

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25650076

研究課題名(和文) 個体のライブイメージングによる神経細胞産生制御因子の同定

研究課題名(英文) identification of regulatory factors for generation of neurons by using live imaging of embryos

研究代表者

瀬原 淳子 (Sehara, Atsuko)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：60209038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物において脳組織が形成される際、神経幹細胞から神経前駆細胞が生じ、さらに分裂を終えた神経細胞が生ずるが、分裂を終えた神経細胞が産生・蓄積する仕組みの研究は遅れている。我々は、ゼブラフィッシュ中脳視蓋形成をモデルとして、この問題に取り組んだ。ライブイメージングにより神経幹細胞・前駆細胞、神経細胞を可視化し、生きた脳では、受精後ほぼ決まった時間に脳の基底側(外側)から細胞分裂を終えた神経細胞の産生が始まり、そこから脳室側(内側)に向けて産生された脳細胞が蓄積していくことを見いだした。さらに、このような秩序ある神経細胞の産生がニューレグリン-ErbBシグナルに依存することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：During brain development, neural progenitor cells (NPCs) proliferate and produce post-mitotic neurons. The extent of NPC expansion and the timing of neuron production should impact on the size and shape of the brain. Here, we show that neuronal generation from NPCs is not a stochastic event, but instead a spatially and temporally regulated process and depends on Neuregulin 1 type II (NRG1-II), an isoform of an EGF-related ligand NRG1, using the optic tectum (OT) of zebrafish embryos as a model system. Knocking-down NRG1-II or treatment with AG1478, an ErbB inhibitor, impaired neuron production from sub-basal NPCs prominently. The removal of AG1478 resumed sub-basal mitoses without affecting mitoses in the apical ventricular (V) region. Injection of soluble human NRG1 into the brain ameliorated neurogenesis of NRG1-II-depleted embryos, implying involvements of NRG1-ErbB signaling in neuron production in the developing vertebrate brain.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：細胞分化 増殖因子 神経分化 ゼブラフィッシュ ライブイメージング ニューレグリン

1. 研究開始当初の背景

脳発生において神経細胞の産生は、おおまかに神経幹細胞から神経前駆細胞が産生される Step1、神経前駆細胞が分裂を経て非増殖性の神経細胞が産生される Step2 の2段階に分けられる。神経細胞の産生に関しては様々な分子機構が知られる。特に、これまでの研究によって、神経分化に関与する転写因子の解明が進んでいる。Step1 だけでなく、Step2 に関しても、NeuroD などの転写因子がそれを制御することがわかっている。Step1 に関しては、転写因子だけでなく、miRNA の関与についても、多くの報告が出始めている。また、FGF や Notch など、細胞間シグナリングの関与についても、多くの知見が得られつつある。それに対して、後者の Step2 については、未解明なところが多く、このプロセスが細胞自立的なプログラムで進行するのか、何らかの外部シグナルに依存するのかは、これまで殆ど未解明であった。

本研究は、この過程に関与する細胞外シグナルの存在とその分子実体を証明しようと考えた。神経分化は脳の大きさや形に直接的に結びつくものであり、発達脳における神経分化を調べるには、切片などの断片的な情報ではなく、3次元的にその分化を構築する必要がある。また、哺乳類の哺乳類の脳の発達機構を調べる上で、神経が産生され始める時期の生きた胚で、非侵襲的に神経細胞産生の現場を捉えることができれば、それは経時的に取り出した固定脳に比べて、きわめて有用な知見をもたらすと考えられる。しかし現時点では、マウスなどの哺乳類でそれを実現することは非常に難しい。

そこで本研究では、頭部も含め、からだの透明度が極めて高いゼブラフィッシュ胚を用いた研究を行おうと考えた。神経産生過程を生きたゼブラフィッシュ個体で解析するために、神経前駆細胞と神経細胞をそれぞれ緑色・赤色蛍光で可視化したダブルトランスジェニック

ゼブラフィッシュ (Tg (neurogenin2-GFP: brn3a-RFP)、図1参照)などを脊椎動物の脳のモデル系として選び、生きた個体における神経分化のメカニズム、特に、Step2 に必要な細胞間シグナルを探ることにした。注目する2つの細胞、神経前駆細胞と、それらの分裂を経て生ずる非増殖性の神経細胞を同時に異なる蛍光タンパク質で可視化した個体を用いて解析すれば、神経分化の現場を捉えることができるはずだからである。

