)

13. 岡本麻友美, 大脳発生過程において神経前駆細胞の形と動きを規定する「場」：初期誕生のニューロンたちの役割。新学術領域「動く細胞と場のクロストークによる秩序の生成」の「若手の会」 2012.3.17 地方職員共済組合有馬保養所瑞宝園 (神戸市)

14. 岡本麻友美, The basal process of neural stem cells helps interkinetic nuclear

migration and neuron/progenitor territorialization. 第5回神経発生討論会 2012.3.15 福井県民ホール (福井市)

15. Okamoto, M., Early progenitor cells' basal process morphology is regulated by subplate neurons and essential for interkinetic nuclear migration and overall neocortical histogenesis. 第1回国際シンポジウム / The 59th NIBB Conference "Neocortical Organization" 2012.3.10 自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター (岡崎市)

16. Okamoto, M., The regulation of neural stem cells' morphology and behavior during cortical development. 第4回NAGOYA グローバルリトリート 2012.2.24 あいち健康プラザ (大府市)

17. 岡本麻友美, 発生過程の大脳における運命決定相互作用：誕生直後の近隣関係性の探索。定量生物学の会 第四回年会 2012.1.8 名古屋大学野依記念学術交流館 (名古屋市)

18. Okamoto, M., Studying nascent daughter cells' neighborhood to better understand the mechanism of cell fate determination in the neocortical and retinal neurogenesis. GCOE第3回国際シンポジウム 2011.12.8 ミッドランドホール (名古屋市)

19. 岡本麻友美, 大脳の分化過程における運命決定相互作用：誕生直後の娘細胞の近隣関係性を知るための全細胞タイムラプスイメージング。第71回日本解剖学会中部支部学術集会 2011.10.15 名古屋大学医学部講堂 (名古屋市)

20. 岡本麻友美, 神経分化過程における細胞の運命決定相互作用：誕生直後の娘細胞の近隣関係性のイメージング。第34回日本神経科学大会 2011.9.16 パシフィコ横浜 (横浜市)

21. Okamoto, M., Studying nascent cells' neighborhood to better understand the mechanism of cell-fate determination in neocortical neurogenesis. The Cambridge Neural Stem Cell Symposium 2011.9.5 Cambridge (UK)

22. 岡本麻友美, 神経分化過程の細胞運命決定メカニズムをより理解するための、誕生直後の娘細胞の近隣関係性の探索。第2回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シン

ポジウム 2011.8.20 名古屋大学医学部講堂
(名古屋市)

23. Okamoto, M., 大脳前駆細胞において発生時期特異的に発現する遺伝子の機能解析.
第 44 回日本発生生物学会 2011.5.18 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 麻友美 (OKAMOTO Mayumi)
名古屋大学・医学系研究科・COE 特任助教
研究者番号 : 30551965

(2)研究分担者なし

(3)連携研究者なし