

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700353

研究課題名(和文)ヘッジホッグシグナルによる大脳皮質を構成する細胞の分化制御機構の解明

研究課題名(英文)The cell fate regulation mechanism during the development of neocortex controlled by the Hedgehog signaling.

研究代表者

駒田 致和 (Komada, Munekazu)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号：90523994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質は複数の神経幹細胞から産生される神経細胞やグリア細胞によって構成され、その分化は様々な因子によって厳密に制御されている。本研究課題では形態形成因子であるヘッジホッグ(HH)シグナルによる分化制御メカニズムを明らかにするために、受容体の発現を終脳背側特異的に抑制するノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析した。HHシグナルはCyclinD2の発現を制御することで神経幹細胞の細胞周期や神経分化を調節する。特に第6b層の形成に重要で、ドパミンニューロンの前頭前野への投射にも関与している。これによって、発生期の脳皮質の組織異常による神経回路形成異常の発症メカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The neocortex comprises several neuronal subtypes and neural glial cells. Differentiation of these cells is regulated by various factors during corticogenesis. In this study, to confirm the mechanism of corticogenesis controlled by the morphogen Hedgehog (HH) signaling, we established conditional knockout (cKO) mice in which the expression of Smo, an HH-signaling mediator, was inhibited in the dorsal telencephalon during development. HH signaling coordinates neurogenesis and cell cycle kinetics via its regulation of cyclin D2 expression. In Smo cKO mice, layer 6b exhibited hypoplasticity with decreased dopaminergic neuronal projections in the prefrontal cortex. These findings suggest that the histologic anomalies lie in the developing neocortex induced neuronal network abnormalities.

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：大脳皮質 神経発生 細胞周期 ヘッジホッグシグナル ドパミンニューロン

## 1. 研究開始当初の背景

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。

大脳皮質の先天異常は、重篤な場合は生命そのものの危機に繋がり、軽度の場合でも高次脳機能障害に繋がるため、その発症メカニズムの解明や予防法の確立は急務である。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・発達期の環境や発育異常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。つまり、発生期の大脳皮質の微小構造異常が、これまで詳しい発症メカニズムに不明な点のあった ADHD や自閉症といった発達障害の原因の一つである可能性が示されている。これらの発達障害に対し、早期にその原因となる器質的な異常を検出し、早期治療を行うことができれば患者の QOL の維持にも大きく貢献できるものと期待できる。先天異常の発症メカニズムの解明や予防法の確立は、精神疾患や生活習慣病の予防へと繋がる、新たな局面を迎えている。

## 2. 研究の目的

神経幹細胞の分化は、大まかに胎生中期においては神経細胞へ、後期から生後にかけてはグリア細胞へと発生段階依存的な制御を受けている。近年、RGC や IPC の増殖・分化を制御する因子が多数同定されているが、申請者は大脳皮質原基に発現している形態形成因子であるソニックヘッジホッグ (Shh) が RGC や特に IPC の増殖や分化を制御していることを報告している (Komada et al. *Development* 2008)。神経幹細胞の増殖と分化は、様々な転写因子と液性因子の相互作用によって調節されており、Shh は Key Molecule の一つとしての役割を果たしている。神経幹細胞の多様性がどのように大脳皮

質構築に関わり、神経細胞の多様性を産み出しているか、その分子メカニズムを明らかにすることによって、大脳皮質の細胞構築における新たな知見を示すことができる。

同時に大脳皮質の先天異常が高次脳機能の発達・成熟にどのような影響を引き起こすのか、その発症メカニズムの解明を目指す。Shh シグナルが大脳皮質の形成にも関与していることはすでに申請者らが報告しているが、その器質的異常は神経細胞の分布異常や大脳皮質の特定の層の欠損など、マーカー分子の発現を詳細に検討しないと検出できない微細なものである。そこでこのノックアウトマウスを、大脳皮質に微小構造異常を引き起こす遺伝子改変マウスをモデルとし、その異常の誘発メカニズムを解明することで、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を目指す。これによってヒトにおける高次脳機能の進化、発生や発達、あるいは発達障害や精神疾患の発症メカニズムの解明にも寄与することが期待される。