そして、細胞間シグナルとしては、ErbB シグナルに着目した。ErbB リガンドは、遺伝子の種類が多い上、スプライシングによりさらに数多くの候補があることから、アンチセンスモルフォリーノを用いて関与しうるリガンドを効率よくノックダウンし、それらの効果を網羅的に絞り込めることができる点も、この系の優れたところであると考えた。また最近、TALEN による遺伝子欠損技術が開発された。モルフォリーノによるオフターゲット効果の可能性をのぞくことにより、より確かな結論が得られることが期待された。

2. 研究の目的

脳発生において神経細胞の産生は、おおまかに神経幹細胞から神経前駆細胞が産生される Step1、神経前駆細胞が分裂を経て非増殖性の神経細胞が産生される Step2 の2段階に分けられる。神経細胞の産生に関しては様々な分子機構が知られるが、後者の Step2 が細胞自立的なプログラムで進行するのか、何らかの外部シグナルに依存するのかは未解明であった。本研究は、この過程に関与する細胞外シグナルの存在とその分子実体を証明する。すでに我々は、生きた胚の脳を可視化できるゼブラフィッシュを用いて、Step2 が ErbB シグナリングにより制御されることを見出している。このシグナルの作用機構の解明により、脊椎動物の基本的な脳構築機構に新たな普遍的原理を提示する。

3. 研究の方法

①ゼブラフィッシュを用いた神経細胞産生過程 Step2 の ErbB シグナル依存性の証明

この時期の神経過程での ErbB レセプター、主なリガンドの発現は、whole mount in situ hybridization (WISH)によりすでに解析済みである。神経前駆細胞と神経細胞をそれぞれ赤色・緑色蛍光により同時に可視化できるトランスジェニックゼブラフィッシュ (tg(neurogenin2-GFP;brn3a-RFP)の卵に ErbB シグナリングに関与するレセプターおよびリガンド遺伝子とそのスプライシングフォームに対するアンチセンスモルフォリーノをインジェクトすることによりこれらの発現を抑制し、Step2 に関与する分子群を同定した。

同定できた分子の主なものに関しては、TALEN を用いて遺伝子欠損ゼブラフィッシュを作成し、その効果を確認中である。

②ErbB シグナリングに依存する神経産生機構の精査

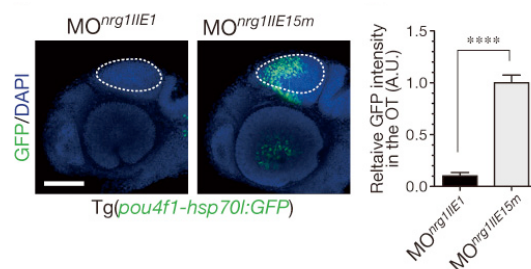
これらの神経前駆細胞は、intermediate progenitor と呼ばれる細胞で、自己増殖能と増殖能を持たない神経細胞を生み出す能力、すなわち分化能を併せ持つ細胞である。このどちらの能力が欠損しても、神経細胞の産生不全がもたらされるはずである。ErbB シグナリングは、これらのどちらのプロセスに関与しているのだろうか。また、神経前駆細胞の種類も一種類とは限らないことから、これに関してはコントロール・欠損胚の神経前駆細胞・神経細胞数の発生過程に伴う変化を、3D イメージの定量的評価によって調べるとともに、遺伝子発現による定性的な差を調べた。さらに、個々の神経幹細胞から神経前駆細胞が産生され増殖する様子、あるいは神経前駆細胞から神経細胞が産生される様子を生体内でモニターし、それらにおける神経細胞マーカーの活性化を可視化できるベクターを用いて、1個の前

