

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640039

研究課題名(和文) 脳内の神経細胞の分化方向を人為的に変換させる試み

研究課題名(英文) Modification of neuronal identity specification in the developing brain

研究代表者

仲嶋 一範 (Nakajima, Kazunori)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：90280734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの発生期大脳新皮質内で、人為的に特定の遺伝子を強制発現することにより、抑制性神経細胞を多く作らせることに成功した。また、大脳新皮質の第2-3層の神経細胞と第4層の神経細胞に関して、二種の転写因子Brn1/2とRorbが相互抑制しており、前者が優位になると2-3層神経細胞に、後者が優位になると4層神経細胞に分化することを見出した。すなわち、この両者を使い分けることによって、未成熟神経細胞からの分化方向を人為的に変換できることを発見した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that overexpression of a certain gene could modify the neuronal identity in the developing cerebral neocortex. In the upper cortical plate neurons, a mutually repressive mechanism exists between two kinds of transcription factors, Brn2 and Rorb, and the established expression of Brn1/2 and Rorb specifies those neurons into layer 2-3 and layer 4, respectively, during cortical plate maturation.

研究分野：発生神経生物学

キーワード：大脳新皮質 神経細胞 層特異性 転写因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 大脳新皮質を構成する神経細胞には興奮性神経細胞と抑制性神経細胞があり、前者が7~8割、後者が2~3割を占める。多くの興奮性神経細胞を少数の抑制性神経細胞が制御しており、それらの細胞が各神経細胞層に配置されて適切なネットワークを形成している。最近の研究から、神経微小回路内の興奮と抑制のバランス (excitation/inhibition balance; E/I バランス) が破綻するとさまざまな弊害が生ずると考えられている。例えば、てんかん、統合失調症、自閉症などでは、E/I バランスが興奮過多に傾いていることが指摘されている。逆に、興奮性神経細胞の活動が増大しているマウスに対して抑制性神経細胞の興奮を人為的に亢進させると、興奮過多によって生じる症状が部分的に改善することも報告されている。以上のことから、精神神経疾患における行動障害や認知機能障害は神経微小回路内の破綻に起因すると考えられてきており、E/I バランスの増大仮説が強く支持されるに至っている。

最近我々は、あらかじめマウスの内側前頭前野 (mPFC) に抑制性神経前駆細胞を移植しておくこと、認知機能障害を含む統合失調症様症状を惹起する薬物フェンサイクリジン (PCP) に対する抵抗性を獲得し、PCP を投与しても発症しなくなることを報告した (Tanaka et al. *J. Neurosci.*, 2011)。PCP は NMDA 受容体阻害薬で、PCP 投与動物は統合失調症のモデル動物として広く使われている。抑制性神経細胞を mPFC 以外の場所に移植したり、mPFC に興奮性神経細胞を移植しても PCP に対する抵抗性は高くならなかった。つまり、mPFC の局所の抑制性神経細胞の数を増やすことによって、発症を予防できる可能性が示された。また、てんかんなど E/I バランスの崩れたモデルマウスにおいて、抑制性神経細胞の移植により症状が改善されることも報告されている。何れの研究も抑制性神経細胞の前駆細胞を移植した実験であるが、移植の侵襲性の高さや高度な技術が必要な点、また移植細胞のがん化の可能性など懸念すべき点も多い。そのため、細胞移植に頼らずに人為的に E/I バランスを改変できる技術の開発が望まれる。

(2) 一方、大脳新皮質の興奮性神経細胞については、多くが外套の脳室面近くで誕生し、辺縁帯直下へと放射状に移動した後、誕生時期をほぼ共通にする細胞同士が集合して、脳表面に平行な6層からなる多層構造 (皮質板。将来の皮質) を形成する。この際、遅生まれの神経細胞は早生まれの神経細胞を乗り越えて辺縁帯直下で移動を終えるため、最終的

に inside-out 様式で層構造が形成される。この各層を構成する神経細胞は、それぞれの層に特有のマーカー発現、細胞形態、電気生理学的特徴、投射様式等を有する。例えば、第2-3層の主な神経細胞は大脳新皮質の他の領域と連絡する錐体細胞であり、第4層の主な神経細胞は視床からの入力を受ける星状細胞 (顆粒細胞) である。特に6層のうちでも表層 (第2-4層) については、進化上哺乳類が獲得して発達したもので、中枢機能を下位脳から大脳新皮質へと持ち上げ、動物が高次脳機能を獲得し発現する上で極めて重要な役割を担うと考えられている。この層特異的神経細胞への分化には、転写因子による制御が重要であることが最近の研究で次第にわかってきた。しかしながら、表層 (第2-4層) 神経細胞については、その差別化 (分化) がどのように行われるかわかっていなかった。

2. 研究の目的

脳への細胞移植より簡便な手法で、内在性の神経細胞の分化方向を特定の種類の神経細胞 (抑制性神経細胞や、興奮性神経細胞の中でも特定の層特異性を有する細胞など) に変換することが可能になれば、非常に強力なツールとなり得る。そこで本研究では、*in vivo* の脳内神経細胞を本来とは異なる種類の神経細胞に人為的に変換させることを目指した。

3. 研究の方法

特定の種類の神経細胞に分化を誘導する因子を検索し、候補分子を子宮内胎仔脳電気穿孔法等により異所的に強制発現したり、逆にノックダウンすることにより、人為的に本来とは異なる神経細胞に変換させることを試みた。

4. 研究成果

(1) マウス大脳新皮質内で本来興奮性神経細胞を産生するはずの神経前駆細胞に強制発現することによって、抑制性神経細胞のマーカーである γ -aminobutyric acid (GABA) を発現するようになる遺伝子を発見した。この遺伝子は、本来興奮性神経細胞に分化すべき細胞を抑制性神経細胞に変換させてしまう機能を有する候補遺伝子であると考えられた。そこで次に、この遺伝子を強制発現させた大脳新皮質脳室帯由来の細胞が放射状移動中に GABA を発現し始める部位を調べたところ、大脳新皮質の中間帯上部/サブプレート領域に進入すると発現することを見いだした。そこでさらに、抑制性神経細胞への分化方向の変換にこの中間帯上部/サブプレート領域の細胞外環境が重要であるか検討した。まずは、この候補遺伝子を強制発現させた大脳新皮質脳室帯由来の細胞を含む大脳新皮質全体を用いて神経細胞の分散培養を行った。そ

の際に細胞の密度を変えて培養を行い、候補遺伝子を強制発現させた細胞が GABA 陽性となる割合の変化を調べた。その結果、培養細胞の密度を高くすると、GABA を発現する神経細胞の割合が増加することがわかった。このことから、中間帯/サブプレート領域を含む大脳新皮質には、この候補遺伝子を強制発現させた細胞において GABA の発現を促す細胞外環境が存在することが示唆された。

以上より、この候補遺伝子の強制発現と中間帯/サブプレート領域に局在する細胞外環境との組み合わせによって、興奮性神経幹細胞から抑制性神経細胞を産生できる可能性が示された。

(2) まず、大脳新皮質の将来第 2-4 層の神経細胞に分化する未成熟神経細胞群は、共通して全て転写因子 Brn2 を発現し、別の転写因子 Rorb を発現していないことを見出した。その後発生が進んで神経細胞が成熟すると、第 2-3 層神経細胞では継続して Brn2 の発現が強くなり、成熟後の第 4 層神経細胞では Brn2 の発現が減少し、代わりに Rorb の発現が上昇してくることがわかった(図 1)。

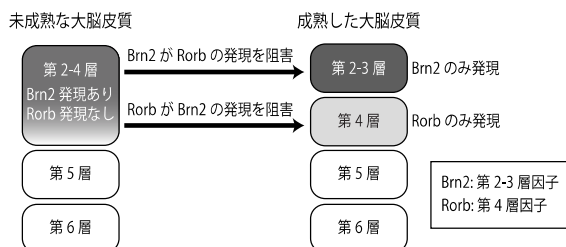


図 1：神経細胞の種類による転写因子の発現変化の相違

そこでさらに解析を進めた結果、実はこの二種の転写因子は相互に発現を阻害しあうことを見出した(図 2)。実際に、Rorb は Brn2 遺伝子の転写開始点から上流約 8kb にある特定の 2 箇所の配列(BS1 及び BS2 と命名した)を認識して結合し、転写を抑制することがわかった。

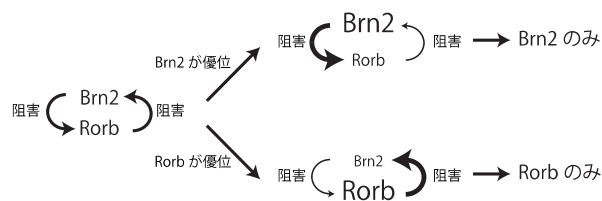


図 2：転写因子の相互阻害による転写因子の発現の選択

また、Brn2 を強く発現させると第 2-3 層神経細胞に特徴的な性質(連絡様式、形態、特異的マーカー分子の発現)を示すようになり、逆に Rorb を強く発現させると第 4 層神経細胞に特徴的な性質を示すようになることを見出した。

以上より、大脳新皮質の第 2-3 層の神経細胞と第 4 層の神経細胞に関して、二種の転写因子 Brn2 と Rorb を使い分けることによって、未成熟神経細胞からの分化方向を人為的に変換できることを発見した。今後は、なぜ第 2-3 層では Brn2 が発現し続けるのか、また、なぜ第 4 層では Rorb の発現が誘導されるのか、そのメカニズムを解明することが重要であると考えられる。

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 2 件)

(1) Koji Oishi, Michihiko Aramaki, and Kazunori Nakajima. Mutually repressive interaction between Brn1/2 and Rorb contributes to establishment of neocortical layer 2/3 and layer 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 113 (12), 3371-3376 (2016). 査読あり
doi: 10.1073/pnas.1515949113

(2) Koji Oishi, Nao Nakagawa, Kashiko Tachikawa, Shinji Sasaki, Michihiko Aramaki, Shinji Hirano, Nobuhiko Yamamoto, Yumiko Yoshimura, and Kazunori Nakajima. Identity of neocortical layer 4 neurons is specified through correct positioning into the cortex. *eLife*, 5, e10907 (2016). 査読あり

doi: 10.7554/eLife.10907

<Recommended in F1000Prime as being of special significance by Faculty of 1000>

[学会発表](計 11 件)

(1) 仲嶋一範、 “大脳皮質ニューロンの移動制御機構”、シンポジウム：“形作りのダイナミクスとその制御機構の探索～新たな発生原理の解明を目指して”(オーガナイザー：田畑秀典、久保田義顕)、第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)、2016年3月28-30日

(2) Kazunori Nakajima, “Control of cell migration in the developing cerebral cortex”, Symposium: “Neuroscience III: Mechanisms of cerebral cortical development”, 7th Asia Pacific International Congress of Anatomists, National University of Singapore, Singapore, 2016年3月17-20日

(3) 仲嶋一範、"動く細胞による大脳皮質の形成機構"、横浜市立大学大学院生命医科学研究科(神奈川県横浜市)、2015年6月23日

(4) 仲嶋一範、"環境因子が脳の発達や機能に与える影響とその保護"、シンポジウム:"From the bench: Bedsideを見据えた脳発達基礎医学の新展開"(オーガナイザー:黒田公美、佐藤真)第57回日本小児神経学会学術集会、帝国ホテル大阪(大阪府大阪市)、2015年5月28-30日

(5) Kazunori Nakajima, "Cell migration in the developing cerebral cortex", EMBO Workshop: "Cortical development in health and disease", Weizmann Institute of Science, Rehovot (Israel), 2015年4月26-29日

(6) Kazunori Nakajima, "Mechanisms of cerebral corticogenesis by migrating neurons (動く細胞が作る大脳皮質の形成機構)"、シンポジウム:"大脳皮質の発生・発達を問う「生理」と「解剖」の層状連携シンポジウム"(オーガナイザー:宮田卓樹、大木研一)第92回日本生理学会大会 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会、神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)、2015年3月21-23日

(7) 仲嶋一範、"動く細胞がつくる大脳皮質の構築機構"、メディカルイノベーションセンターセミナー、京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター(京都府京都市)、2015年2月6日

(8) 仲嶋一範、"動く細胞たちによる大脳皮質形成機構とその破綻"、第7回神経化学の若手研究者育成セミナー、第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学会大会、奈良県文化会館・奈良県新公会堂(奈良県奈良市)、2014年9月29日-10月1日

(9) 仲嶋一範、"大脳皮質の構造が作られるメカニズム"、新潟大学神経解剖学セミナー、新潟大学医学部(新潟県新潟市)、2014年6月27日

(10) Kazunori Nakajima, "Neuronal migration and layer formation in the developing cerebral cortex", Special Interest Subgroup: "Cellular and Molecular Mechanisms Involved in Migration and Polarization of Cortical Neurons During Development", 2013 The American Society for Cell Biology (ASCB) Annual

Meeting, New Orleans Memorial Convention Center, New Orleans (U.S.A.), 2013年12月14-18日

(11) Kazunori Nakajima, "Mechanisms of layer formation in the cerebral cortex", Symposium: Neocortical Development and Circuit Formation - How is the Mammalian-Specific Brain Structure Formed? (オーガナイザー:仲嶋一範、花嶋かりな)、第36回日本神経科学大会・第56回日本神経化学会大会・第23回日本神経回路学会大会合同大会(Neuro2013)、国立京都国際会館(京都府京都市)、2013年6月20-23日

[その他]

(1) プレスリリース:「神経細胞が特定のタイプにのみ分化するメカニズムを解明」
http://www.keio.ac.jp/ja/press_release/2015/osa3qr000001f7dc.html

(2) プレスリリース:「脳の神経細胞は、置かれた場所の環境によって別の種類の神経細胞に変わってしまうことを発見」
http://www.keio.ac.jp/ja/press_release/2015/osa3qr000001e2d2.html

(3) アウトリーチ活動:仲嶋一範、"動く細胞たちが脳を作るメカニズム"、独立行政法人科学技術振興機構グローバルサイエンスキャンパス事業 高校生対象講演、慶應義塾大学信濃町キャンパス、東京、2015年12月26日

(4) アウトリーチ活動:仲嶋一範、"動く細胞たちが織りなす脳の形づくり"、学校法人桐朋学園 桐朋中学・高等学校、国立(東京都)、2013年11月19日

(5) アウトリーチ活動:仲嶋一範、"記念講演:脳ができるときの神経細胞たちの振る舞い"、平成25年度「めんたるぶれい」全国指導者研修大会、ワイズ企画(知能教育教材出版)、AP東京八重洲通り、東京、2013年8月6日

6. 研究組織

(1) 研究代表者
仲嶋 一範 (NAKAJIMA KAZUNORI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 90280734

(2) 研究分担者
なし

(3)連携研究者

荒巻 道彦 (ARAMAKI MICHHIKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20338099