## 3. 研究の方法

大脳皮質を構成する神経細胞、グリア細胞は RGC や IPC などの複数の神経幹細胞から産生されており、免疫組織染色や BrdU labeling 法を併用することによって、それぞれの幹細胞から産生される細胞の種類や Subtype を明らかにする。また、Shh シグナルがこれらの細胞の分化制御に関与していることから、遺伝子改変マウスを用いて Shh シグナルの促進・抑制モデルマウスを作製しその表現型を解析することで、その分化制御メカニズムを明らかにするとともに、Shh シグナルの下流で RGC や IPC の増殖や分化を制御している因子を探索する。

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 Smoothened 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)。さらに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。

## 4. 研究成果

大脳皮質の微小な脳構造異常モデルマウスとして Emx1-Cre ckO 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。この Smock0 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。

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。Smock0 マウスにおいて、特に CyclinD2 の発現異常が観察され、IPC の細胞周期の調節異常は、Shh シグナルを抑制されることによってその下流で作用する CyclinD2 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 CyclinD2 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。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

(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5件)

Komada M, Iguchi T, Takeda T, Sato M: Smoothened controls cyclin D2 expression and regulates the generation of intermediate progenitors in the

developing cortex. *Neuroscience Letter*, 28: 87-91, 2013

Xie M, Yagi H, Kuroda K, Wang C, Komada M, Zhao H, Sakakibara A, Miyata T, Nagata K, Oka Y, Iguchi T, Sato M: WAVE2-Abi2 complex controls growth cone activity and regulates the multipolar-bipolar transition as well as the initiation of glia-guided migration. *Cerebral Cortex*, 23: 1410-1423, 2013

Nagao T, Kagawa N, Komada M: Newly developed mouse newborn behavioral testing method for evaluating the risk of neurotoxicity of environmental toxicants. *Journal of Applied Toxicology*, 33: 1514-1519, 2013

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*, 16, 325-330, 2012

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*, 52, 72-77, 2012

[学会発表](計10件)

駒田致和, 池田やよい: 大脳皮質形成におけるステロイドホルモンの役割. 第119回日本解剖学会学術大会・総会(栃木), 2014.3.27-29

駒田致和, 池田やよい: 大脳皮質形成におけるステロイドホルモンの局在と役割. 第55回日本歯科基礎医学会学術大会・総会(岡山), 2013.9.20-22

駒田致和, 長尾哲二: 化学物質胎児期曝露が誘発する新生児行動異常とその原因となる大脳皮質形態異常の解析: 第53回日本先天異常学会学術集会・総会(大阪), 2013.7.21-23

服部剛志, 岡本昌之, 駒田致和, 小山佳久, 高雄啓三, 宮川剛, 片山泰一, 伊藤彰, 佐藤真, 遠山正彌: DBZKO マウスにおける大脳皮質発達の解析: *Neuro2013* (京都), 2013.6.20-23

池田やよい, 加藤朋子, 加藤大貴, 高橋幸子, 駒田致和: SF-1 ノックアウトマウス POA におけるプロゲステロン受容体と kisspeptin の発現: *Neuro2013* (京都), 2013.6.20-23

池田やよい, 加藤朋子, 駒田致和, 加藤大貴, 高橋幸子, 生後 SF-1 ノックアウトマウス POA における脳の性分化マーカーの発現, 第118回日本解剖学会学術集会・総会(香川), 2013,3,28

溝端彩, 森佳奈美, 駒田致和, 長尾哲

二、胎児期 4-ヒドロキシタモキシフェン曝露はマウス大脳皮質形成を障害する, 第 15 回環境ホルモン学会研究発表会(東京) 2012,12,2

長尾哲二, 井藤早紀, 正見寛子, 駒田致和 低用量ビスフェノール A のマウス子宮内曝露は新生児の出生直後の活動量に影響を及ぼす, 第 15 回環境ホルモン学会研究発表会(東京), 2012,12,1

駒田致和, 新垣尚捷, 山崎哲男 ミトコンドリア由来の ROS シグナルは骨芽細胞の分化を誘導する, 第 51 回日本薬学会中国四国支部(島根), 2012,11,11

駒田致和, 浅井泰子, 守井見奈, 松木美知枝, 佐藤真, 長尾哲二 胎児期低用量ビスフェノール A 曝露は大脳皮質形成において神経新生を促進する, 第 52 回日本先天異常学会学術集会,(東京) 2012,7,7

〔図書〕(計 0 件)  
特になし

〔産業財産権〕  
特になし

〔その他〕  
特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

駒田 致和 (MUNEKAZU KOMADA)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号: 90523994