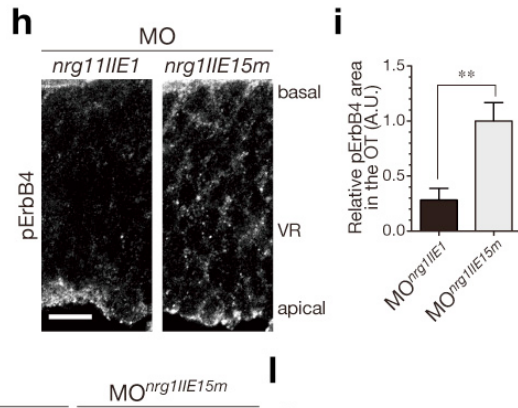
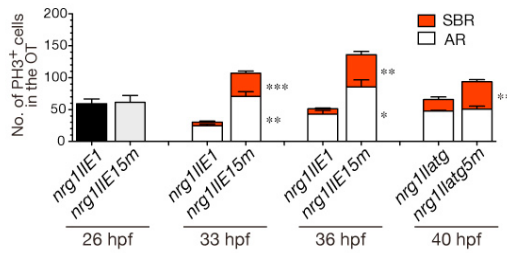
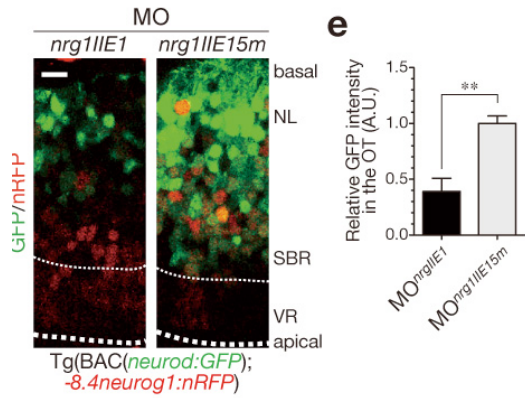
駆細胞から神経細胞が産生されるまでの様子を調べ、ErbB シグナリングの作用点を検証した。

一方、もうひとつの重要な問題は、このシグナリングに関わる ErbB リガンドが、どの細胞で産生されてどこに局在するのか、という問題である。同定されたリガンドの mRNA の局在からその細胞を同定し、抗体を用いてその局在を調べた。またこれに関連して、シグナルを受け取る前駆細胞の時間的空間的分布を、レセプターのリン酸化フォームに対する抗体などによって調べた。これらの検討によって、Step2 における神経細胞の産生において、ErbB リガンドが時間的空間的にどのように前駆細胞に作用しているかを検討した。

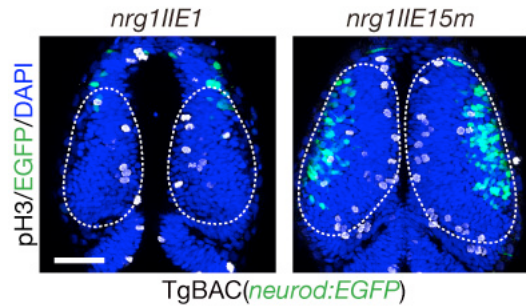
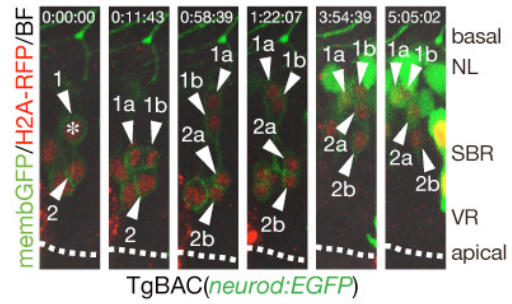
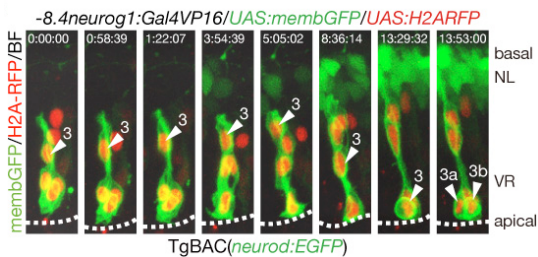
4. 研究成果

一過的な ErbB 阻害剤処理あるいはアンチセンスモルフォリーノによる遺伝子の発現抑制によって、ErbB シグナルが神経前駆細胞から神経細胞の産生に重要な役割を果たすことを見出した。特に、種々のアイソフォームを有する ErbB リガンド、ニューレグリンの中で、type II ニューレグリンが、神経分化に重要な役割を果たすことを示した。また、typeII ニューレグリンのノックダウンは、Step1 および Step2 の両方に影響を及ぼすことや、ErbB4のリン酸化は、発達する脳全体で認められることから、それら両方のプロセスに関与することが示唆された。神経産生のプロセスにおける ErbB シグナルの新たな作用点を発見できたのは、生きた個体、しかも注目する2つの細胞を同時に異なる蛍光タンパク質で可視化した個体を用いて解析できたことによる。

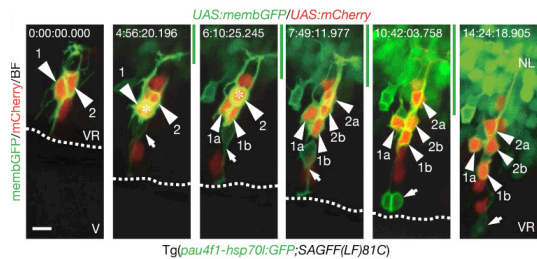
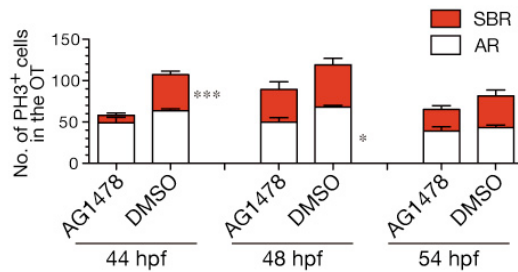




また、このような神経分化可視化個体を用いた解析をすることによって、発生脳において神経前駆細胞の分裂は、脳室領域(ventricular region)の apical 側と、 marginal zone に近い、subbasal region の2か所で行われるが、神経細胞を生み出す分裂は、もっぱら後者の領域で行われることを示した。



そして、ErbB インヒビターを用いて ErbB シグナルの一時的な低下をもたらすことによって、Step2、つまり神経前駆細胞から分裂後の神経が産生されるプロセス自体が、ErbB シグナル依存的に行われることを明らかにすることが出来た。



これらの結果から、神経分化、特に神経前駆細胞から神経細胞が産生されるプロセスに、ErbB シグナリングが必要であることを明らかにした。

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 3 件)

Wakatsuki, S., Araki, T., Sehara-Fujisawa, A.
(2014) Neureglin-1/Glial Growth Factor
stimulates Schwann Cell Migration by
including the $\alpha 5 \beta 1$ integrin-ErbB2-Focal
Adhesion Kinase Complex Formation. Genes
to Cells, 19(1): 66-77. 査読有、DOI:
10.1111/gtc.12108.

Sakai, H., *Sato, T., Sakurai, H., Yamamoto, T.,
Hanaoka K., Montarras, D., *Sehara-Fujisawa,
A. (2013) Fetal Skeletal Muscle Progenitors
Have Regenerative Capacity After
Intramuscular Engraftment in Dystrophin
Deficient Mice. PLoS ONE, 8(5): e63016, 査
読有、DOI: 10.1371/journal.pone.0063016

Tanaka, A., Woltjen, K., Miyake, K., Hotta, A.,
Ikeya, M., Yamamoto, T., Nishino, T., Shoji,
E., Sehara-Fujisawa, A., Manabe, Y., Fujii, N.,
Hanaoka, K., Era, T., Yamashita, S., Isobe, K.,
Kimura, E., and *Sakurai, H.. (2013) Efficient
and reproducible myogenic differentiation
from human iPS cells: prospects for modeling
Miyoshi Myopathy in vitro. PLoS ONE, 8(4):
e61540. 査読有、DOI:
10.1371/journal.pone.0061540

[学会発表](計 6 件)

Atsuko Sehara: Exploring Mechanisms of
Cellular Differentiation by 3- and 4-
dimensional (3D+time) imaging. Kickoff
Meeting of Imaging Platform for Spatio-
Temporal Information, Kyoto University
(2013年5月23日 京都府京都市) (招待講
演)

瀬原淳子: 生命誕生の設計図を解く、第6回
形態科学シンポジウム「医学・生物学研究の
魅力を語る: 高校生のための集い」
(2013.10.12 京都府京都市) (招待講演)

Fuminori Sato, Hiroyuki Kangawa, Hiroyuki
Arai, Kazuya Tsumagari, Atsuo Kawahara,
Koichi Kawakami, Atsuko Sehara-Fujisawa:
Roles of ADAM Proteases in Development
of Zebrafish. the 8th General Meeting of the
International Proteolysis Society.
(2013.10.23 Cape Town, South Africa) (招
待講演)

Atsuko Sehara: Exploring Roles of ADAM
proteases Using Zebrafish. Swiss-Kyoto
Symposium (2013.11.21-22 Zurich, Swiss)
(招待講演)

Atsuko Sehara: Exploring Roles of ADAM
proteases Using Zebrafish. 国立台湾大学—
京都大学シンポジウム (2013.12.19-20 台
湾、台北) (招待講演)

Atsuko Sehara-Fujisawa: Roles of ADAM19 in
cranial nerve development. The 6th Asia
Oceania Zebrafish Conference. (2014.1.22
中国、香港) (招待講演)

[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

瀬原 淳子 (Atsuko Sehara)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号:60209038

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: