

博士論文

大脳皮質神経系前駆細胞におけるニューロン分化能制御機構の解析
後藤研究室 学生番号 127131 酒井寛

目次	2
略語一覧	3
緒言	5
序論	6
材料と方法	25
実験結果	32
考察	46
結言	53
参考文献	54
発表実績	60
謝辞	61

略語一覽

Ac	Acetylated
aCSF	Artificial cerebrospinal fluid
bHLH	Basic Helix-Loop-Helix
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Bovine Serum Albumin
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
Coup	Chicken ovalbumin upstream promoter
Coup-TF1	Coup transcription factor 1
CP	Cortical plate
DIV	Days <i>in vitro</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribo nucleic acid
DNMT	DNA methyltransferase
E~	Embryonic day ~
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFP	Enhanced GFP
ES cell	Embryonic stem cell
FGF	Fibroblast Growth Factor
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Green fluorescent protein
HAT	Histone acetyl transferase
HDAC	Histone deacetylase
HMGA	High Mobility Group AT-hook
HMT	Histonemethyltransferase
ICC	Immunocytochemistry
IHC	Immunohistochemistry
IMP2	Insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 2
IMZ, IZ	Intermediate zone
iPS cell	Induced pluripotent stem cell

IRES	Internal ribosome entry site
JAK-STAT	Janus kinase-signal transducer and activator of transcription
LIF	Leukemia inhibitory factor
MBD	Methyl-CpG binding domain
Me	Methylated
MECPs	Methyl-CpG-binding proteins
MEK	Mitogen-activated-protein-kinase-kinase
miRNA	Micro RNA
MZ	Marzinal zone
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NBT	Nitro-Blue Tetrazolium chloride
Ngn1/2	Neurogenin 1/2 (Neurog 1/2)
NICD	Notchintercellular domain
N-Myc	Neural Myc
NPC	Neural precursor cell
P	Phosphorylated
PBS	Phosphate-buffered saline
PcG	Polycomb group proteins
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyde
Plag1	Pleomorphic adenoma gene 1
RNA	Ribonucleic acid
RT	Reverse transcription
SDS	Sodium dodecyl sulfate
shRNA	Short hairpin RNA
SVZ	Sub-ventricular zone
TBP	TATA box-binding protein
TCF	T cell factor
Tbr2	T-box brain protein 2 (Eomes)
UTR	Untranslated region
VZ	Ventricular Zone
WAD	Weighted average difference
Wnt	Wingless-type MMTV integration site family

諸言

脳は生命の進化の中でも究極の産物であると私考えている。

進化の過程の中で、脊椎動物の中でも哺乳類さらにその中でも霊長類と、次第に脳の大きさは大きくなり、その複雑性も増してきた。特に哺乳類において大脳新皮質は大きく、より複雑になっている。

その結果、大脳新皮質で言語を用いた意思疎通、より複雑な考察力、感情などをつかさどるようになった。まさにこの点こそが私の興味が掻き立てられるところであり、脳なかでも大脳新皮質が幹細胞からどのように発達するかその解明に興味をもって研究に取り組んだ。

大脳は高次認知機能を有する生物にとって重要な器官であり、特に哺乳類の大脳新皮質は行動、学習、思考、言語、認知などの制御に携わる。中枢神経系はニューロンやその機能をサポートするグリア細胞(アストロサイト、オリゴデンドロサイト)からなり、これらの細胞は発生過程で多分化能をもつ神経系前駆細胞から生み出される。脳が正常に発生し機能するためには構成する細胞が正確な種類、正しい数、神経系前駆細胞から生み出されることが必須である。ニューロンは発生初期のニューロン産生期においてしか生み出されず、発生後期のアストロサイト産生期では産生されない(Hirabayashi et al., *Neurosci Res.* 2005; Liqun YB et al., *An overview Archives of Biochemistry and Biophysics* 2014; Masakazu N et al., *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008; Magdalena Götz & Wieland B. Huttner *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005)。つまり、神経系前駆細胞のニューロン分化に関わる過程が大脳新皮質の正確な形成において重要なステップの一つであると言っても過言ではない。しかし、この過程に関わる制御機構についてまだ明かされていない部分が多い。

神経系前駆細胞からニューロンの産生は主に胎生期に産生され、出生以降ではほとんど産生できなくなることは上述したが、どのようなメカニズムがこの現象を支えているのであろうか。当研究室の先行研究によって神経系前駆細胞が早期でニューロン産生能をもつメカニズムのひとつとして、クロマチン構造因子 high mobility group A (HMGA)の関与が解明された(Kishi, Fujii et al., *Nat. Neuro.* 2012)。HMGA タンパクは早期神経系前駆細胞で発現が高く、時期が経るにつれてその発現が減少することがわかっている。また、ニューロン分化能を失った出生後の神経系前駆細胞にHMGAを過剰発現すると再びニューロン産生が上昇することが知られている。従って神経系前駆細胞のニューロン分化能にHMGA タンパクが大きく貢献していると言える。しかしながら、HMGA がどのようにして神経系前駆細胞のニューロン分化能を制御しているかは未だに明らかではない。

当研究室の先行研究によって、HMGA の下流で神経系前駆細胞において発現が上昇する遺伝子として Plag family proteins のひとつである Pleiomorphic Adenoma Gene1(Plag1)が同定された。神経系前駆細胞でHMGA2を過剰発現するとPlag1の発現は大きく上昇した。また、Plag1の発現について調べたところ、ニューロン産生期の神経系前駆細胞で発現が高く、ニューロン分化していくにつれて低下すること、また発生後期のアストロサイト産生期神経系前駆細胞では発現が低いこと、すなわち Plag1 の発現量と神経系前駆細胞のニューロン分化能が相関していることが分かっている(unpublished data)。しかし、神経系前駆細胞のニューロン分化制御に関するPlag1の機能はこれまでほとんどわかっていなかった。

そこで本研究においては HMGA がニューロン分化能の制御において、Plag1 の発現の調整を介している可能性を考えた。その検証のため、まずはこれまで神経系前駆細胞において機能未知であった Plag1 がニューロン分化に関与しているかどうかの検証を行った。

序論

脳は生命活動維持、運動制御などさまざまな情報の処理、出力をつかさどる高次機能処理器官である。中でも大脳新皮質は感情、認知、学習など生物の中でもとりわけ高次とされる機能をつかさどる。

この大脳新皮質は様々な領域に分かれており、それぞれで機能を分担することが分かっている運動野、前頭葉、側頭葉などである。領域によって分担する機能は異なるが、それらを構成する細胞はすべて、神経系前駆細胞とよばれる幹細胞の一種である細胞群より生み出される。

幹細胞

幹細胞とは、多分化能をもちながら、自身も自己増殖することができる未分化な細胞の事である。ES 細胞や、iPS 細胞といった人工的に単離された、ほぼすべての臓器に分化することができる細胞があれば、生体内には組織・臓器に特化した幹細胞も存在する。

ES 細胞は、人間の受精卵の胚盤胞存在する内部細胞塊から作りだされる。培養によって増殖させることが可能であり、三胚葉系の全ての細胞を生み出す分化多能性(pluripotency)を持つ(James A. Thomson et al., Science 1998; Jon S. Odorico et al., Stem Cells 2009; Charles E. Murry et al., Cell 2008)。人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) も同様の性質を持ち、山中四因子とよばれる四種類の遺伝子を体細胞などの分化細胞に導入することで誘導された(Takahashi & Yamanaka 2006; Takahashi et al. 2007; Yu et al. 2007b)。この発見は、「分化した細胞は未分化細胞に戻らない」という分子生物学の常識の一つを覆す大きな発見であった。ES 細胞には作成方法上の倫理的問題が大きな障壁となっているため、この iPS 細胞を用いた研究、治療の開発は盛んに現在も行われている。

ES 細胞や iPS 細胞は人工的に単離・培養して取得する細胞であるが、生体内にも幹細胞が存在する(Bin Zhao et al., Nature cell biology 2011, Ghinassi B et al., J Cell Physiol. 2010)。生体内に存在する幹細胞は組織幹細胞とよばれ、自身が存在する組織内の様々な細胞を作り出す分化多能性 (multipotency) と、自己複製能(self-proliferation)を持つ。肝臓(Grisham et al., Research Triangle Park 1998)や、血球系(C M Baum et al., PNAS, 1992)などにも幹細胞は存在し、自身は未分化性を維持しつつ、それぞれの組織に特化した細胞を分化して生み出す。神経系にも同様に存在し、神経やそれらの機能をサポートするグリア細胞などを生み出している(Sakakibara S et al., Dev Biol. 1996; Samuel W et al., Journal of Neuroscience; Sally T., Nature 2001; Hirabayashi et al., Neurosci Res. 2005)。それらの細胞群は神経系前駆細胞と呼ばれている。

神経系前駆細胞の経時的なポテンシャル変化

脳を構成する細胞全てを生み出す神経系前駆細胞だが、分化および細胞の産出の過程に大きな特徴がある。それは発生の時期依存的に神経系前駆細胞の性質が変化していくことである。マウスの場合、発生初期にあたる胎生 10 日目までは神経系前駆細胞自身の自己増殖が主になる増殖期 (Expansion Phase) である。次にニューロン産生期 (Neurogenic Phase) とよばれる時期に入り、発生過程ではこの時期において主に神経は産生される。また産生されるニューロンの種類もニューロン産生期の中で時期依存的に変化しており、初期には大脳新皮質深層部のニューロンが、そして後期になるにしたがって表層部のニューロンが産生される。産生されたニューロンは分化すると表層側に向かって移動を開始し、生み出された順に表層へと積み重なり、大脳新皮質を形成することが分かっている (Hirabayashi et al., *Neurosci Res.* 2005; Liqun YB et al., *An overview Archives of Biochemistry and Biophysics* 2014; Masakazu N et al., *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008; Magdalena Götz & Wieland B. Huttner *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005)。

そしてニューロン産生期の次にアストロサイト産生期 (Astrogenic Phase) と呼ばれる時期に入り、上述したニューロンの機能をサポートする働きをもつグリア細胞や、アストロサイトを産生する時期に入る (図 1)。

神経系前駆細胞がニューロン分化するメカニズム

ニューロン分化促進シグナル

- 外因性因子

神経系前駆細胞のニューロン分化を誘導する外因性因子としては PDGF (血小板由来成長因子; Platelet-derived growth factor) や Wnt などが報告されている。PDGF はニューロンに運命が決定した前駆細胞を選択的に増殖させることでニューロン数を増加し分化に寄与することが知られている (Johe et al. *Genes Dev* 1996; Williams et al. 1997; Erlandsson et al. 2001)。また PDGF によって

MEK-ERK 経路が活性化され、その下流で CAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) family が α I チューブリン等のニューロン関連遺伝子の発現を直接促進する (Menard et al. 2002; Paquin et al. 2005; Liu et al. 2006)。Wnt はファミリータンパク質であり、マウスの胎生期大脳新皮質においては Wnt7a の発現が高く、その Wnt7a は神経系前駆細胞の膜表面に存在する 7 回膜貫通型タンパクである Frizzled と LRP5/6 によって受容されることで、刺激が神経系前駆細胞内に入る。Wnt 刺激が入ると細胞内では β カテニンの安定化が起こり、これが核内に移行し TCF や LEF と言った転写因子と複合体を形成して標的遺伝子の発現を上昇させる。 (Bryan T et al., *Dev Cell.* 2009; Clevers H et al., *Cell.* 2012) ニューロン分化誘導因子である Neurog1 (以下 Ngn1) の上流には TCF/ β カテニン複合体の結合ドメインが存在し、Wnt によるシグナル経路の一つは Neurog1 の発現を上昇することで神経系前駆細胞のニューロン分化を促進していることが分かっている (Hirabayashi Y et al., *Development.* 2004, 図 2)。

- 内因性因子

大脳新皮質の発生において、ニューロン分化の中心的な役割を担うものとして Ngn1、Ngn2 や Mash1 が報告されている。(Bertrand et al. Nat Rev Neurosci 2002; Helms & Johnson Curr Opin Neurobiol 2003; Schuurmans et al. EMBO J 2004; Hand et al. Neuron 2005)。

これらの因子の働きは、神経系前駆細胞をニューロン分化への運命決定をすることである (Tomita et al. EMBO J 2000; Nieto et al. Neuron 2001; Sun et al. Cell 2001)。これらの遺伝子の発現が低下してくるとニューロン分化は低下し、かわってアストロサイトが産生されることが報告されている。(Tomita et al. EMBO J 2000; Nieto et al. Neuron 2001)。Ngn は転写因子として機能し、下流で NeuroD1/4 などの他の遺伝子の発現を促進しながら神経系前駆細胞をニューロンへと分化させる (Sun Y. et al., Cell 2001)。

また N-Myc も重要な内因性因子として知られている。N-Myc は Myc ファミリータンパクの一種である。Myc は bHLH 型転写因子であり、転写因子 Max と複合体を形成することで E-Box 配列特異的に結合し、転写をポジティブに制御することが知られている (Lüscher B Gene 2001)。神経系前駆細胞における N-Myc の過剰発現は神経幹細胞の数を減らし、逆にニューロン前駆細胞の数を増やすこと、さらに大脳皮質神経幹細胞の *in vitro* 初代培養系を用いた実験を行った結果、Wnt シグナルと N-Myc は神経幹細胞からニューロン前駆細胞への分化を誘導するとともに、ニューロン前駆細胞の増殖を促進している事が報告されている (Kuwahara et al., Development 2010; 図3)。また、N-Myc ノックアウトマウスの大脳皮質においてはニューロン前駆細胞の数が減少し、ニューロンの数も減少していたことから Wnt-N-Myc 経路がニューロン数を適切な数に維持することに必要である事が示唆されている。

ニューロン分化抑制シグナル

先ほど述べた Wnt シグナルなど、ニューロン分化を誘導する因子は神経系前駆細胞の存在する脳室帯で分泌されている。したがって、神経系前駆細胞はすべてニューロンに分化してしまうことが予想されるが、実際はそうならない。このことから神経系前駆細胞には未分化性を維持する仕組みが備わっていることが予想される。これまでの研究では Notch シグナルが神経系前駆細胞の未分化性の維持に貢献することが知られており (Alexon TO et al., Dev Neurosci. 2006; Imayoshi I et al., J Neurosci. 2010)、ニューロン分化を抑制する機能も担っていると考えられる。当研究室では Tcf3 が最も未分化な神経系前駆細胞群で発現していること、Tcf3 の発現が低下し、逆に Wnt 経路を促進的に働く TCF ファミリーの Tcf1 Lef1 の発現が上昇することも見出した。即ち、Wnt シグナルが十分に入るまでは、神経系前駆細胞が容易にニューロン分化しないようにブレーキとして Tcf3 が働くニューロン分化への「ゲート機能」が備わっていることが示唆された (Kuwahara A, Sakai H, Xu Y et al., Plos One 2014)。

以上の通り、ニューロン分化に関しては外因性、内因性のものを含めて多くのシグナルがかか

わって調製されており、いまなお解明されていない部分も多い。

アストロサイト産生期シグナル

● 外因性因子

アストロサイト産生に関与する外因性因子としてはLIFなどのサイトカインや、BMPシグナル経路、Notchシグナル経路の関与が知られている。

細胞外に存在するサイトカインは受容体に結合されることLIFR β とgp130にヘテロ二量化が起き、さきほどのJAK-STAT経路の活性化される。BMPシグナル経路は抑制性のbHLHであるId1の転写を促進して、ニューロン関連のbHLH型転写因子であるNgn1やNgn2等と拮抗する(Nakashima et al. Proc Natl Acad Sci USA 2001)。

Notchシグナルは神経系前駆細胞の未分化性を保つのに重要であることが知られている(Gaiano et al. Neuron 2000)が、アストロサイト分化を促進する働きも明らかになっている(Kadesch Curr Opin Genet Dev 2004; Louvi & Artavanis-Tsakonas Nat Rev Neurosci 2006)。膜貫通型タンパクであるNotch受容体はリガンドが結合すると活性化され、 γ セクレターゼによって切断される。切断された細胞内ドメイン(NICD; Notch-InterCellular Domain)は核移行し、転写因子RBPJ κ と相互作用して転写因子複合体を形成し、RBPJ κ のターゲット遺伝子の転写を活性化する。JAK-STAT経路が活性化されているときには、NICD/RBPJ κ 複合体はGFAPのプロモーターに結合して転写を促進する(Ge et al. Neurosci Res 2002)。

● 内因性因子

アストロサイト分化に関与する細胞内のシグナル経路としてはJAK-STAT経路(JAK; janus kinase, STAT; signal transducers and activator of 12 transcription)が知られている。LIFなどのサイトカインによって活性化されたSTATはp300/CBP、smadと複合体を形成し、GFAPやS100 β といったアストロサイト特異的遺伝子のプロモーターに結合して転写を活性化することが知られている(Nakashima et al. Science 1999)。

また、NagaoらによってZbtb20がアストロサイト産生において重要な役割をもつことも報告されている。Zbtb20はアストロサイト産生期神経系前駆細胞において発現が高くなり、これをノックダウンするとアストロサイト産生は抑制され、ニューロンの産生が増加する。また、そのメカニズムであるが、神経系前駆細胞においてZbtb20はSox9、NFIAと協調的に働き、ニューロン産生に必要な転写因子であるBrn2、おりお伝泥サイト産生に必須の転写因子Sox10の発現をコントロールすることで、神経系前駆細胞のアストロサイト産生をコントロールしていると報告されている(Nagao.M et al., Nature Com. 2016)。

先ほど、神経系前駆細胞はニューロン産生期の後にアストロサイト産生期に入ると述べたが、ニュー

ーロン分化産生期にはアストロサイトが生み出されず、逆にアストロサイト産生期にニューロンが生み出されないことも知られている。その機構としては以下のことが知られている。

ニューロン産生期でアストロサイト産生を抑制するメカニズム

ニューロン産生期においてはニューロン分化を促進する Neurog が BMP 刺激で活性化され形成された Smad/p300 複合体と会合して、LIF と BMP 刺激による Smad/p300/STAT3 複合体形成を阻害することでアストロサイトへの分化を抑制することが知られている(Sun et al. Cell 2001)。

ニューロン分化期にはアストロサイト特異的遺伝子である GFAP や S100 β のプロモーター領域の STAT 結合配列の DNA がメチル化されてメチル化 CpG 結合タンパクである MeCP2 が結合し、クロマチンの構造を不活性化している (Takizawa et al. Dev Cell 2001; Fan et al. Development 2005)。ErbB4-NCOR シグナルもアストロサイト分化の抑制に寄与している(Sardi et al. Cell 2006)。

また前述の Nagao らによって、Zbtb20 と NFIA/Sox9 の転写因子複合体がオリゴデンドロサイト産生に必須の Sox10 の発現を抑制することも報告されている(Nagao M et al., Nature Com. 2016)。

アストロサイト産生期にニューロン分化が抑制されるメカニズム

ニューロン分化に Wnt シグナルが寄与する事は前述したが、グリア分化期に進んでニューロン分化が終了する際には、Wnt リガンドがなくなるわけではなく、むしろ神経系前駆細胞自身の内因的な変化により Wnt シグナルを与えても Ngn 遺伝子の転写が起こらなくなっている事が明らかになっている (Hirabayashi et al. Neuron 2009)。Ngn1 のプロモーター領域では、抑制性のエピジェネティクス制御因子であるポリコーム群タンパク質複合体によって発生時期依存的にヒストン H3 の 27 番目のリジン(H3K27) のトリメチル化 (H3K27me3) が上昇し、グリア分化期には抑制性のクロマチン状態となる。このことはグリア分化期にニューロン分化が起こらなくなることの理由のひとつである。

グリア分化期になって Ngn 遺伝子の発現が減少すると、Ngn1, 2 と結合していたコアクティベーター-p300/CBP は STAT と結合し、前述のようにアストロサイト特異的遺伝子のプロモーターに結合して遺伝子発現を活性化する(Nakashima et al. Science 1999)。また、ニューロン分化期におけるアストロサイト特異的遺伝子の抑制は外因的なシグナルが入る事によって外れ、そのことによってアストロサイトやオリゴデンドロサイトが産生されることが分かっている。例えば、Notch のシグナルが入ると転写因子 NFIA が活性化されて DNA メチル化酵素である Dnmt1 をアストロサイト特異的遺伝子のプロモーター領域に結合できなくする (Namihira et al. Dev Cell 2009)。このことによって DNA のメチル化によるアストロサイト特異的遺伝子の抑制が外れると

考えられている。また、転写因子 CoupTF1,2 はアストロサイト産生期への移行を促進し、アストロサイト特異的遺伝子領域における DNA のメチル化を下げる (Naka et al. Nat Neurosci 2008)。先述の Nagao らの報告にもニューロン産生抑制のメカニズムが報告されており、Zbtb20 と NFIA/Sox9 の転写因子複合体がニューロン産生に必須の転写因子の一つである Brn2 の発現を抑制することで、アストロサイト産生期のニューロン分化の抑制を行っている、と報告されている (Nagao.M et al., Nature Com. 2016)。

ニューロン分化の詳細なメカニズム

ニューロン分化は神経系前駆細胞から成熟したニューロンになるまでに、さらに3つの段階に分けられる

すなわち、

- ① 神経系前駆細胞が未分化性を維持しつつ、同時にニューロン分化するポテンシャルを維持している状態
- ② 実際にニューロン分化が始まり、様々な遺伝子の発現の変化などが開始されるプロセス
- ③ 分化を開始したニューロンが成熟してゆき、実際にニューロンとして機能していく段階

このうちの②の段階においては前述の Wnt などの外因性因子や Neurog といった内因性因子が知られている (Bertrand et al. Nat Rev Neurosci 2002; Helms & Johnson Curr Opin Neurobiol 2003; Schuurmans et al. EMBO J 2004; Hand et al. Neuron 2005; Kuwahara et al., Development 2010)。

未分化ではあるが、ニューロン分化能を維持しているだけの状態に関する考察

ニューロン産生期の神経系前駆細胞は自己複製可能な未分化状態でありながらも、ニューロン分化能を維持している。すなわち、このことによって神経系前駆細胞は自己複製により数を維持しながら、ニューロンを生み出し脳の正常な発生は支えられているといっても過言ではない。では、この未分化でありながらニューロン分化能を維持する仕組みはどのようなになっているのであろうか。

その神経系前駆細胞のニューロン分化能の維持に、HMGA が重要な貢献をするという報告が当研究室の先行研究によってなされた。

HMGA はおよそ 100 のアミノ酸からなるタンパク質であり、HMGA1 と HMGA2 の 2 つの遺伝子が存在する。それぞれは AT-hook と呼ばれる DNA 結合ドメインを持ち、DNA 上の AT 配列に富んだ副溝に結合して DNA の構造を変えることや、他のタンパクと相互作用して転写を正あるいは負に制御する事が知られている (Leger et al. Cell Biol 1995; Huth et al. Nat Struct Bio 1997; Sgarra et al. FEBS Lett 2004; Hock et al. Trends Cell Biol 2007)。

転写制御に関して、IFN- β 遺伝子の発現では、HMGA1a は DNA の構造を変化させ転写因子が

DNA に結合しやすくすると同時に promoter 領域に多数の因子の集合体である enhanceosome を形成する事によって転写を促進するメカニズムが報告されている (Yie et al. EMBO J 1999; Munshi et al. Science 2001)。同様の働きが interleukin-2 receptor- α (IL-2R α) や insulin receptor (IR) でも報告されている (Reeves et al. Mol Cell Biol 2000; Brunetti et al. FASEB J 2001)。

このように HMGA はクロマチン状態を弛緩し、転写を活性化させる分子として考えられてきた。

一方でヒトの系においては、繊維芽細胞では、HMGA が癌抑制因子である p16INK4 と協調して SAHF (senescence-associated heterochromatin foci) を形成し、細胞老化に関与することが近年報告されている (Funayama et al. J Cell Biol 2006; Narita et al. Cell 2006)。HMGA が細胞老化においては SAHF の構成因子としてヘテロクロマチン様の構造を形成するのに寄与し、遺伝子の転写を抑制する働きがあることが示唆されている。従って、細胞の種類によって HMGA が様々な働きを使い分けられていると考えられる。HMGA の発現は ES 細胞などの未分化細胞では高く、分化に伴い発現が下がることが知られている。体全体でも発生が進むにつれて発現が落ちる (Zhou et al. Nat Neurosci 1995; Chiappetta et al. Oncogene 1996)。また、特に HMGA2 の発現は癌においても高く、過剰発現によって悪性形質転換する (Berlingieri et al. Mol Cell Biol 1995)。HMGA2 のノックアウトマウスでの表現型は小型化となる (Leger et al. Cell Biol 1995; Huth et al. Nat Struct Biol 1997)。以上のことから、少なくとも HMGA2 に関しては細胞の増殖の促進に関与することが予想される。

神経系前駆細胞における HMGA の発現や働きに関して以下の報告がある。マウスの終脳で未分化な神経系前駆細胞の集まる領域である脳室帯において HMGA1、HMGA2 の発現が高い (Zhou et al. Nat Neurosci 1995; Chiappetta et al. Oncogene 1996; Nishino et al. Cell 2008; Sanosaka et al. Neuroscience 2008)。しかし、時期が経つにつれてその発現が少なくなることが in situ hybridization や mRNA 量の定量によって明らかになっている。神経系前駆細胞の分化能に対する影響に関しては、後期神経系前駆細胞に HMGA2 を過剰発現すると LIF 添加によるアストロサイト分化が抑制されるが、アストロサイトマーカーである GFAP 遺伝子のプロモーター領域のメチル化には影響しないこと、ニューロン分化には影響しないことが報告されている (Sanosaka et al. Neuroscience 2008)。しかし、HMGA2 が発生時期依存的な運命制御に関わるかは分かっていない。神経系前駆細胞の自己複製能に関しては、HMGA2 のノックアウトマウスから採取した神経系前駆細胞は、neurosphere 形成能が野生型に比べて低い事が neurosphere アッセイによって明らかにされている。このことから HMGA2 が神経系前駆細胞の自己複製能に必要であることが示唆されている (Nishino et al. Cell 2008)。この報告では、p16 や p19 の発現が HMGA2 のノックアウトで上がることが示されている。p16、p19 は神経系前駆細胞の発生が進むにつれて発現が上がる細胞周期抑制因子である。従って HMGA2 が p16 や p19 を抑えることで、胎生初期のマウスの神経系前駆細胞の自己複製を促進することが考えられる。

また当研究室の先行研究において、HMGA はニューロン分化能を失ったアストロサイト産生期の神経系前駆細胞に過剰発現することでニューロン分化能が回復したことが報告されている (Kishi, Fujii et al., Nat. Neuro. 2012)。この時 HMGA はあくまでもニューロン分化能を回復させるだけで、HMGA

の過剰発現だけでは神経系前駆細胞はニューロン分化までは強制的に起こらないことも報告されている。

ではどのようにして HMGA は神経系前駆細胞のニューロン分化能に寄与しているのでしょうか？

HMGA2 の過剰発現によって Plag1 の発現が上昇した

そのメカニズムの探索を目標とし、当研究室の先行研究によって後期神経系前駆細胞に HMGA2 を発現するレトロウイルスを感染させ、未分化条件下で 3 日間培養したものを回収し、マイクロアレイによる解析を行った。

quantile 正規化後の値を weighted average difference (WAD) 法 (Kadota et al. Algorithms Mol Biol 2008) によって解析し、コントロールと HMGA2 過剰発現の 2 サンプル間の比較を行った。この方法では、二サンプル間での平均シグナル強度に重み付けをすることで、二サンプル間で発現量が高く、かつコントロールと対照群の差が大きい遺伝子に対して高い WAD 統計量が得られる。既知の発現変動遺伝子のほとんどで平均シグナル強度が高い。従って平均シグナル強度に重み付けをする事で、再現よく結果が得られる (Kadota et al. Algorithms Mol Biol 2008)。この WAD 統計量の大きい順にアレイの網羅している全 21014 遺伝子を並べ、さらにこれらの遺伝子の中で早期神経系前駆細胞における発現が高く、発生が進むにつれて発現の下がる遺伝子を探した。当研究室では、胎生 11.5, 14.5, 16.5, 19.5 (=生後 1 日目) 日目のマウス大脳新皮質から神経系前駆細胞の存在する VZ のみを解剖によって切り出し、この領域に発現している RNA 量の変化を RNA-seq によって解析している (Fujii et al., unpublished data)。これらの解析の結果 21014 遺伝子のうち、発生時期依存的に発現の下がる遺伝子は 569 遺伝子存在した。これらの遺伝子のなかで、WAD 統計量の高いものを調べたところ、Plag1 は早期で発現が高く、発生が進むに連れてその発現が減少することが明らかになった。この結果を受けに着目して研究を進めることとした(図 4)。

この、「HMGA2 の過剰発現によって Plag1 の発現が上昇した」というマイクロアレイの結果を確認する為に、胎生 11.5 日目マウス大脳新皮質から採取した神経系前駆細胞を 9 日間培養した後期神経系前駆細胞に HMGA2 を発現するレトロウイルスを感染させ、RNA を採取し、逆転写 PCR によって Plag1 の発現を調べた。その結果、HMGA2 の過剰発現によって Plag1 の発現量がコントロールに比べて約 2 倍に増加することが再現的に観察された(図5)。

Plag1 について

Plag1 は Pleiomorphic Adenoma Gene1 という正式名称を持つ。Plag1 は N 末に蛋白結合ドメイン、C 末に 7 つの Zinc Finger ドメイン DNA 結合ドメインを持つ転写因子であり(図6)、唾液腺多形種の系で遺伝子転座によって過剰発現され癌化を引き起こしていることが知られている (Van Dyck F et al, Int J Oncol. 2007)。そのターゲット配列として GRGGC(N)⁷RGGK が報告されている (Hensen K et al,

Cancer Research 2002, 図 6)。

転写活性に関しては転写促進、抑制の両方の機能を持ち、その切替は Plag1 の修飾による転写複合体形成の変化によって行われる。Plag1 のリジン残基がアセチル化修飾された場合は、p300 と結合し、そののちに PIAS と複合体を形成して転写を促進する。逆に同じリジン残基が SUMO 化されているときは、PIAS とともに、抑制的に働くことが報告されている (Van Dyck F et al., Int J Oncol. 2007)。(図 7) 代表的なターゲット遺伝子としては Growth factor のひとつの IGF2 が同定されており、このシグナル経路によって血管新生などにおける細胞増殖時に作用していると報告されている (Van Dyck F et al., Int J Oncol. 2007)。

その他にも imprinted gene が下流として存在するという報告もあり (Declercq J et al., Int J Cancer. 2008)、臓器ごとの発現では精巣、卵巣、心臓で発現はしているが、骨格筋、舌、腎臓、肝臓、肺、腸などでは発現していないという報告もあり、その機能は多岐にわたっていると考えられる (Abdollahi A . J Cell Physiol. 2007)。

マウスの脳における胎生期での Plag1 の発現については以下の事が報告されている。Alam らの報告によれば、胎生期のマウスの脳において発生初期においては神経系前駆細胞が存在する VZ において発現は高く、発生時期が進むにつれてその発現が減少することが報告されている (Alam S et al., Dev Dyn. 2005)。

また当研究室の先行研究において、NestinD4-EGFP ノックインマウスを用いて FACS により、NestinD4 の発現強度によって細胞を分取し、それぞれのフラクションでの Plag1 の発現量を RNA-seq にて調べた。その結果、NestinD4 の発現強度が高いフラクション、すなわち未分化であるほど Plag1 の発現量が高く、NestinD4 の発現強度の低いフラクション、すなわち分化が進んだフラクションほど Plag1 の発現が低くなることを示唆する結果を得た (Kishi et al., unpublished data; 図 9)。

このように発現に関する報告はあるものの、神経系前駆細胞における Plag1 の機能についての解析はこれまで行われていなかった。

先行研究によって示唆された

- ① 神経系前駆細胞において Plag1 は HMGA の下流で発現が上昇する
- ② 神経系前駆細胞における Plag1 の発現はニューロン産生期の未分化細胞群で高い

ことから、神経系前駆細胞において HMGA の下流でニューロン分化能に何かしら寄与していると考え研究を行った。

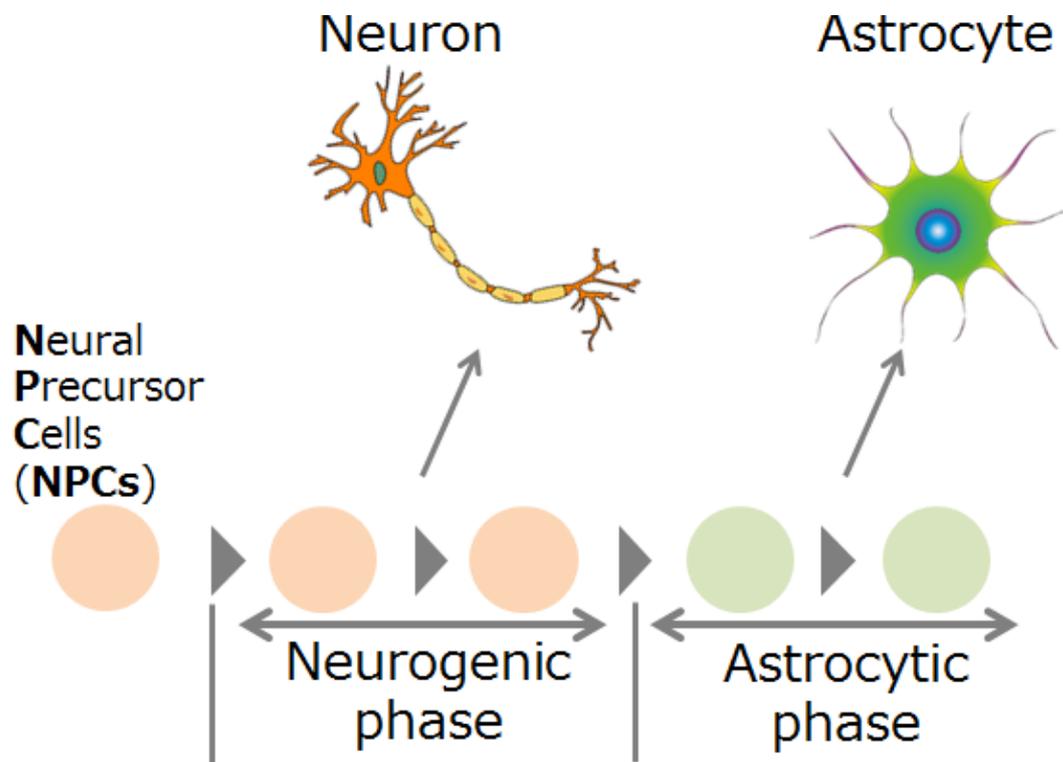


図 1. 神経系前駆細胞(NPCs)は経時的にその分化ポテンシャルが変化する。ニューロン産生期においてはニューロンが産生され、その後、アストロサイト産生期に入るとニューロンは生み出されず、アストロサイトを主に産生するようになる(Hirabayashi et al., Neurosci Res. 2005; Liqun YB et al., An overview Archives of Biochemistry and Biophysics 2014; Masakazu N et al., Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2008; Magdalena Götz & Wieland B. Huttner Nature Reviews Molecular Cell Biology 2005)。

マウス大脳新皮質神経幹細胞において Wntシグナルはニューロン分化を誘導する

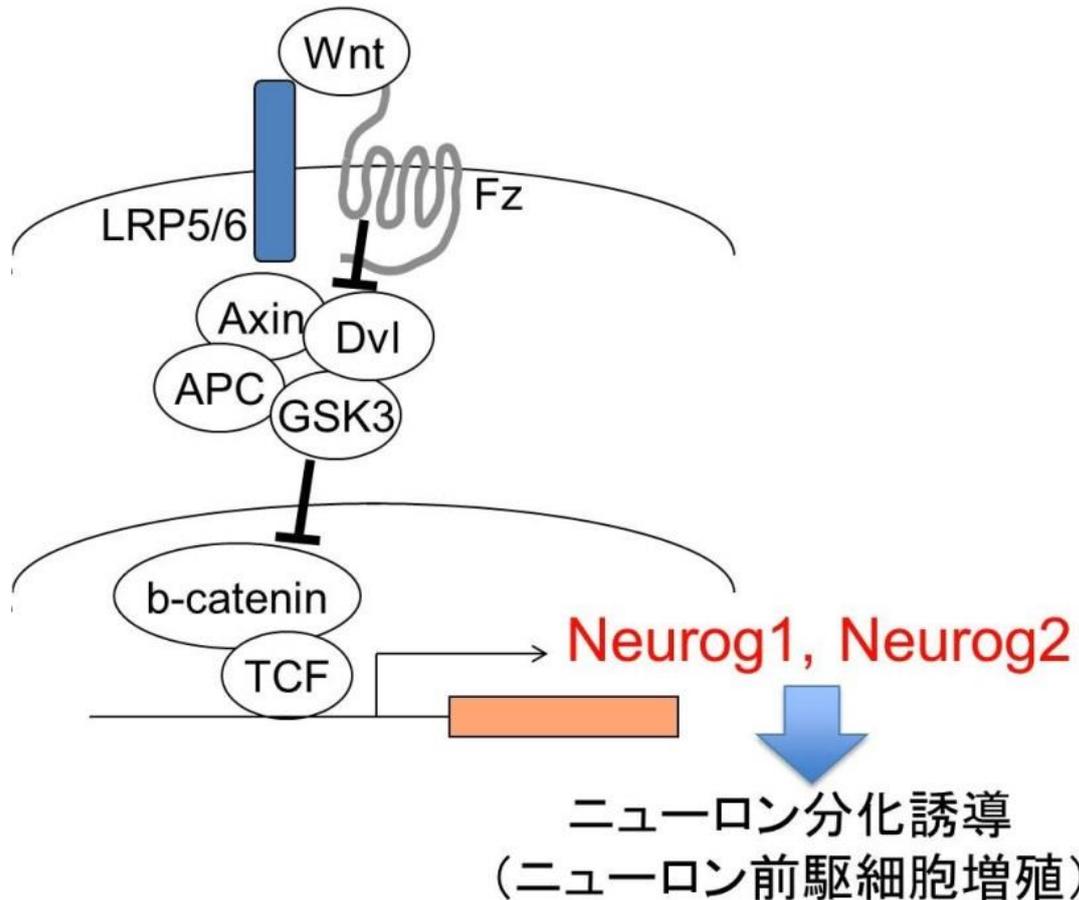


図 2. マウス胎児大脳新皮質由来神経幹細胞のニューロン分化を instructive に誘導するシグナル伝達として Wnt- β catenin 経路が重要である事を当研究室先行研究において報告した。Wnt- β catenin 経路はニューロン分化運命の決定因子である Neurog1, Neurog2 の発現を誘導し、分化を惹起する(Hirabayashi et al. Development 2004)。

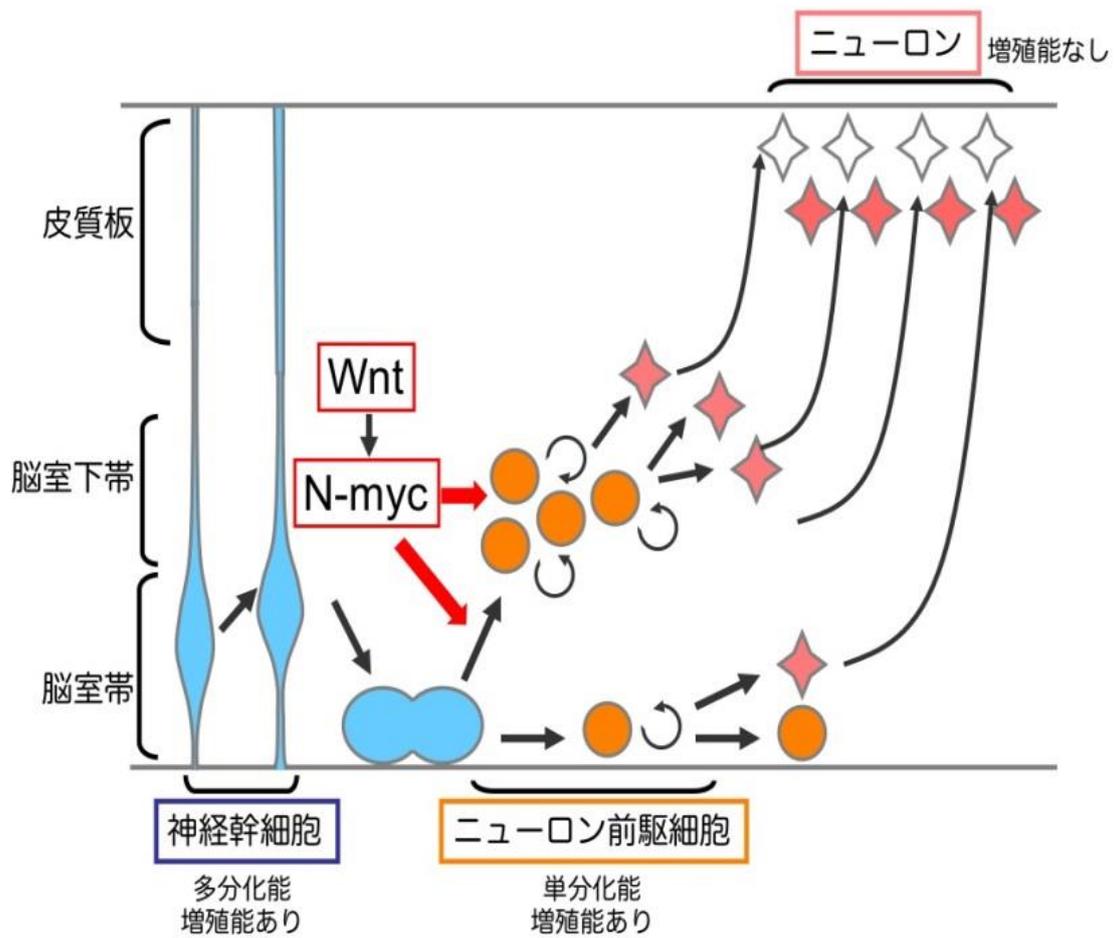


図 3. Wnt-N-Myc 経路の機能を模式的に示したもの。ニューロン前駆細胞を Wnt シグナルとその下流で発現が誘導される N-Myc がニューロン前駆細胞の数の決定に重要な役割を果たしている事を見出した(Kuwahara et al., Development 2010)。

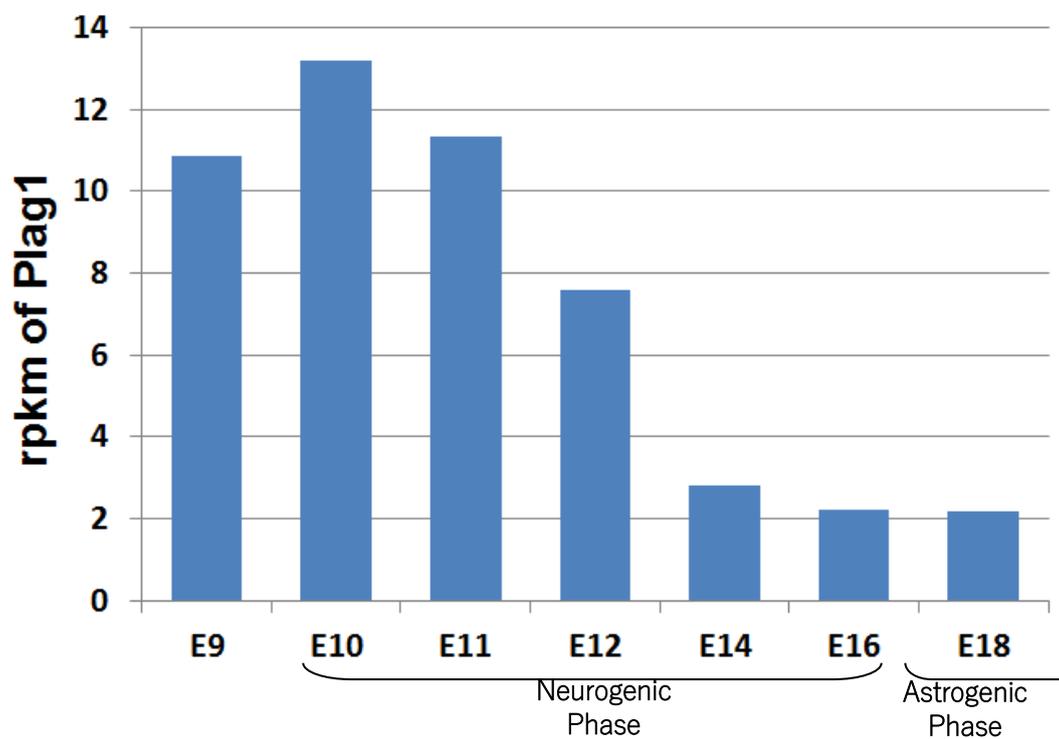


図4. Plag1 の発現量は時期依存的に減少することを示唆するデータ。先行研究において E9 から E18 の胎生期マウス脳から大脳皮質を取り出し、幹細胞マーカーである CD133 陽性細胞を FACS ソートすることで神経系前駆細胞を分取し、それぞれの時期の神経系前駆細胞における Plag1 の発現量を RNA-seq にて調べ、その発現頻度を比較した(Kishi et al., unpublished data)。

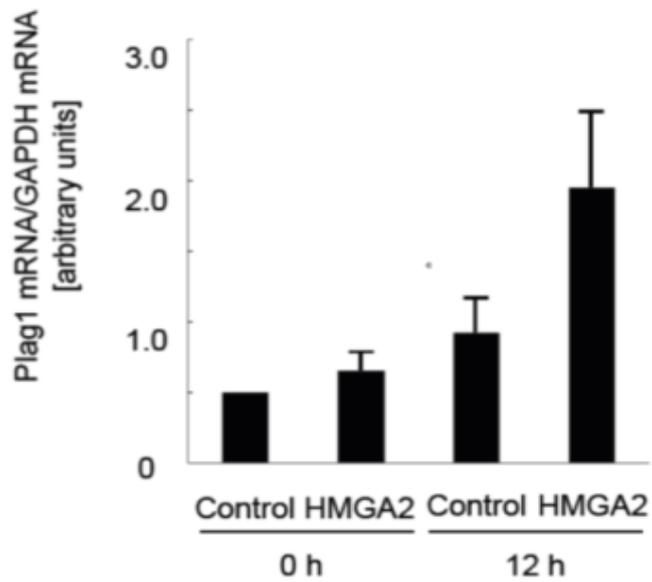
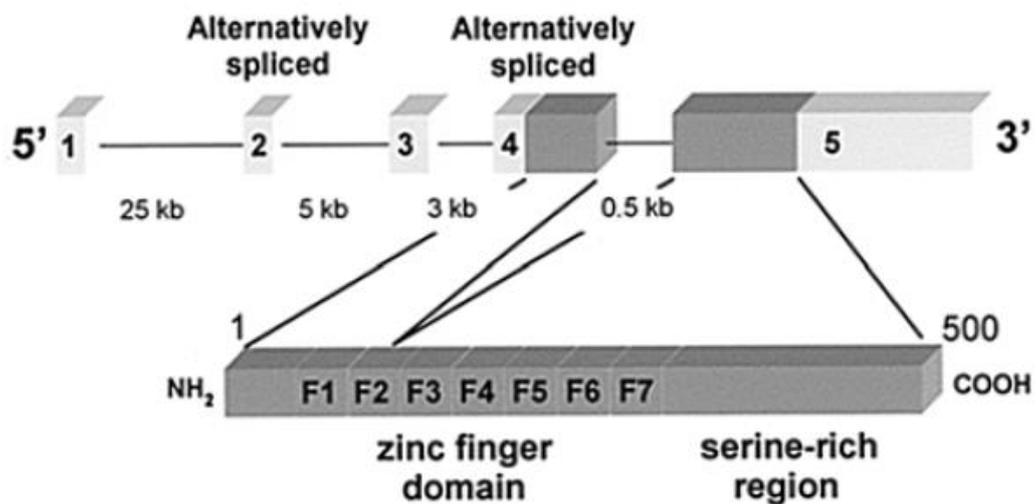


図5. 神経系前駆細胞における HMGA の過剰発現による Plag1 の発現上昇

胎生 11 日目のマウス胎児大脳新皮質よりニューロン産生期神経系前駆細胞を採取し、9日間培養後、HMGA 過剰発現レトロウイルスを感染させて、過剰発現を行った。そして過剰発現後すぐ(0h)と12時間後(12h)に回収しmRNA の量を測定した。内部標準は GAPDH を用いている(Fujii et al., unpublished data)。



Target sequence

GRGGC(N)⁷RGGK

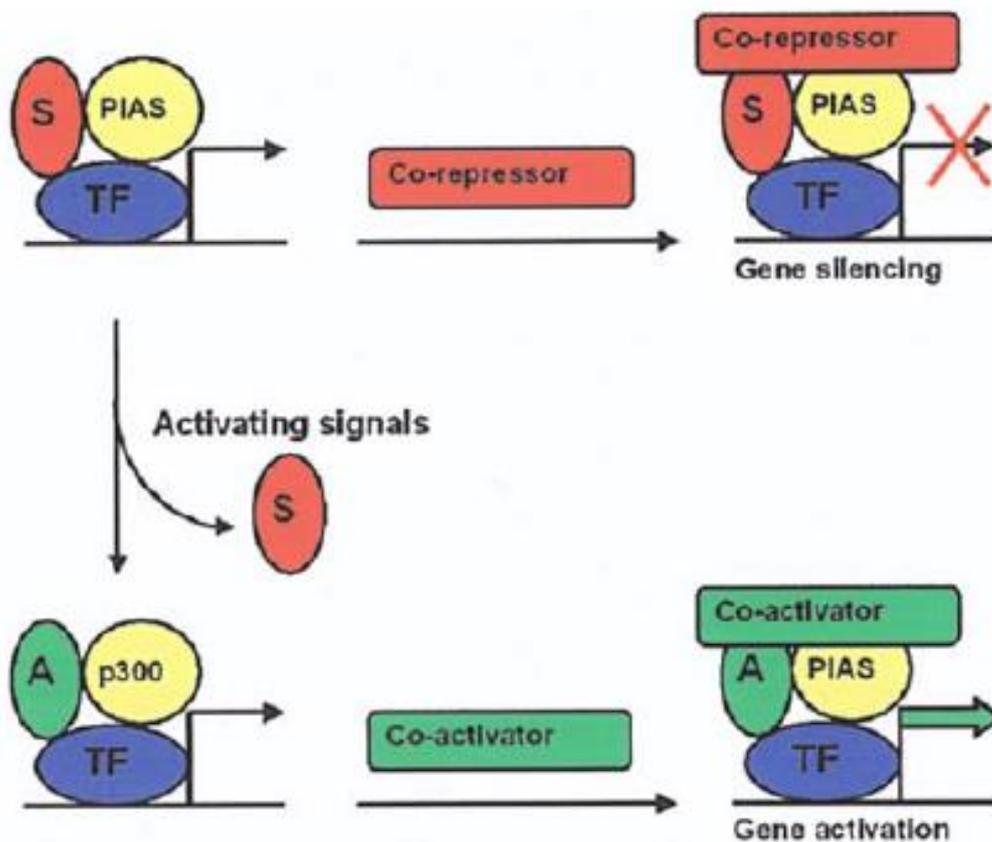
R:G,A

K:G,T

N:A,G,C,T

(Van Dyck F et al., Int J Oncol. 2007 より転載)

図 6. Plag1 の構造を模式的に示したもの。C 末に zinc finger domain を 7 つもつ (Kas K. et al., J Biol Chem. 1998; Van Dyck F et al., Int J Oncol. 2007)。また結合するコンセンサス配列も報告されている (Hensen K et al., Cancer Research 2002)。

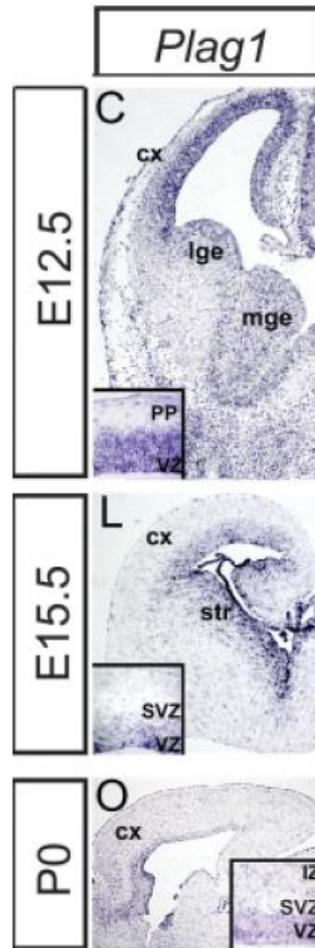


(Van Dyck F et al., Int J Oncol. 2007 より転載)

図 7. Plag1 の転写機能の切り替えのメカニズム

Plag1 に存在するリジン残基の修飾の変化により、転写因子としての機能が変化することが報告されている。リジン残基がSUMO化されている場合は他の複合体と共に転写に対して抑制的に機能する。一方、同じリジン残基がアセチル化された場合は他の複合体と共に転写を活性化する複合体を形成することが報告されている。

(Kas K. et al., J Biol Chem. 1998; Van Dyck F et al., Int J Oncol. 2007; Belew MS et al., Stem Cell Reports. 2018)



(Alam S et al., Dev Dyn. 2005 より転載)

図 8. Plag1 の発現に関する報告。In situ で染色した結果、Plag1 は神経系前駆細胞が存在する脳室体に高く発現していることが示唆されている。さらにその発現量は発生段階が進むにつれて少なくなっていくことが示唆されている(Alam S et al., Dev Dyn. 2005)。

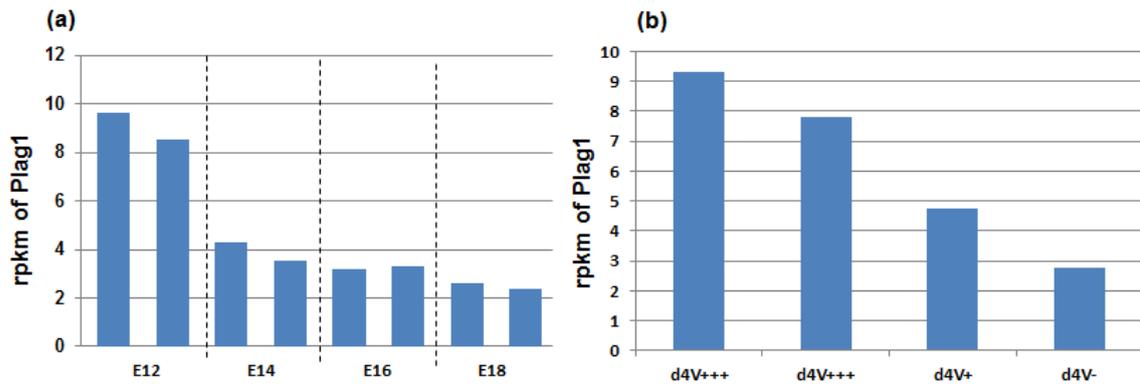


図9. 神経系前駆細胞の発生時期/分化ステージ別の Plag1 の発現比較

Plag1 の発現量を胎生期ごと、未分化割合ごとに分けて RNA-seq で調べた。

- (a) NestinD4 – EGFP ノックインマウスを用いて、E12, E14, E16, E18 それぞれの時期の神経系前駆細胞を FACS ソートによって取得し、Plag1 の発現量を RNA-seq を用いて比較した。
- (b) NestinD4 – EGFP ノックインマウスを用いて FACS により、NestinD4 の発現強度によって細胞を分取し、それぞれのフラクションでの Plag1 の発現量を RNA-seq にて調べた。

(Hirabayashi, Kishi et al., unpublished data)

材料と方法

発現ベクターの作成

Plag1 過剰発現ベクター

1, インサートの作成

Plag1 の遺伝子配列の両端にプライマーを設計した。プライマーの両末端には、外ベクターに挿入することを考えて、制限酵素サイトを付加した (Plag1; BamH1, XhoI)。プライマーの配列は以下のとおりである。大文字の部分が各遺伝子配列、小文字の部分が付加した制限酵素配列を示す。

Plag1Fw: 5'-GGATCCATGGCCACTGTCATT-3'

Plag1Rev: 5'-CTACTGAAACGCCTGCTCGAG-3'

初代培養系の cDNA ライブラリーを鋳型として用い、PCR によって増幅した。

PCR 酵素は KOD FX (TOYOBO) を用いた。以下に PCR の反応条件を記す。

1 94°C 120 sec

2 94°C 15 sec

3 66°C 30 sec

4 68°C 110 sec

*2 ~ 4 を 10 サイクル

5 94°C 15 sec

6 66°C 30 sec

7 68°C 110 sec

*5 ~ 7 を 10 サイクル

8 94°C 15 sec

9 66°C 30 sec

10 68°C 110 sec

*8 ~ 10 を 15 サイクル

11 4°C ∞

得られた PCR 産物の一部に対して 1%のアガロースゲル電気泳動を行い、目的の分子量の PCR 産物が増幅されているのを確認した。目的産物のバンドを切り出し、Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製した。精製された PCR 産物を Stu I 処理した pCR-Blant ベクターと混合し、Ligation High (TOYOBO) を用いて 37°Cで一晩ライゲーション反応を行った。ライゲーション産物は、大腸菌に形質転換し、抗生物質としてカナマイシンと IPTG(Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)を含む LB 寒天培地に播いた。

一晩 37°Cで培養し、生えてきたコロニーをつついて液体培地 (2 x LB, 抗生物質としてカナマイシ

ンを含む) 1 ml での少量培養を行った。37°Cで一晩振盪培養したあとに、Miniprep を行い、プラスミドの精製を行った。得られたプラスミドのシーケンスを読み、目的の配列が挿入されていることを確認した。そして、各インサート作成用のプライマーに付加した制限酵素サイトに対応した制限酵素で 37°C、1 時間処理した。制限酵素処理産物を 1%アガロースゲルで電気泳動することにより、目的産物のバンドを切り出し、Gel Extraction Kit (QIAGEN 社)を用いて精製し、インサートを得た。

2, ベクター (外枠) の調整

外枠となるベクター (pCAG2IG)を、各インサート作成用のプライマーに付加した制限酵素サイトに対応した制限酵素で 37°C、1 時間処理した。制限酵素処理産物を 1%アガロースゲルで電気泳動することにより、目的産物のバンドを切り出し、Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) を用いて精製した。

3, ライゲーション

作成したインサートと外枠を混合し、Ligation High (TOYOBO) を用いて一晩ライゲーション反応を行った。

4, 形質転換、少量培養、インサートの確認

ライゲーション産物を大腸菌にトランスフォーメーションし、抗生物質としてアンピシリンを含む LB 寒天培地にストリークした。一晩 37°Cで培養し生えてきたコロニーをつついて液体培地 (2×LB,抗生物質としてアンピシリンを含む)1 ml での少量培養を行った。37°Cで一晩振盪培養した後に Miniprep を行い、プラスミドを精製した。得られたプラスミドを、各インサート作成用のプライマーに付加した制限酵素サイトに対応した制限酵素で 37°C、1 時間処理した。制限酵素処理産物を 1%アガロースゲルで電気泳動することにより、外枠にインサートが挿入されていることを確認した。

RNA 干渉法

Plag1 に対する shRNA を設計し、pSiren ベクターに組み込んだ。ターゲット配列は以下の通りである。

Plag1 shRNA #1, 5' -GGAGCAGAAGAATCCAGATTC-3'

Plag1 shRNA #2, 5' -GCTAACCTCAGTGCACCTTGG-3'

全てのノックダウン実験では異なる 2 つのノックダウンベクターを用い、同様の結果が得られている。また、ノックダウンのコントロールとして、以下のターゲット配列に対する

shRNA を用いた。ターゲット配列は以下の通りである。

Luc shRNA (control shRNA #2) 5' - GTGCGTTGCTAGTACCCAC- 3'

Plag1 shRNA 発現ベクターの作成

pSiren-shPlag1 #1, #2 は以下のように作成した

1, インサートの作成

まず、相補鎖を組むような一対のオリゴヌクレオチドを設計した。出来上がる二本鎖の末端に、EcoRI と BamHI サイトが含まれるようにした。設計したオリゴヌクレオチドの合成は Operon に外注した。それぞれ 100 pmol のオリゴヌクレオチド一組と、25 mM MgCl₂ を 3 μ l, H₂O 45 μ l を混ぜ、95°C で 5 分間反応させたのち、徐々に室温まで下げた。

作成したオリゴヌクレオチドの配列は以下の通りである。

Plag1 shRNA #1 Fw:

5'-GATCCGGAAAGATCATCTGAGGAATCCGAAGATTCTTCAGATGGTCTTTCCTTTTTTG-3'

Plag1 shRNA #1 Re:

5'-AATTCAAAAAAGGAAAGACCATCTGAAGAATCTTCGGATTCCTCAGATGATCTTTCCG-3'

Plag1 shRNA #2 Fw:

5'-GATCCGCAAATACTGTGGGTCTGAGTCGAAACTTAGACCCACAGTGTGCTTTTTG-3'

Plag1 shRNA #2 Re:

5'-AATTCAAAAAAGCAAACACTGTGGGTCTAAGTTTCGACTCAGACCCACAGTATTTGCG-3'

2 外枠の作成

pSiren ベクターを EcoRI と BamHI 処理したものをを用いた。精製法は前述の通りである。

3 ライゲーション、形質転換、インサート確認

前述の通りに行った。

抗体

本研究で用いた抗体と希釈倍率を以下に示す。

<1 次抗体>

anti-chicken GFP 1:2000, (Chemicon, ab13970)

anti-mouse TuJ1 1:1000, (Covance, MMS-435P)

anti-rabbit GFAP 1:1000, (Dako, Z0334)

anti-rabbit Tbr2 1:1000, (Abcam, ab23345)

anti-rabbit Sox2 1:1000, (CST, #3728)

anti-rabbit Pax6 1:1000, (Milipore)

レトロウイルスの作成

retrovirus の作成には、PLAT-gp (Kitamura et al.2003; Ohkawa et al. 2012) 細胞を用い、報告の通りに行った。PLAT-gp 細胞は北村俊雄博士から供与頂いた。

PLAT-GP 細胞の培養には、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco) に、10% FBS、blasticidin S (8 μ g/ml, 和光純薬) を添加した培地を用い、37°Cインキュベータ内で培養した。

まず、pMX あるいは pMXs, pSiren のプラスミドを、PEI(polyethilenimine)を用いて PLAT-gp 細胞に遺伝子導入した。翌日、DMEM に10% FBS を加えた培地に交換し、37°Cで2~3 日間培養した。そして、その培養上清を 45 nm フィルターでフィルトレーションし、4°C、2 時間、20,000 x g で超遠心し濃縮した後、DMEM-F12 (1:1)(Gibco) で再懸濁した。作成した retro virus は、-80°Cにて凍結保存した。

マウス神経系前駆細胞の *in vitro* 初代培養系

マウス神経系前駆細胞の *in vitro* 初代培養は以前の報告の通りに行った(Hirabayashi et al. 2004)。胎生 11.5 日目の ICR マウスより、表皮、頭蓋、嗅球、大脳基底核原基、海馬を取り除き、大脳新皮質を単離した。得られた大脳新皮質を、神経細胞用分散液(住友ベークライト MB-X9501)細胞を分散した。得られた細胞を、DMEM-F12 (1:1, v/v) に 1%penicillin-streptomycin、2% B27 supplement (Invitrogen) 、20 ng/ml FGF2(Fibroblast Growth Factor 2, R&D)、20 ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor, Upstate)を添加した培地を用い、 3×10^5 cells/ml の細胞密度で、37°Cにて3 日間浮遊培養し、neurosphere を形成させて、神経系前駆細胞以外の細胞を除いた。

その後細胞を、0.1% trypsin、DNase I (0.1 mg/ml, Roche)を含む aCSF 中で37°C、10 分間温浴し、その後 trypsin inhibitor (0.7 mg/ml, Sigma)を含む aCSF を等量加え、ばらばらにした。その後は、実験によって異なる培養方法をとった。浮遊培養を続ける場合は上と同様の培地を用い、3 日間浮遊培養をしてから細胞をばらばらにする操作を繰り返した。単層培養をする場合は poly-D-lysine でコートされた培養皿で、DMEM-F12 に 1% penicillin-streptomycin、2% B27 supplement、20 ng/ml FGF2 を添加した培地を用いて培養した。

レトロウイルスによる感染では、培地中にレトロウイルスを混ぜて24 時間培養し、その後培地を用いて洗浄し、さらに培地を加えて培養した。

細胞免疫染色

細胞免疫染色は、以前の報告の通りに行った (Hirabayashi et al. 2004)。まず細胞を 2% formaldehyde (Nakarai)/PBS、室温、20 分間で固定し、0.2% TritonX-100/PBS、室温、10 分間で処理した。その後、3% Bovine serum albumine(BSA)/PBS でブロッキングを行った後、3% BSA/PBS 中で 1 次抗体反応を 4°C で一晩行った。PBS で洗浄後、同様の溶液中で 2 次抗体反応と Hoechst での染色を室温で 30 分行い、Mowiol を用いてマウントした。

組織免疫染色

組織免疫染色は以前に報告された通りに行った (Hirabayashi et al. 2004)。ICR マウス胎仔を、4% paraformaldehyde (PFA)/PBS を用いて灌流固定をした後、終脳を取り出した。これらのサンプルを、4% PFA/PBS を用い 4°C で 2 時間固定した。固定したサンプルを、PBS で洗浄後、4°C で 10% sucrose/PBS 中に浸した。サンプルが沈んだところで、さらに 20% sucrose/PBS に溶液を置換した。同様にして、30% sucrose/PBS 溶液に置換して一晩放置した。このサンプルを OCT compound (Miles Scientific) 中に包埋し -80°C で冷凍した。冷凍したサンプルから厚さ 12 μm の組織切片を作成した。作成した切片を数時間風乾し、0.1% Triton X-100、TBS (TBS/T) 中に 20 分間浸し、OCT compound を除いた。さらに、3% BSA を含む TBS/T で、ブロッキングを 4°C で数時間行った後、1 次抗体を加えた 3% BSA を含む TBS/T と 4°C で一晩反応させた。TBS で 2 回洗浄した後、2 次抗体と Hoechst 33342 を加えた 3% BSA を含む TBS/T と室温で 1-2 時間反応させた。TBS/T で 3 回洗浄した後、Mowiol を用いてマウントした。

クローナルアッセイ

クローナルアッセイは以前の報告に従って行った (Hirabayashi et al. 2004)。遺伝子導入した細胞を培養後、その細胞塊を完全にばらばらにし、非常に薄い密度で何も遺伝子導入していない細胞の中に (3×10^5 cells/mL: 混ぜる割合を 1:1/1:10/1:100 で混ぜる) まいた。その後、+FGF で 2 日間、-FGF で 3 日間培養し、固定、染色した。

逆転写 (Reverse transcription; RT)-PCR

RNA は RNAiso (TAKARA) を用いて、説明書通りに精製した。逆転写は、5 μg の RNA と oligo

d(T)12-18 プライマー、ReverTra Ace (TOYOBO) を用いて行った。

得られた cDNA は、SYBR Premix Ex Taq (Takara)もしくは SYBR Green I Master (Roche) を用い、Roche LightCycler で定量 PCR によって定量した。目的遺伝子の mRNA 量は、全て GAPDH の mRNA 量で標準化した。センス、アンチセンスプライマーは以下の通りである。

GAPDH

5'-CTGAACGGGAAGCTCAC-3'

5'-GTCATCATACTTGGCAGGT-3'

Plag1

5'-TGCCGGTCATGTCCTTAC-3'

5'-ATGGACTGAAATGGAGTGTTATAGA-3'

In utero electroporation(子宮内電気穿孔法)

マウス胎児の神経上皮細胞へのプラスミド DNA の導入は、以前に報告された通りに行った (Hirabayashi et al. 2004; Konno et al. 2008)。妊娠マウスにペントバルビタール酸ナトリウムを用いて麻酔をかけたのち、そのマウスを腹中線にそって、開腹した。次に子宮を丁寧に取り出し子宮壁の外からキャピラリーを用いて、プラスミド溶液をマウス胎児の側脳室へ注入した。プラスミド溶液は、各実験に応じて以下の通りに調製した。

・過剰発現実験

GFP を発現する pCAG2IG のコントロールベクターもしくは Plag1 過剰発現ベクター、を $3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるように調整し、Fastgreen で色をつけた。

・ノックダウン実験

GFP を発現する pCAG2IG $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ をマーカーとして用い、pSiren-shLuc をコントロールベクター、pSiren-shPlag1 を $3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるように調整し、Fastgreen にて色をつけた。

電極を、プラスミドを導入したマウスの脳にそってあて、エレクトロポレーター (CUIY21E, Tokiwa Science) を用いて、胎生期 14.5 日目マウス胎児を用いる際は 35 V, 50 ms の電気を 4 回流した、胎生期 11.5 日目のマウス胎児を用いる際は 30 V, 30 ms の電気を 4 回流した。

その後、母体の中に子宮を戻し、腹を縫合し発生をさらに進行させた。その後、母体から胎仔を取り出し組織免疫染色を行った。

マウス

野生型の ICR マウスは日本クレア、チャールズリバーより購入した。

統計処理

定量データのエラーバーは標準偏差、あるいは標準誤差である。それぞれの実験は、3 回以上行い、その代表的なデータが載せてある。値の比較は、Student t 検定で比較した。全ての Figure について *P < 0.05, **P < 0.01 を示す。

各試薬の組成

- PBS
Na₂HPO₄ (12 水和物)・・・ 10mM
KH₂PO₄ …… 1.7mM
NaCl …… 140mM
KCl …… 3mM
Distilled water …… 1000 mly
NaOH を加え pH7.3 に調製
- 細胞染色用 TBS
Tris-Cl・・・100mM
NaCl・・・150mM
Distilled Water・・・1000mL
1M 塩酸を加え、pH7.5 に調製
- 組織染色用 TBS
Tris-Cl・・・100mM
NaCl・・・140mM
Distilled Water・・・1000mL
1M 塩酸を加え、pH7.5 に調製
- 組織染色用 TBS-T
Tris-Cl ……100mM
NaCl …… 140mM
Tx-100 …… 0.1%
Distilled water …… 1000 ml
1M 塩酸を加え、pH7.5 に調製

実験結果

当研究室の先行研究によって、HMGA の下流で神経系前駆細胞において発現が上昇する遺伝子として Plag family proteins のひとつである Pleiomorphic Adenoma Gene1(Plag1)が同定された。神経系前駆細胞で HMGA2 を過剰発現すると Plag1 の発現は大きく上昇した。また、Plag1 の発現について調べたところ、ニューロン産生期の神経系前駆細胞で発現が高く、ニューロン分化していくにしたがって低下すること、また発生後期のアストロサイト産生期神経系前駆細胞では発現が低いこと、すなわち Plag1 の発現量と神経系前駆細胞のニューロン分化能が相関していることが示唆されていた(図4/図5/図9)。しかし、神経系前駆細胞のニューロン分化制御に関する Plag1 の機能はこれまでほとんどわかっていなかった。

そこで私は Plag1 が HMGA の下流で神経系前駆細胞からのニューロン分化過程になんらかの機能を担っている可能性を考え「HMGA はその下流で Plag1 の発現調整をすることを介して神経系前駆細胞のニューロン分化能に寄与している」という仮説をたてた。その検証のため、まずはこれまで機能未知であった Plag1 が神経系前駆細胞のニューロン分化に関与しているかどうかの検証を行った。

まず、*in vitro*再構成系を用いて検証を行い、次に *in vivo*においても検証をおこなった。

【結果】

1. *in vitro* 神経系前駆細胞のニューロン分化における Plag1 の機能

Plag1 の神経系前駆細胞のニューロン分化における機能を知るために、*in vitro* の実験系において Plag1 を過剰発現およびノックダウンを行い、神経系前駆細胞のニューロン分化への影響を調べた。

1-1. *in vitro* の実験系における Plag1 の過剰発現が神経系前駆細胞のニューロン分化へ与える影響

マウス大脳新皮質の神経発生は*in vitro*初代培養系を用いて模倣することが出来るのがこれまでの研究から明らかになっている。(Hirabayashi et al. 2004, 図1) 本研究においては胎生11.5 日目のマウス大脳新皮質から神経系前駆細胞を採取して3日間浮遊培養し、神経系前駆細胞を自己複製させてneurosphere を形成することでニューロン産生期の神経系前駆細胞、同様に9 日間浮遊培養することでアストロサイト産生期に対応する神経系前駆細胞を得ることができる (Qian et al. Neuron 2000; Shen et al. Nat Neurosci. 2006)。

以降、本論文では3日間培養したニューロン産生期の神経系前駆細胞をニューロン産生期神経系前駆細胞、9日間培養したアストロサイト産生期の神経系前駆細胞をアストロサイト産生期神経系前駆細胞と呼ぶ。

神経系前駆細胞のニューロン分化への影響を調べるため、ニューロン分化能を有しているニ

ニューロン産生期神経系前駆細胞にPlag1を過剰発現し、ニューロン分化への影響を調べた。胎生11日目のマウス胎児大脳新皮質よりニューロン産生期神経系前駆細胞を採取し、3日間培養後、*in vitro*でニューロン産生期神経系前駆細胞を採取した。次にPlag1過剰発現レトロウイルスを感染させて、過剰発現を行った後、未分化条件下で3日間培養した。そして固定したのち、ニューロンマーカーとしてTuj1を用いて細胞染色を行った。

その結果、Plag1を過剰発現した場合、コントロールと比較してGFP陽性細胞のうちTuj1陽性細胞の割合が高くなる結果を得た。このことから、未分化条件であってもニューロン産生期神経系前駆細胞ではPlag1過剰発現によってはニューロン分化を促進される可能性が示唆された(図11)。

先行研究においては、HMGAはニューロン分化能を失った発生後期の神経系前駆細胞において過剰発現するとそのニューロン分化能を回復させることができることが示されている。HMGAの下流で発現が上昇するPlag1にも同様の機能があるかを調べるために、アストロサイト産生期神経系前駆細胞におけるPlag1過剰発現のニューロン分化への影響を調べた。胎生11日目のマウス大脳新皮質より神経系前駆細胞を採取し、9日間培養してアストロサイト産生期神経系前駆細胞を採取し、Plag1過剰発現レトロウイルスを感染させて過剰発現を行った。そしてその後、未分化、あるいは分化条件下で3日間培養した。その結果、未分化条件下であったにもかかわらず、Plag1を過剰発現した場合コントロールと比較してGFP陽性細胞のうちTuj1陽性細胞の割合が高くなり、また分化条件下においても同様の結果を得た(図12)。さらに分化条件下ではPlag1を過剰発現した場合コントロールと比較してGFP陽性細胞のうちGFAP陽性細胞の割合が低くなる結果を得た(図13)。

これらの*in vitro*系の結果から、Plag1の過剰発現は神経系前駆細胞の時期を問わずニューロン分化を誘導する可能性が考えられる。

これまでのPlag1過剰発現の実験からPlag1過剰発現によりニューロン分化する細胞の数が上昇することがわかったが、上記の実験では神経系前駆細胞のニューロン分化能が上昇した可能性以外に、分化後のニューロン前駆細胞の増殖が亢進した、あるいは分化後ニューロンの生存が亢進した可能性も考えられる。そこで、それらの可能性を区別するために神経系前駆細胞個々の分化ポテンシャルを調べることを目的とし、クローナルアッセイを行った。その結果、クローンに含まれるGFP陽性細胞の数に有意差はなく、Plag1の過剰発現は神経系前駆細胞の増殖にはほとんど影響を与えていないことがわかった(図14)。このとき、Plag1を過剰発現した場合コントロールと比較するとニューロンマーカー陽性細胞のみで形成されたクローンの割合が有意に多くなる結果を得た。一方、アストロサイト分化能については、Plag1過剰発現した場合コントロールと比較してアストロサイトマーカーであるGFAP陽性細胞を含むクローンの割合が有意に低くなる結果を得た(図14)。

これらの結果からPlag1過剰発現は、ニューロン分化能を失い、本来はアストロサイトを産生する後期神経系前駆細胞のニューロン分化を促進する可能性が示唆された。

1-2. *in vitro*の実験系における Plag1 のノックダウンが与える神経系前駆細胞のニューロン分化への影響

前項では Plag1 を過剰発現させ、神経系前駆細胞のニューロン分化への影響を調べたが、次に神経系前駆細胞のニューロン分化における Plag1 の必要性の検証を行うことを目的とし、Plag1 ノックダウンレトロウイルスを用いて *in vitro* で Plag1 のノックダウンを行い、神経系前駆細胞のニューロン分化へ影響を調べた。胎生 11 日目のマウス胎児大脳新皮質よりニューロン分化能をもつ神経系前駆細胞を採取し、Plag1 のノックダウンレトロウイルスを感染させてノックダウンを行い、未分化条件で一晩培養後、分化条件下で 2 日間培養した。その結果、Plag1 をノックダウンした場合、コントロールと比較して GFP 陽性細胞のうち Tuj1 陽性細胞の割合が低くなる結果を得た(図 15)。

このことから Plag1 は神経系前駆細胞のニューロン分化に必要である可能性が考えられる。

2. *in vivo* 神経系前駆細胞のニューロン分化における Plag1 の機能

ここまでは *in vitro* の系を用いて、Plag1 の神経系前駆細胞における機能について検証を行ったが、*in vivo* における Plag1 の発現が及ぼす神経系前駆細胞のニューロン分化への影響を調べることを目的とし、*in vivo* での実験を行った。*in vivo* で実験においては、マウス大脳皮質脳室帯に存在する神経系前駆細胞への遺伝子導入を行うために子宮内電気穿孔法(図 16)を用いた。

2-1 *in vivo* 実験系における Plag1 の過剰発現が神経系前駆細胞のニューロン分化へ与える影響

過剰発現による影響を見るため、神経系前駆細胞における Plag1 の発現が低下することが分かっている胎生 14 日目のマウス大脳皮質に Plag1 過剰発現ベクターを子宮内エレクトロポレーションによって導入し、胎生 16.5 日目で固定して解析した。その結果、GFP 陽性細胞のうち神経系前駆細胞が存在する脳室帯(ventricular zone, VZ)に存在する細胞の割合が Plag1 を過剰発現した場合コントロールと比較して低下した(図 17a)。また各マーカーを用いて組織染色したところ、Plag1 の過剰発現により未分化細胞マーカー Pax6 陽性細胞の割合はコントロールに比べて減少し、ニューロン分化細胞マーカー Tbr2 陽性細胞の割合はコントロールと比較して増加した(図 17b)。

このことから Plag1 の過剰発現は神経系前駆細胞のニューロン分化を *in vivo* においても促進する可能性が示唆された。

2-2 *in vivo* 実験系における Plag1 のノックダウンが神経系前駆細胞のニューロン分化へ与える影響

in vitro の系を用いた検証では、Plag1 のニューロン分化における必要性が示唆されたが、*in vivo* でも必要性の検証を行った。神経系前駆細胞における Plag1 の発現が高い胎生 11 日目のマウス大脳皮質に Plag1 ノックダウンベクターを子宮内エレクトロポレーションによって導入し、36 時間後に固定し、各分化マーカーで組織染色を行い、細胞の分布、そしてコントロールと比較して Plag1 ノックダウンした際のニューロン分化への影響を調べた。その結果、GFP 陽性細胞のうち VZ に存在する細胞の割合が、コントロールと比較して Plag1 ノックダウン群では高くなり、また GFP 陽性細胞のうち幹細胞マーカーである Sox2 陽性細胞の割合は Plag1 ノックダウンによりコントロールと比べ増加した(図 18)。一方、GFP 陽性細胞のうち、ニューロン分化マーカーである Tbr2 陽性細胞の割合は低下した(図 19)。このことから、Plag1 のノックダウンは神経系前駆細胞のニューロン分化を *in vivo* においても抑制する可能性が示唆された。

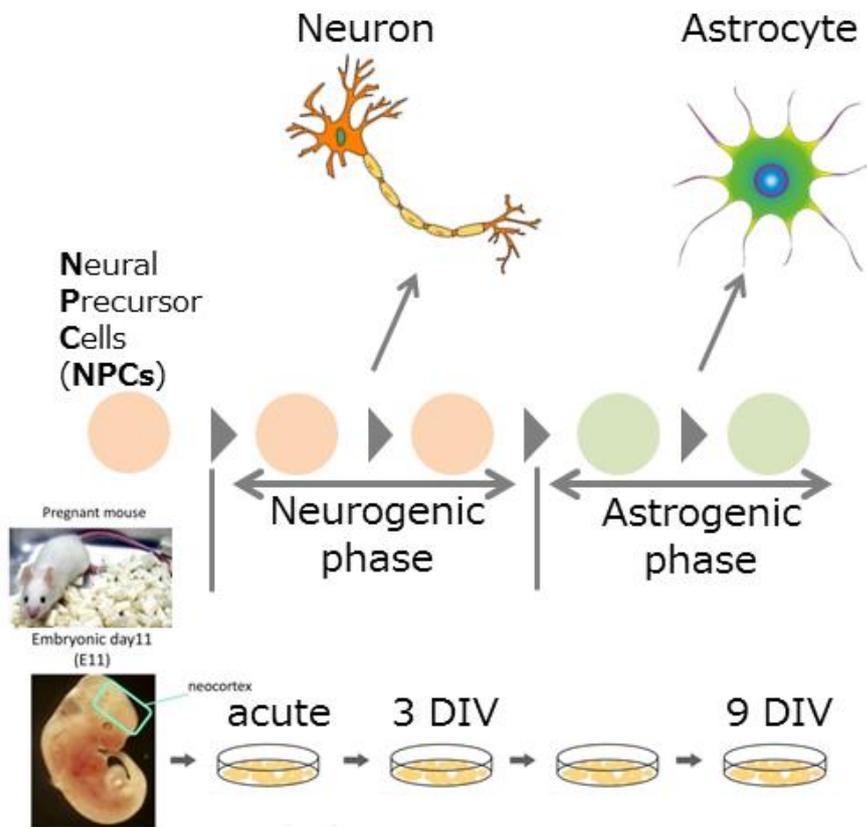
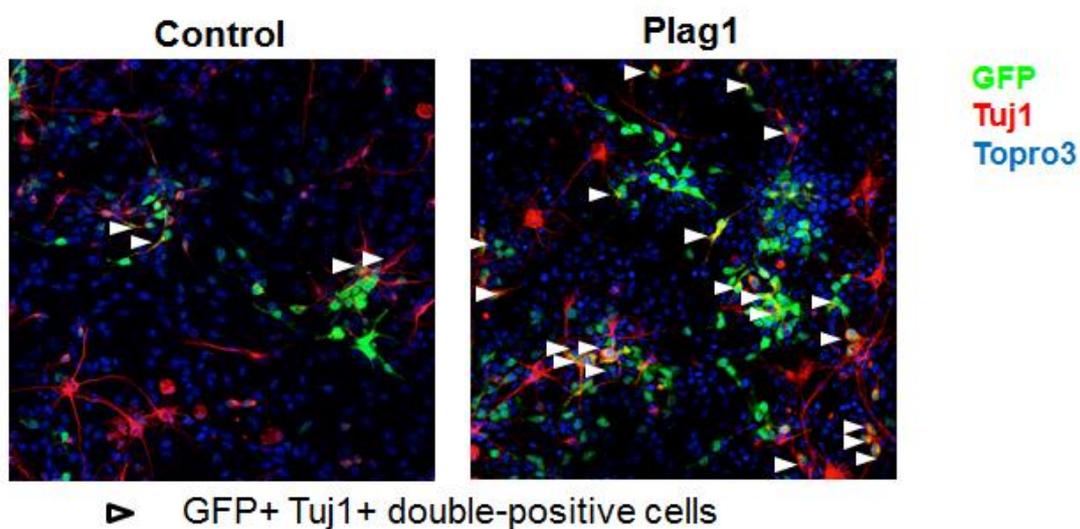


図10. *in vitro*培養系を模式的に示した図

E11マウス胎児大脳新皮質から神経系前駆細胞を取り出し、取り出してすぐ、またはそれらを3日間培養したものをニューロン産生期神経系前駆細胞、9日間培養したものをアストロサイト産生期神経系前駆細胞として実験に用いた。

(a)



(b)

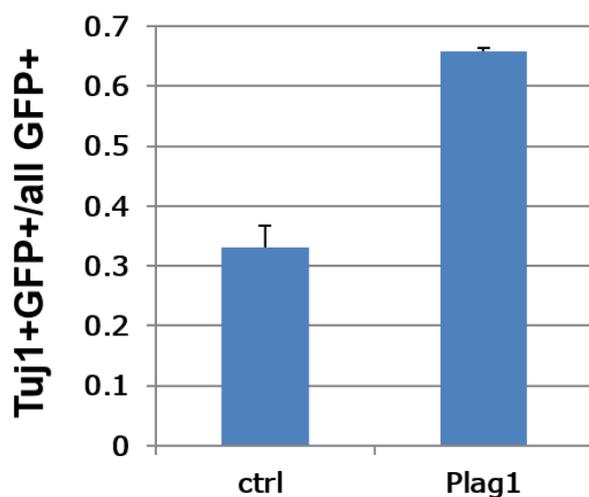
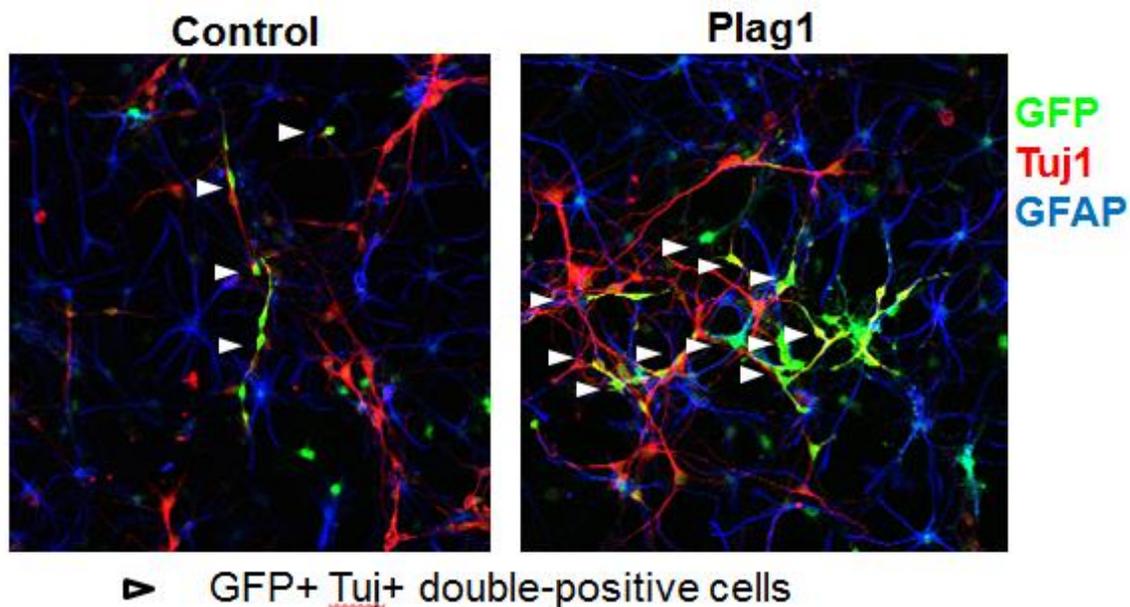


図 11. *in vitro* の実験系における Plag1 の過剰発現がニューロン産生期神経系前駆細胞のニューロン分化へ与える影響

(a)胎生 11 日目のマウス胎児大脳新皮質よりニューロン産生期神経系前駆細胞を採取し、3 日間培養後、Plag1 過剰発現レトロウイルスを感染させて、過剰発現を行った。そしてその後、分化条件で 3 日間培養した。その後それぞれを GFP、およびニューロンマーカー Tuj1 で染色した

(b) 胎生 11 日目のマウス胎児大脳新皮質よりニューロン産生期神経系前駆細胞を採取し、3 日間培養後、Plag1 過剰発現レトロウイルスを感染させて、過剰発現を行った。そしてその後、未分化条件で 3 日間培養した。その後それぞれを GFP、およびニューロンマーカー Tuj1 で染色し、カウントを行った。エラーバーは SD を意味する。N>3 *; p value<0.05 t-test

(a)



(b)

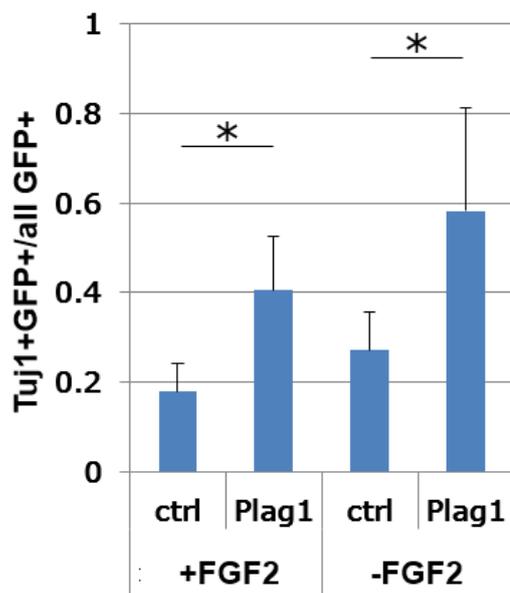
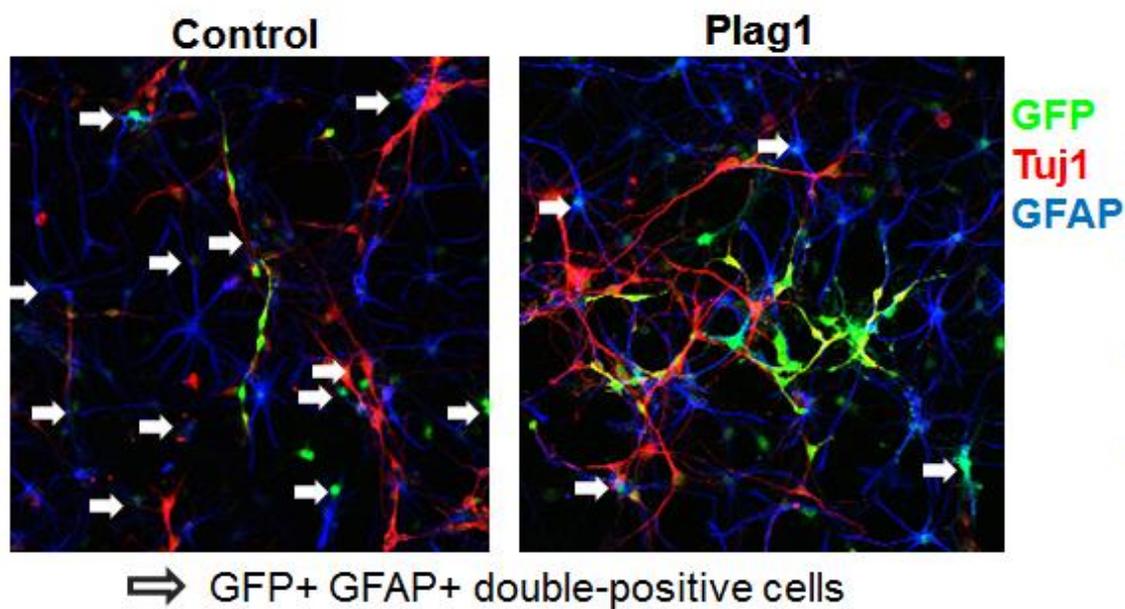


図 12. *in vitro* の実験系における Plag1 の過剰発現がアストロサイト産生期産生期神経系前駆細胞のニューロン分化へ与える影響

(a) 胎生 11 日目のマウス胎児大脳新皮質よりニューロン産生期神経系前駆細胞を採取し、9 日間培養後、Plag1 過剰発現レトロウイルスを感染させて、過剰発現を行った。そしてその後、分化条件で 3 日間培養した。その後それぞれを GFP、およびニューロンマーカー Tuj1 で染色した

(b) 染色後、Tuj1 と GFP 共陽性の細胞の割合を調べるためにカウントを行った。エラーバーは SD を意味する。N>3 *; p value<0.05 t-test

(a)



(b)

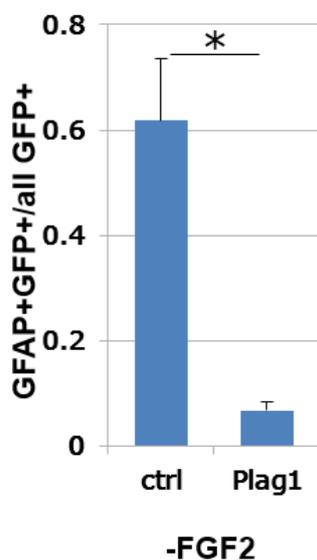


図 13. *in vitro* の実験系における Plag1 の過剰発現がアストロサイト産生期産生期神経系前駆細胞のアストロサイト分化へ与える影響

(a) 胎生 11 日目のマウス胎児大脳新皮質よりニューロン産生期神経系前駆細胞を採取し、9 日間培養後、Plag1 過剰発現レトロウイルスを感染させて、過剰発現を行った。そしてその後、分化条件で 3 日間培養した。その後それぞれを GFP、およびアストロサイトマーカー GFAP で染色した

(b) 染色後、Tuj1 と GFAP 共陽性の細胞の割合を調べるためにカウントを行った。エラーバーは SD を意味する。N>3 *; p value<0.05 t-test

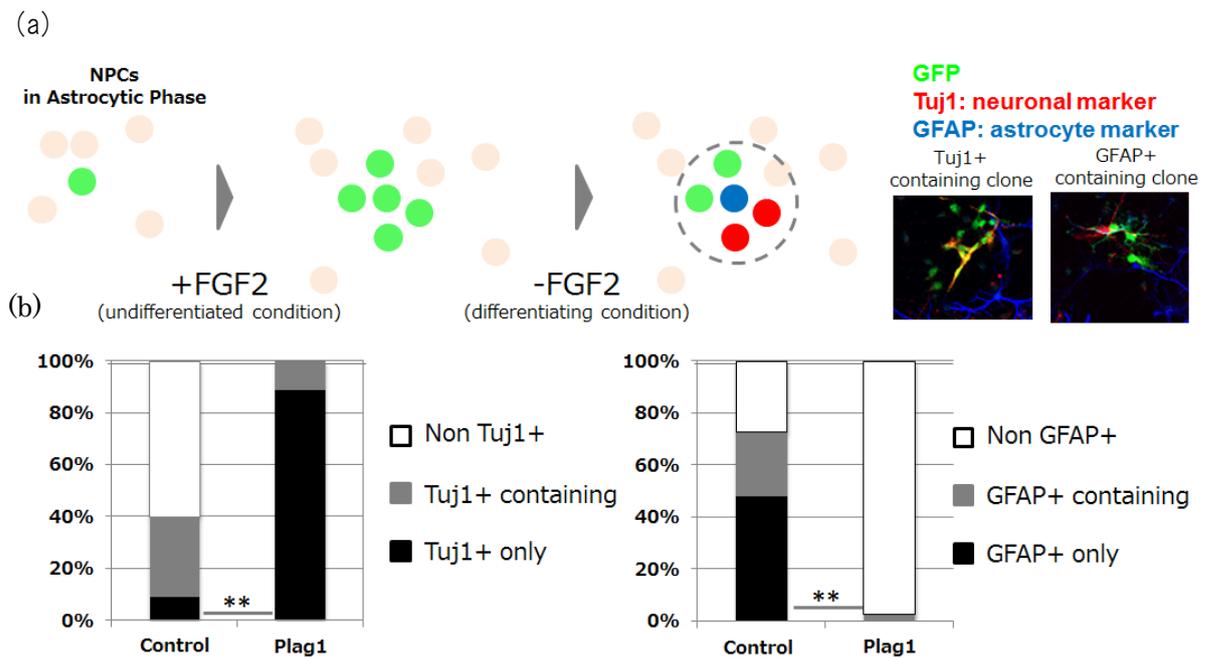


図 14. 神経系前駆細胞個々の分化ポテンシャルを調べることを目的としたクローナルアッセイ

(a) クローナルアッセイの方法を模式的に示した。一つの GFP 陽性細胞から増殖したと推測されるクローンの中に、各マーカー陽性細胞がどのように含まれるかで分類を行った。

(b) 左：ニューロンマーカーである TuJ1 陽性細胞の含まれ方でクローンを分類し、それぞれの割合を示した。

右：アストロサイトマーカーである GFAP 陽性細胞の含まれ方でクローンを分類し、それぞれの割合を示した。

エラーバーは SD を意味する。N=3 *; p value<0.05 t-test

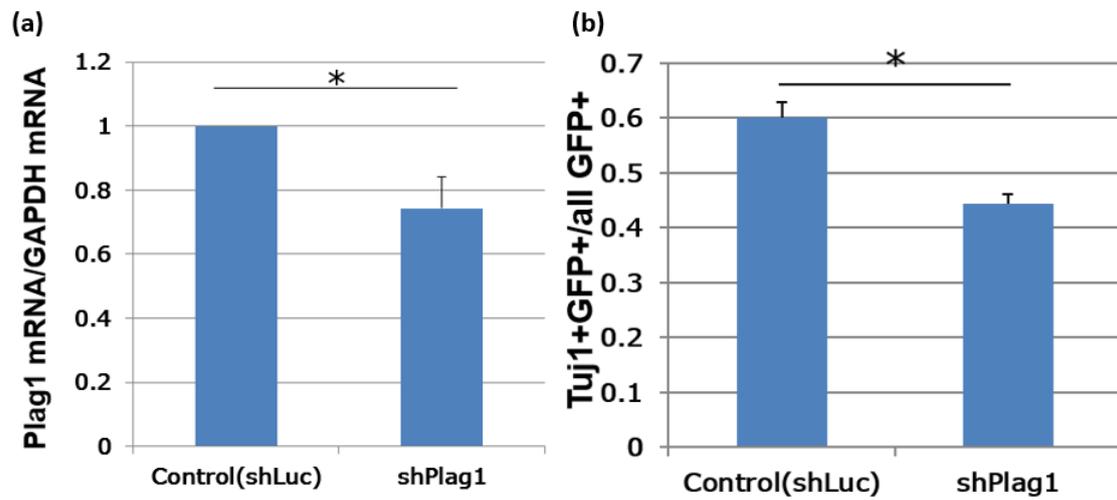


図 15.in vitro の実験系における Plag1 のノックダウンが与える神経系前駆細胞のニューロン分化への影響
 胎生 11 日目のマウス胎児大脳新皮質より神経系前駆細胞を採取し、Plag1 ノックダウンレトロウイルスを感染
 させて Plag1 のノックダウンを行い、未分化条件で一晩培養後分化条件下で 2 日間培養し固定した。
 (a)Plag1 の mRNA を定量 PCR で測定し、ノックダウン効率の検証を行った。内部標準として GAPDH を用い
 た。
 (b)ニューロンマーカー-Tuj1 で染色し、GFP と Tuj1 が共染色された割合をカウントした。エラーバーは SD を意味
 する。
 N=3 *: p value<0.05 t-test

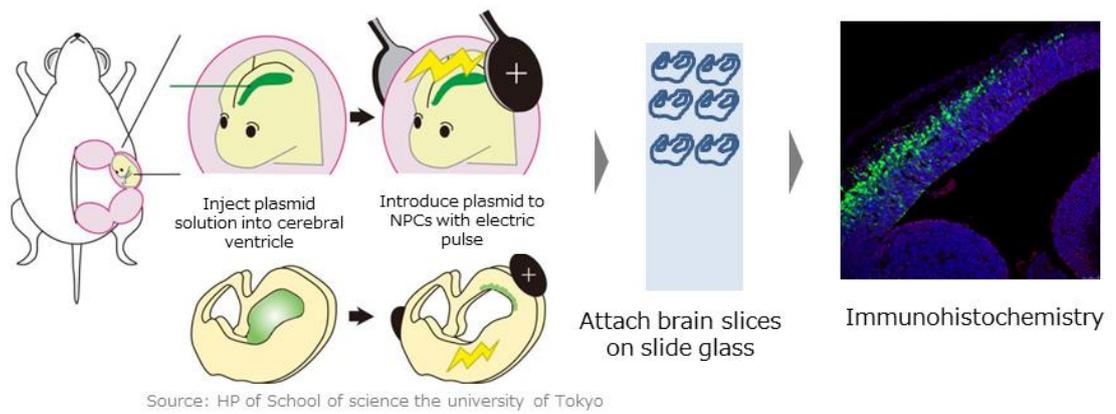
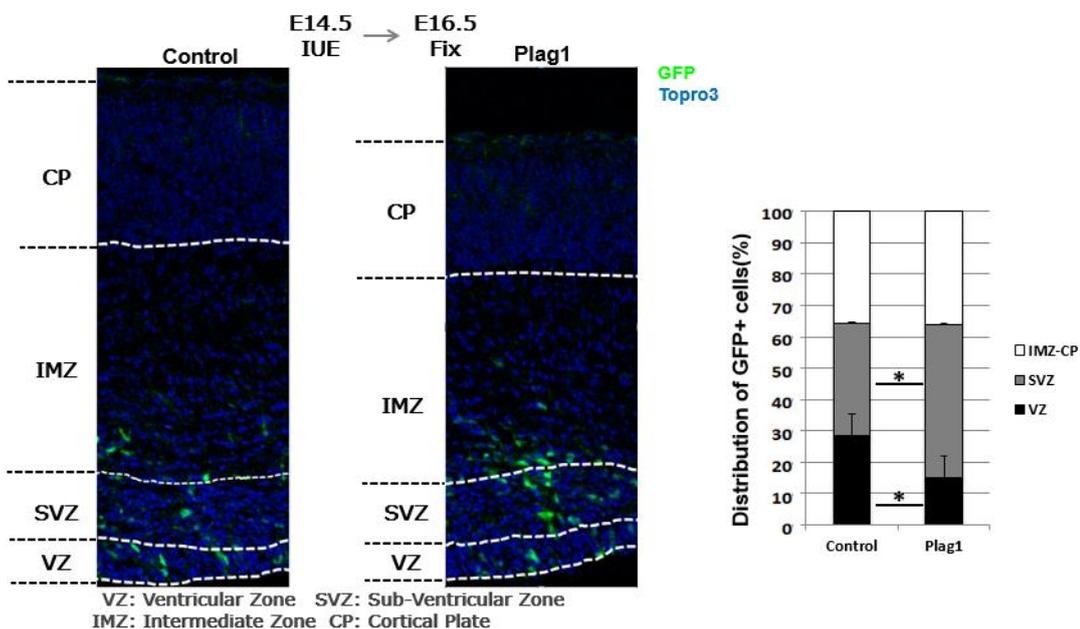


図 16. 子宮内電気穿孔法の模式的説明

妊娠マウスの腹部を切開し、子宮を取り出したうえで子宮内の胎児の脳室にガラス針を用いてプラスミド溶液を注入する。その後、脳室に面する部分に存在する神経系前駆細胞にプラスミドを電気穿孔法にて導入する。

その後、目的の時期で脳を固定した上で組織切片を作成し、抗体を用いた免疫組織染色法にて切片を染色した。

(a)



(b)

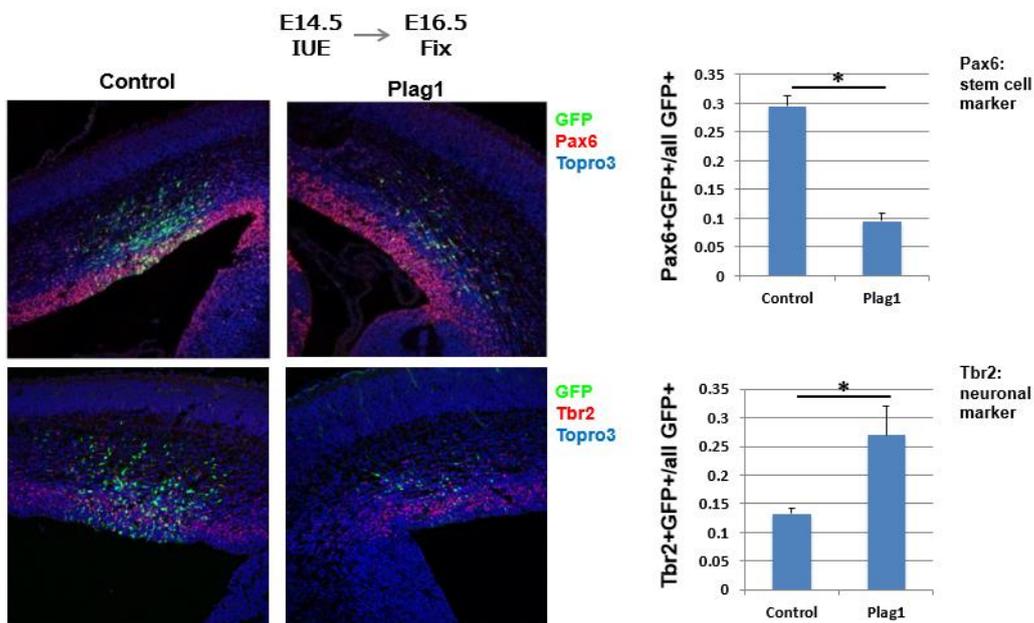
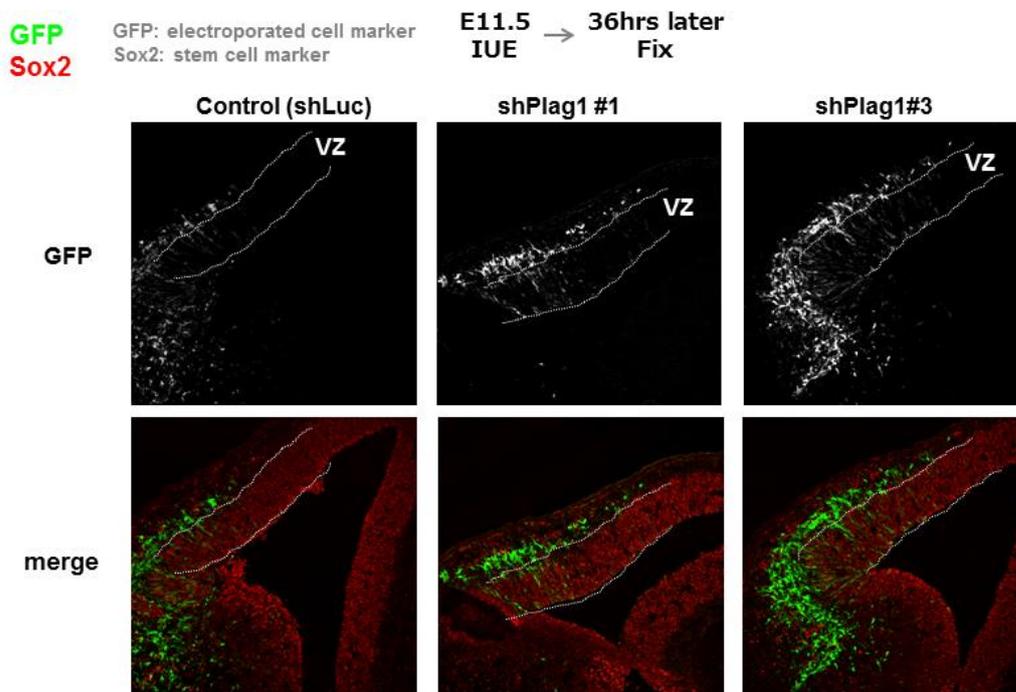


図 17. *in vivo* 実験系における Plag1 の過剰発現が神経系前駆細胞のニューロン分化へ与える影響 (a,b)胎生 14 日目のマウス大脳皮質に Plag1 過剰発現ベクターを子宮内エレクトロポレーションによって導入し、胎生 16.5 日目で固定した。そして幹細胞マーカー Pax6 とニューロンマーカー Tbr2 でそれぞれ染色を行い、カウントを行った。エラーバーは SD を意味する。*: p value < 0.01 t-test

(a)



(b)

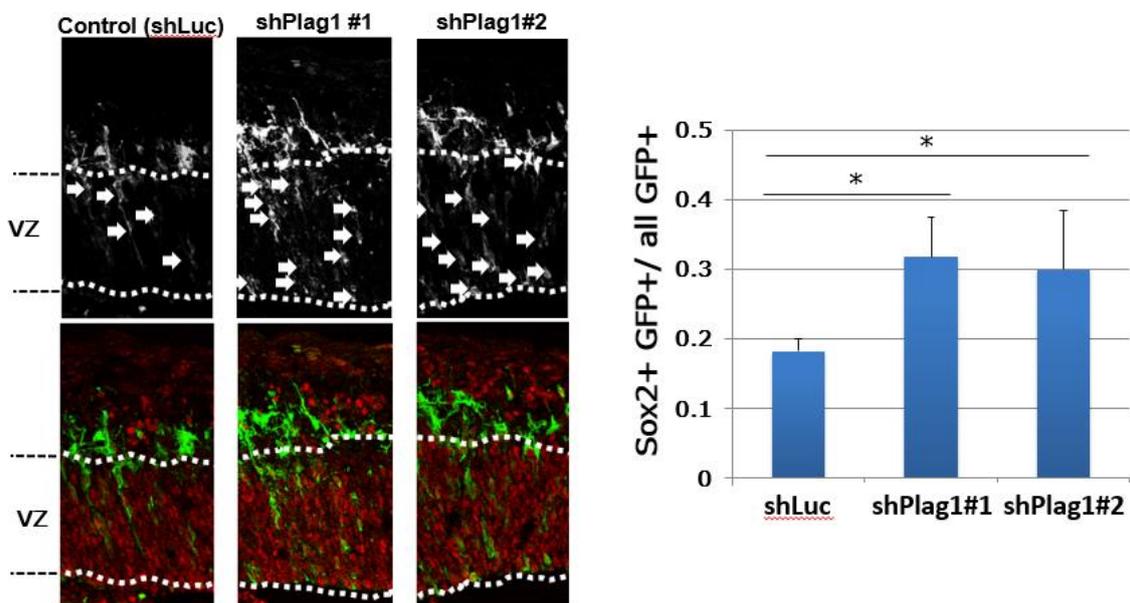


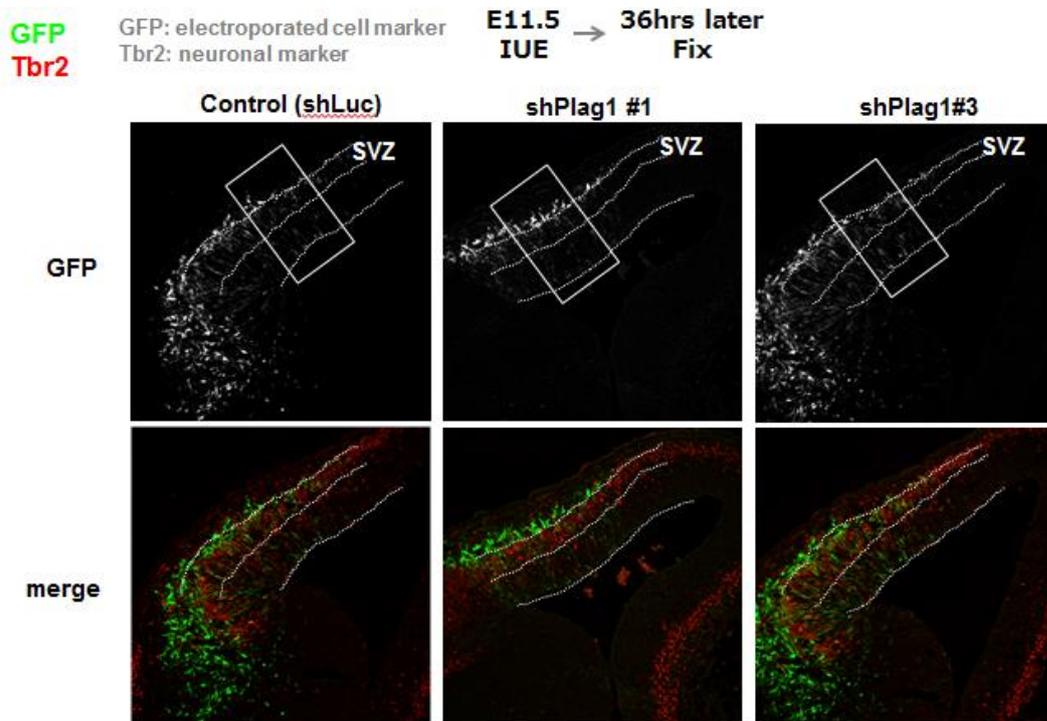
図 18. *in vivo* 実験系における Plag1 のノックダウンが神経系前駆細胞の未分化細胞群へ与える影響

(a)胎生 11 日目のマウス大脳皮質に Plag1 ノックダウンベクターを子宮内エレクトロポレーションによって導入し、36 時間後に固定した。そして幹細胞マーカーSox2 染色を行い、カウントを行った。エラーバーはSDを意味する。

(b)胎生 11 日目のマウス大脳皮質に Plag1 ノックダウンベクターを子宮内エレクトロポレーションによって導入し、36 時間後に固定した。そしてニューロンマーカーTbr2 染色を行い、カウントを行った。エラーバーはSDを意味する。

N>3 * :p value<0.05 t-test

(a)



(b)

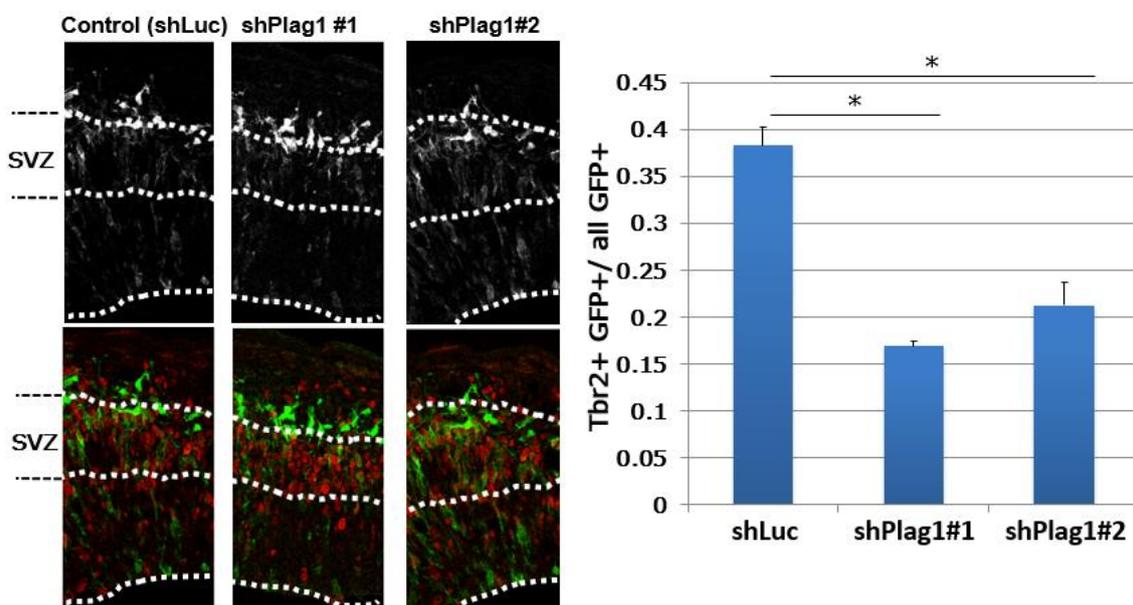


図 19. *in vivo* 実験系における Plag1 のノックダウンが神経系前駆細胞のニューロン分化へ与える影響
(a)胎生 11 日目のマウス大脳皮質に Plag1 ノックダウンベクターを子宮内エレクトロポレーションによって導入し、36 時間後に固定した。そして幹細胞マーカー Sox2 染色を行い、カウントを行った。エラーバーは SD を意味する。

(b)胎生 11 日目のマウス大脳皮質に Plag1 ノックダウンベクターを子宮内エレクトロポレーションによって導入し、36 時間後に固定した。そしてニューロンマーカー Tbr2 染色を行い、カウントを行った。エラーバーは SD を意味する。

N>3 * : p value < 0.05 t-test

考察

先行研究により明らかになった「HMGA2 は神経系前駆細胞のニューロン分化能に貢献する」ということ、さらに HMGA2 を後期神経系前駆細胞に過剰発現し、ニューロン分化を促進した時に、発現の上がる遺伝子、第二の条件は早期神経系前駆細胞において発現が高く、後期神経系前駆細胞において発現の下がる遺伝子を探索し、そのひとつとして Plag1 に注目し、その機能の解析を行った。

Plag1 のニューロン分化能に与える影響を調べたところ、Plag1 がニューロン分化能を *in vitro* でも *in vivo* でも促進する働きがあることを見出した。Plag1 は新規のニューロン分化能促進因子であるとともに、HMGA2 が Plag1 の発現調整を介して、神経系前駆細胞のニューロン分化能にポジティブに寄与する働きの一部を担う因子であることが示唆された。

HMGA と Plag1 の発現の相関関係について

後期神経系前駆細胞に HMGA2 を過剰発現することで Plag1 の発現の上昇が本研究において観察されたが、これ以外にも子宮筋腫の系において、HMGA の発現の高さと Plag1 の発現の高さの相関関係が報告されている(Klemke M, et al. PLoS ONE 2014)。子宮筋腫において HMGA2 の発現が高い群と低い群に分けると、HMGA2 の発現が高い群の方が、HMGA2 の発現の低い群よりも Plag1 の発現が高いということが報告されている。

HMGA と Plag1 の関係について、予備的な結果ではあるが当研究室の行った HMGA2 ChIP の結果を紹介する。図 20 に示すように、Plag1 の転写開始点から 1st intron の 7 kbp の間に複数のピークが検出された(Kishi et al., unpublished data)。このことから、HMGA2 は Plag1 の転写にかかわる部位に結合し、その転写を制御している可能性が示唆された。しかし、HMGA は AT-rich なドメインであれば結合する性質を持っており、AT-rich ドメインは多く存在する。実際に今回の HMGA2 ChIP においても Plag1 領域に「特異的」に結合しているとは言い切れない結果も得られた。HMGA が Plag1 の転写を「本当に」活性化しているかを検証するためには、Plag1 の転写活性にかかわる領域への HMGA の結合のみならず、HMGA と複合体を形成する転写にかかわるたんぱく質の結合についてもさらに解析を行う必要がある。

今回、当研究室では神経系前駆細胞の系において HMGA の ChIP を行いその結合領域の探索を行ったが、ほかの系を用いた結果について、これまでいくつか報告されている。これらの報告によると Plag1 の転写にかかわる領域への HMGA の結合は見られなかった。大腸がん由来の cell line である HCT116 を用いた HMGA2 ChIP を行った報告(Nina Winter et al., PLOS ONE 2014)、胃がんの細胞を用いた HMGA2 ChIP を行った報告(Zha L et al., Mol Cell Biochem. 2012)のいずれにおいても HMGA2 の Plag1 の転写にかかわる領域への結合を示唆するデータは見当たらなかった。しかし、これらのがんのもととなる器官である大腸、胃における Plag1 の発現は無いとする報告(Karen Hensen et al., Develop. Growth Differ. 2004)もあることから、「そもそも発現していないので結合していない」

可能性も考えられる。

また、本研究では、Plag1 が HMGA タンパクと同様に、神経系前駆細胞のニューロン分化能を制御することを観察したが、この現象が HMGA の下流で起こっているのかを検証するには、HMGA を過剰発現すると同時に Plag1 のノックダウンを行い、神経系前駆細胞のニューロン分化能を促進する働きがキャンセルされること、また HMGA をノックダウンすると同時に Plag1 の過剰発現を行いニューロン分化が促進する働きが維持されることを確認するべきである。

Plag1 による神経系前駆細胞のニューロン分化能の制御

本研究では、*in vitro* の系において、ニューロン産生期神経系前駆細胞に Plag1 を過剰発現すると、未分化条件下であるにもかかわらずニューロン分化が促進し、さらにアストロサイト産生期神経系前駆細胞に Plag1 を過剰発現すると、ニューロン分化が促進し、アストロサイト分化が抑制されること、また Plag1 をノックダウンするとニューロン分化が抑制される結果を得た。

一方で、*in vivo* の系においても、ニューロン産生期神経系前駆細胞に Plag1 を過剰発現するとニューロン分化が促進され、さらに Plag1 のノックダウンを行うことでニューロン分化が抑制される結果を得た。

特に、*in vitro* の系において得た、ニューロン分化能を失ったアストロサイト産生期神経系前駆細胞に Plag1 を過剰発現し、分化条件下でもニューロン分化を増やし、アストロサイト分化を抑制したという結果は、Plag1 が強力なニューロン分化誘導因子であることを示唆している。*in vivo* においても、ニューロン分化の終わった時期のマウスの脳で神経系前駆細胞に対して Plag1 の過剰発現を行い、ニューロン産生が起こるかどうかを今後、確認するべきである。

Plag1 は強力なニューロン分化誘導因子であることが示唆されているが、どのようなメカニズムで機能しているのだろうか。過去の報告においては Growth factor の発現上昇に寄与しているという報告もあり(Juma AR et al J Endocrinol. 2016; Van Dyck F et al., Int J Oncol. 2007)、増殖への関与が示唆されている。また IGF2 が直接のターゲット遺伝子として Plag1 によって発現上昇することが複数の系で報告されており(Van Dyck F et al., Int J Oncol. 2007)、神経系においても IGF2 はニューロン分化に寄与することが報告されているため、IGF2 の発現上昇を介したニューロン分化促進の可能性も考えられる。Plag1 によって発現が上昇する遺伝子の中に Wnt シグナル経路の遺伝子が含まれていること(Declercq et al., 2008)、Wnt シグナル経路とのクロストークが存在する可能性が報告されている。また Plag1 の全身ノックアウトマウスの解析も行われており、その表現型は体重の現象、全身の生育不良が表現型として報告されている(Hensen K et al., Dev Growth Differ. 2004)。しかし、神経系特異的にノックアウトした場合の解析についてはこれまで報告されていない。

また当研究室の先行研究によって、HMGA の下流において insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 (IMP2, Igf2bp2)が神経系前駆細胞のニューロン分化に貢献するという報告もなされた(Fujii Y et al., Genes Cells. 2013)。IMP2 の働きとしては IGF2 の mRNA の 5'UTR に結合し、その翻訳を促進していることが報告されている(Nielsen J et al., Mol Cell Biol 1999)。この IGF2 は

Plag1 のターゲット遺伝子として広く知られているものである(Zatkova A et al., Genes Chromosomes Cancer. 2004, Monira Akhtar et al., Int J Oncol. 2012, Juma AR et al., J Endocrinol. 2016, Abi Habib W et al., Genet Med. 2018)。したがって HMGA によるニューロン分化能は IMP2,Plag1 を介した IGF2 の発現調整によって担保されている可能性が考えられる。今後の研究で IGF2 をノックダウンすることで HMGA 過剰発現の効果がキャンセルされるかを検証することで、この可能性に迫れると考えている。Plag1 は転写因子であり、様々な複合体を形成することで転写促進にも転写抑制にも働くことが報告されているため、両方の観点をもって検証を行うことも重要であると考えられる。具体的には、神経系前駆細胞に Plag1 の過剰発現を行い、マイクロアレイを行ってターゲット遺伝子の同定を行い、同定された遺伝子の機能に応じてメカニズムの推定を行う必要があると考えている。

Plag1 は Plag family proteins の1つであり、他に PlagL1,PlagL2 が存在する(Kas K. et al., J Biol Chem. 1998)。Plag family proteins は DNA 結合ドメインが存在する N 末端のアミノ酸配列の相同性は高いが、C 末端のアミノ酸配列の相同性は低い(Abdollahi et al., J Cell Physiol. 2007)。この C 末端のアミノ酸配列の差によってそれぞれの機能の違いが生じている可能性が考えられる。実際に、Plag family proteins はニューロン産生期の脳皮質 Ventricular zone など神経系前駆細胞が存在するとされる領域での発現が高いことが報告されている。また PlagL1 が神経系前駆細胞で高く発現しており、ニューロン分化、およびそれに次ぐ神経の移動を抑制することが報告された(Adnani et al., J Neurosci. 2015)。また PlagL2 は Wnt シグナル経路を活性化することが報告されており(Zheng et al., Cancer Cell. 2010)、Wnt シグナルとのクロストークが存在する可能性が報告されている。このように Plag family protein の機能に関してはさまざまなものが報告されており、それらが相互に影響を及ぼしながら、神経系前駆細胞のニューロン分化を制御している可能性も考えられる。そのメカニズムについては、それぞれの神経系前駆細胞におけるターゲット遺伝子の解明を通して作用解明できるのではと現在考えている。

Plag1 が生み出すニューロンの subtype

神経系前駆細胞はニューロン分化期においても、発生時期依存的にその性質を変化させ、産み出すニューロンの種類を変えて行く。早く生まれたニューロンが神経系前駆細胞の存在する脳室帯から外側の表層近くに移動し 6 層ニューロンから 1 層ニューロンまで、順序よく異なる種類のニューロンを産み出して行く。本研究によって Plag1 がニューロン分化を促進することを見出したが、ニューロン分化能を促進するとき、どのような種類のニューロンを産み出すのだろうか？今までに、ニューロンの層マーカーとして知られている遺伝子がある。例えば Cux1 は 2, 3, 4 層のニューロンに発現し、Ctip2 は 5 層のニューロンに発現している。*in vitro* において Plag1 を過剰発現もしくはノックダウンをした時に、または *in vivo* においてそれぞれの遺伝子が発現する前の段階のマウスの脳に Plag1 を過剰発現もしくはノックダウンすることで、マーカーを発現する細胞の割合にどのような変化を調べる事で、明らかにする事ができると考えられる。

Plag1 の細胞移動に与える影響

本研究でおこなった in utero electroporation の実験では、胎生 14 日目のマウスの脳に Plag1 を過剰発現し、胎生 18 日目で解析すると、コントロールベクターが導入された細胞が VZ (CP; cortical plate) に細胞体の局在が見られたのに対して、Plag1 の過剰発現ベクターの導入された細胞の多くはポジティブコントロールとして用いた Ngn2 を過剰発現した場合と同様に中間帯 (IMZ; intermediate zone) に多く存在するという結果を予備的ではあるが得ている。

すなわち、Plag1 の過剰発現は Ngn2 の過剰発現と同様の動きをみせているため、Plag1 過剰発現による細胞移動への影響は少ないのではないかと考えている。

しかし、Plag family proteins のひとつである PlagL1 がニューロンの移動に影響を与えることも報告されており(Adnani L et al., J Neurosci. 2015)、Plag1 についても慎重に検討する必要があると考えている。

Plag1 の神経の成熟に関わる機能について

前述の先行研究の中で、NestinD4-EGFP ノックインマウスを用いて FACS により、NestinD4 の発現強度によって細胞を分取し、それぞれのフラクションでの Plag1 の発現量をマイクロアレイにて調べた際、NestinD4 の発現強度が高いフラクション、すなわち未分化であるほど Plag1 の発現量が高く、NestinD4 の発現強度の低いフラクション、すなわち分化が進んだフラクションほど Plag1 の発現が低くなることを示唆する結果を得た。もし、Plag1 が神経の成熟に貢献するのであれば、分化したのちも発現量を維持する、もしくは増加することが予想されるが、実際は低くなっていることが示唆されている。このことから Plag1 はニューロン分化にコミットする際に機能を発揮し、一度コミットすることが決まった後の成熟の過程においては関与していないと考えられる。

Plag1 の修飾とその転写活性について

Plag1 には SUMO 化とアセチル化修飾、リン酸化修飾が入ることが報告されている。SUMO 化は E3 ligase によって修飾され、アセチル化は p300 によって触媒されていると報告されている(Van Dyck F et al., Int J Oncol. 2007)。

これまでの先行研究で、SUMO 化された Plag1 は転写抑制的に働き、アセチル化修飾された Plag1 は転写活性化に寄与すると報告されている(Van Dyck F et al., Int J Oncol. 2007)。リン酸化に関しては 338-341 位にリン酸化サイトが同定されているが、転写活性に大きな影響はないことが報告されている(Kas K et al., J Biol Chem. 1998)。

これらの修飾は転写活性のほか、細胞内の局在やたんぱく質の安定化などにも寄与する可能性があり、Plag1 のニューロン分化における役割を見るうえでは考慮すべき観点である。今回の研究では、Plag1 そのものの発現を変化させる方法でのアプローチにとどまったが、今後の研究の課題として各分化ステージにおける endogenous な Plag1 の修飾状態の変化、およびそれにかかわる酵素との関係の観点からの解析が待たれる。

神経系前駆細胞のポテンシャルを維持する分子メカニズム

先行研究において、神経系前駆細胞において HMGA タンパクがニューロン分化能と未分化・増殖能を促進し、ポテンシャルを維持する働きがあることが示唆された。そして本研究においては HMGA タンパクがこれらのポテンシャルを制御するメカニズムの解明を目指した。ニューロン産生期の未分化な神経系前駆細胞で発現が高く、かつ HMGA2 の過剰発現で発現が上昇する遺伝子として Plag1 が先行研究において注目されていたため、Plag1 の神経系前駆細胞におけるニューロン分化能への関与を調べ、神経系前駆細胞のニューロン分化能を促進する結果を得た。このことから、Plag1 はニューロン産生期神経系前駆細胞において HMGA タンパクの担っている“神経系前駆細胞のニューロン分化ポテンシャルを維持する”という働きの一部、すなわちニューロン分化能を担う分子であると考えられる。

今回 HMGA2 の下流で発現が上昇する因子として見出した Plag1 は、ニューロン産生期 HMGA2 がクロマチンの凝集状態をゆるく制御することによって発現が誘導され、ニューロン分化能の維持に働く因子と考えられる。しかし、HMGA タンパクはあくまでもニューロン分化能を維持する程度であったのに対し、Plag1 は未分化条件下においても強力なニューロン分化能をもつ。これは HMGA の機能の一つにクロマチン構造を緩め、さまざまな遺伝子の転写許容状態を作り出すことが報告されていることから、その許容状態にされる遺伝子の中に未分化性を維持する他の因子が発現し、Plag1 の機能を抑制している可能性が考えられる。

神経系前駆細胞のニューロン分化に Plag1 を用いる生物学的意義

Plag1 が神経系前駆細胞のニューロン分化に貢献する生理学的意義は何であろうか？その問いの答えをさぐるため、脊椎動物・無脊椎動物を含めた様々な生物間での Plag1 タンパク質の保存性を調べた。保存性に関してはマウスの Plag1 タンパク質の配列を基準に、様々な種類の生物とその相同性をデータベースをもとに比較した。すると脊椎動物の間で保存性は高く、無脊椎動物との比較ではその相同性は低いことを示唆する結果を得た(図 21)。このことから Plag1 は生物の中でも比較的大きく複雑な中枢神経系をもつ脊椎動物の進化において何かしらの貢献をしている可能性が考えられるが、ほかのニューロン分化を制御するシグナル伝達経路の詳細な解明が行われることで検証されると考えている。

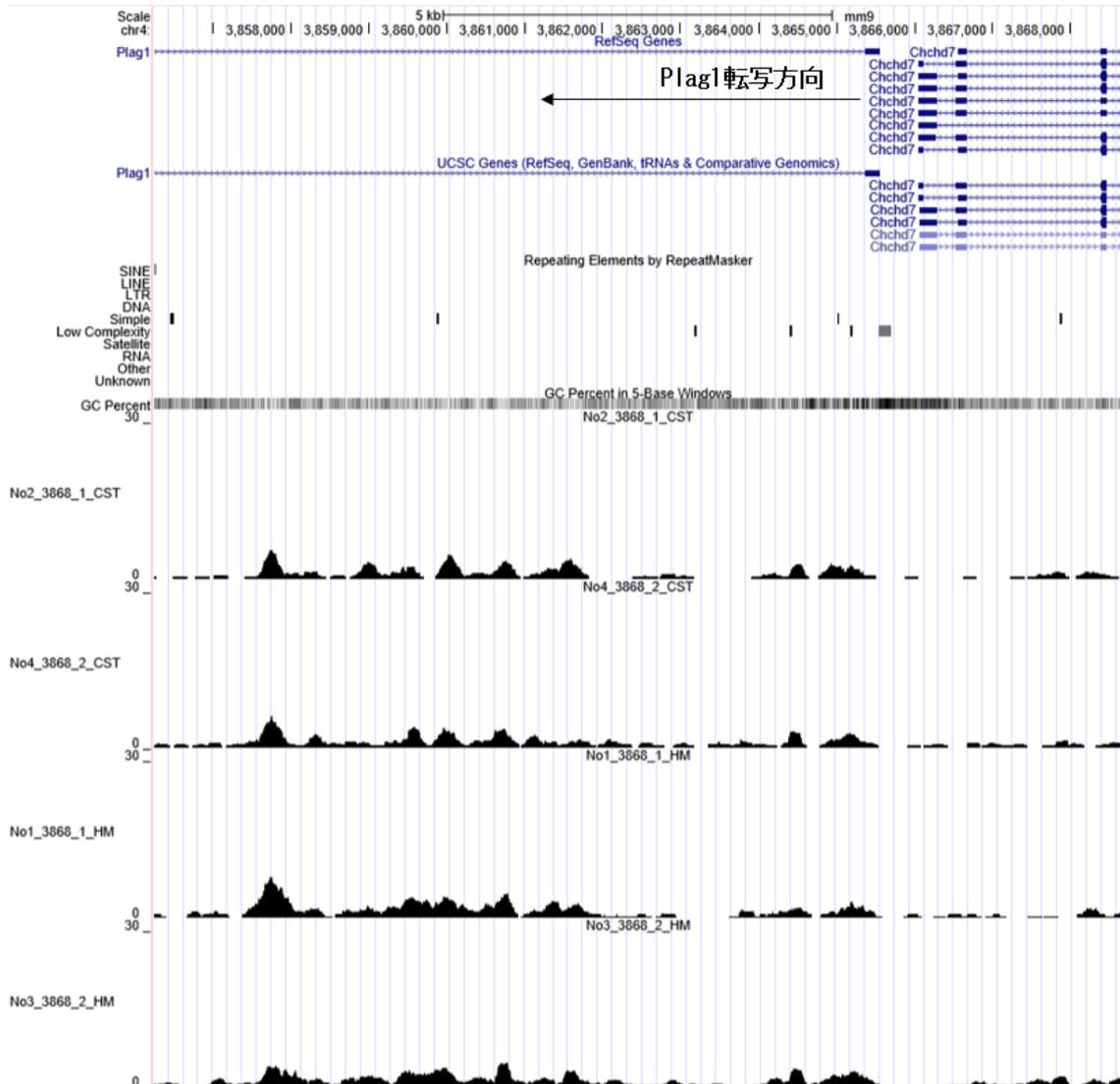
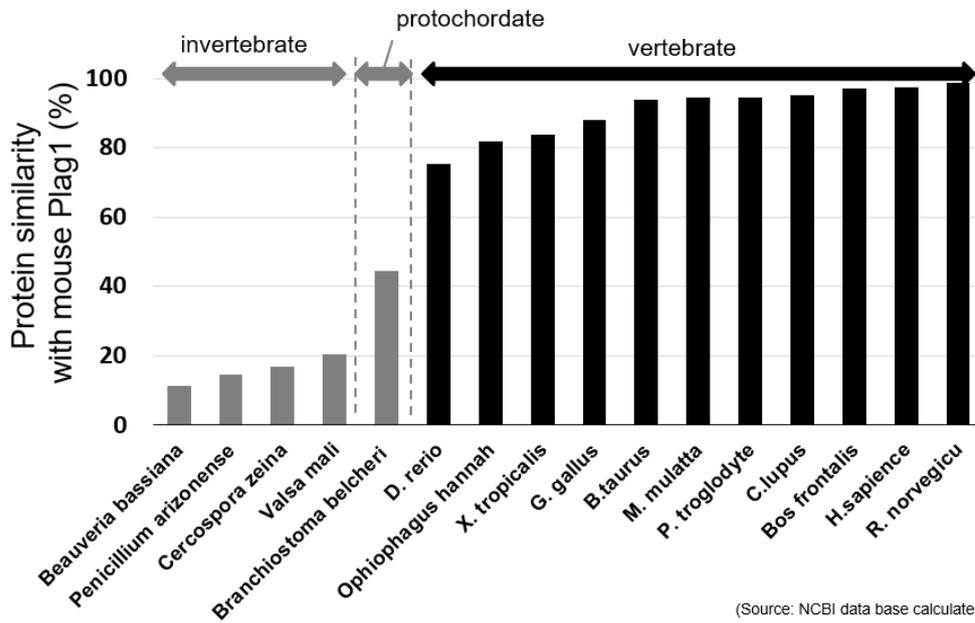


図 20. HMG2 の Plag1 領域への結合を HMG2 ChIP を行って検証した
 HMG2 ChIP を行い、Plag1 がコードされている領域への HMG2 の結合の検証を行った。転写開始
 点から 1st intron の 7 kbp の間に複数のピークが検出された

Protein similarity comparison



(Source: NCBI data base calculated by EMBOSS Needle)

図 21. Plag1 タンパク質の生物間での保存性の比較

マウス Plag1 タンパク質との相同性の比較を脊椎動物、原索動物、無脊椎動物含む様々な生物とおこなった。脊椎動物間での保存性は他に比べて比較的高い結果となっている。

結言

本研究の結果から、Plag1が新たなニューロン分化誘導因子として示唆され、またHMGAのニューロン分化能に貢献するメカニズムの一つが、Plag1の発現を介したものである可能性が示唆された。

これまで神経系前駆細胞において機能未知であったPlag1の機能を、上述のように解明したことは非常に新しい知見である。Plag family proteinsはその転写因子としての機能、また脳の発達期における発現分布から神経系前駆細胞において何かしらの機能を他の因子も持っている可能性が考えられ、その関係も含めて今後の研究が待たれる。

参考文献

1. Abdollahi A. LOT1 (ZAC1/PLAGL1) and its family members: mechanisms and functions. *J Cell Physiol.* Jan;210(1):16–25.2007
2. Abi Habib W, Brioude F, Edouard T, Bennett JT, Lienhardt–Roussie A, Tixier F, Salem J, Yuen T, Azzi S, Le Bouc Y, Harbison, Netchine I, Genetic disruption of the oncogenic HMGA2–PLAG1–IGF2 pathway causes fetal growth restriction. *Genet Med.* 2018
3. Adnani L, Langevin LM, Gautier E, Dixit R, Parsons K, Li S, Kaushik G, Wilkinson G, Wilson R, Childs S, Nguyen MD, Journot L, Dehay C, Schuurmans C. Zac1 Regulates the Differentiation and Migration of Neocortical Neurons via Pac1. *J Neurosci.* 2015 Sep 30;35(39):13430–47
4. Akhtar M, Holmgren C, Göndör A, Vesterlund M, Kanduri C, Larsson C, Ekström T.J. Cell type and context–specific function of PLAG1 for IGF2 P3 promoter activity. *Int J Oncol.* 2012
5. Alam S, Zinyk D, Ma L, Schuurmans C. Members of the Plag gene family are expressed in complementary and overlapping regions in the developing murine nervous system *Dev Dyn.* 2005 Nov;234(3):772–82.
6. Alexson TO, Hitoshi S, Coles BL, Bernstein A, van der Kooy D. Notch signaling is required to maintain all neural stem cell populations—irrespective of spatial or temporal niche. *Dev Neurosci.* 2006;28(1–2):34–48.
7. Belew MS1, Bhatia S1, Keyvani Chahi A1, Rentas S1, Draper JS1, Hope KJ2. PLAG1 and USF2 Co–regulate Expression of Musashi–2 in Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Stem Cell Reports.* 2018
8. Berlingieri, M.T., Manfioletti, G., Santoro, M., Bandiera, A., Visconti, R., Giancotti, V. & Fusco, A. (1995) Inhibition of HMGI–C protein synthesis suppresses retrovirally induced neoplastic transformation of rat thyroid cells. *Mol Cell Biol* 15, 1545–1553.
9. Bertrand, N., Castro, D.S. & Guillemot, F. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3, 517–530.2002
10. Bin Zhao, Karen Tumaneng & Kun–Liang Guan, The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self–renewal, *Nature cell biology*, 2011
11. Brunetti, A., Manfioletti, G., Chiefari, E., Goldfine, I.D. & Foti, D. Transcriptional regulation of human insulin receptor gene by the high–mobility group protein HMGI(Y). *FASEB J* 15,492–500.2001
12. Bryan T. MacDonald, Keiko Tamai, and Xi He Wnt/ β –catenin signaling: components, mechanisms, and diseases *Dev Cell.* 2009
13. C M Baum, I L Weissman, A S Tsukamoto, A M Buckle and B Peault Isolation of a candidate human hematopoietic stem–cell population *PNAS* April 1, 1992

14. Chiappetta, G., Avantaggiato, V., Visconti, R., Fedele, M., Battista, S., Trapasso, F., Merciai, B.M., Fidanza, V., Giancotti, V., Santoro, M., Simeone, A. & Fusco, A. High level expression of the HMGI (Y) gene during embryonic development. *Oncogene* 13, 2439–2446. 1996
15. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*. 2012
16. Declercq J, Skaland I, Van Dyck F, Janssen EA, Baak JP, Drijkoningen M, Van de Ven WJ. Adenomyoepitheliomatous lesions of the mammary glands in transgenic mice with targeted PLAG1 overexpression. *Int J Cancer*. 2008
17. Fan, G., Martinowich, K., Chin, M.H., He, F., Fouse, S.D., Hutnick, L., Hattori, D., Ge, W., Shen, Y., Wu, H., ten Hoeve, J., Shuai, K. & Sun, Y.E. DNA methylation controls the timing of astroglialogenesis through regulation of JAK–STAT signaling. *Development* 132, 3345–3356. 2005
18. Frederik Van Dyck Jeroen Declercq Caroline V. Braem Wim J.M. Van de Ven PLAG1, the prototype of the PLAG gene family: Versatility in tumour development (Review) *Int J Oncol*. 2007
19. Fujii Y, Kishi Y, Gotoh Y. IMP2 regulates differentiation potentials of mouse neocortical neural precursor cells. *Genes Cells*. 2013
20. Funayama, R., Saito, M., Tanobe, H. & Ishikawa, F. Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *J Cell Biol* 175, 869–880. 2006
21. Gaiano, N., Nye, J.S. & Fishell, G. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* 26,395–404. 2000
22. Ge, W., Martinowich, K., Wu, X., He, F., Miyamoto, A., Fan, G., Weinmaster, G. & Sun, Y.E. Notch signaling promotes astroglialogenesis via direct CSL-mediated glial gene activation. *J Neurosci Res* 69, 848–860. 2002
23. Ghinassi B, Martelli F, Verrucci M, D'Amore E, Migliaccio G, Vannucchi AM, Hoffman R, Migliaccio AR. Evidence for organ-specific stem cell microenvironments. *J Cell Physiol*. 2010
24. Grisham, Joe W Liver Stem Cells. *American Scientist; Research Triangle Park* Vol. 86, Iss. 4, (Jul/Aug 1998)
25. Hand, R., Bortone, D., Mattar, P., Nguyen, L., Heng, J.I., Guerrier, S., Boutt, E., Peters, E., Barnes, A.P., Parras, C., Schuurmans, C., Guillemot, F. & Polleux, F. Phosphorylation of Neurogenin2 specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron* 48, 45–62. 2005
26. Helms, A. W. & Johnson, J.E. (2003) Specification of dorsal spinal cord interneurons. *Curr Opin Neurobiol* 13, 42–49.
27. Hensen K, Braem C, Declercq J, Van Dyck F, Dewerchin M, Fiette L, Denef C, Van de Ven WJ. Targeted disruption of the murine Plag1 proto-oncogene causes growth retardation and reduced fertility. *Dev Growth Differ*. 2004

28. Hirabayashi Y, Gotoh Y. Stage-dependent fate determination of neural precursor cells in mouse forebrain. *Neurosci Res.* 2005
29. Hirabayashi Y, Itoh Y, Tabata H, Nakajima K, Akiyama T, Masuyama N, Gotoh Y. The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development.* 2004
30. Hirabayashi, Y., Suzuki, N., Tsuboi, M., Endo, T.A., Toyoda, T., Shinga, J., Koseki, H., Vidal, M. & Gotoh, Y. Polycomb+A46 limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition. *Neuron* 63, 600–613. 2009
31. Hock, R., Furusawa, T., Ueda, T. & Bustin, M. HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol* 17, 72–79. 2007
32. Huth, J.R., Bewley, C.A., Nissen, M.S., Evans, J.N., Reeves, R., Gronenborn, A.M. & Clore, G.M. The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nat Struct Biol* 4, 657–665. 1997
33. Imayoshi I, Sakamoto M, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R. Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci.* 2010 Mar 3;30(9)
34. Johe, K.K., Hazel, T.G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M.M. & McKay, R.D. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* 10, 3129–3140. 1996
35. Juma AR, Damdimopoulou PE, Grommen SV, Van de Ven WJ, De Groef B. Emerging role of PLAG1 as a regulator of growth and reproduction. *J Endocrinol.* 2016
36. Kadesch, T. Notch signaling: the demise of elegant simplicity. *Curr Opin Genet Dev* 14, 506–512. 2004
37. Kadota, K., Nakai, Y. & Shimizu, K. A weighted average difference method for detecting differentially expressed genes from microarray data. *Algorithms Mol Biol* 3, 8. 2008
38. Kuwahara A, Hirabayashi Y, Knoepfler PS, Taketo MM, Sakai J, Kodama T, Gotoh Y. Wnt signaling and its downstream target N-myc regulate basal progenitors in the developing neocortex. *Development.* 2010 Apr;137(7):1035–44
39. Kuwahara A, Sakai H, Xu Y, Itoh Y, Hirabayashi Y, Gotoh Y. Tcf3 represses Wnt- β -catenin signaling and maintains neural stem cell population during neocortical development. *PLoS One.* 2014 May 15;9(5)
40. Leger, H., Sock, E., Renner, K., Grummt, F. & Wegner, M. Functional interaction between the POU domain protein Tst-1/Oct-6 and the high-mobility-group protein HMG-I/Y. *Mol Cell Biol* 15, 3738–3747. 1995
41. Liqun Yuan Basseem A. Hassan Neurogenins in brain development and disease: An overview *Archives of Biochemistry and Biophysics* Volume 558, 15 September 2014,

42. Louvi, A. & Artavanis-Tsakonas, S. Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* 7, 93–102.2006
43. Lüscher B. Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network. *Gene*. 2001 Oct 17;277(1–2):1–14.
44. Magdalena Götz & Wieland B. Huttner *Developmental cell biology: The cell biology of neurogenesis Nature Reviews Molecular Cell Biology* volume 6, pages 777–788.2005
45. Markus Klemke, Marietta Henrike Müller, Werner Wosniok, Dominique Nadine Markowski, Rolf Nimzyk, Burkhard Maria Helmke, and Jörn Bullerdiek *Correlated Expression of HMGA2 and PLAG1 in Thyroid Tumors, Uterine Leiomyomas and Experimental Models PLoS One*. 2014
46. Masakazu Namihira, Jun Kohyama, Masahiko Abematsu, and Kinichi Nakashima *Epigenetic mechanisms regulating fate specification of neural stem cells Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2008
47. Munshi, N., Agalioti, T., Lomvardas, S., Merika, M., Chen, G. & Thanos, D. Coordination of a transcriptional switch by HMG(Y) acetylation. *Science* 293, 1133–1136.2001
48. Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*. 2008
49. Nagao M, Ogata T, Sawada Y, Gotoh Y. Zbtb20 promotes astrocytogenesis during neocortical development. *Nat Commun*. 2016 Mar 22;7:11102
50. Naka, H., Nakamura, S., Shimazaki, T. & Okano, H. Requirement for COUP-TFI and II in the temporal specification of neural stem cells in CNS development. *Nat Neurosci*. 2008 Sep;11(9):1014–23
51. Nakashima, K., Takizawa, T., Ochiai, W., Yanagisawa, M., Hisatsune, T., Nakafuku, M., Miyazono, K., Kishimoto, T., Kageyama, R. & Taga, T. BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5868–5873. 2001
52. Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K. & Taga, T. Synergistic signaling in fetal brain by STAT3–Smad1 complex bridged by p300. *Science* 284, 479–482.1999
53. Namihira, M., Kohyama, J., Semi, K., Sanosaka, T., Deneen, B., Taga, T. & Nakashima, K. Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells. *Dev Cell* 16, 245–255.2009
54. Narita, M., Krizhanovsky, V., Nunez, S., Chicas, A., Hearn, S.A., Myers, M.P. & Lowe, S.W. A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* 126, 503–514.2006
55. Nieto, M., Schuurmans, C., Britz, O. & Guillemot, F. Neural bHLH genes control the neuronal

- versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 29, 401–413.2001
56. Nina Winter, Rolf Nimzyk, Carolin Bösch, Anke Meyer, Jörn Bullerdiek Chromatin Immunoprecipitation to Analyze DNA Binding Sites of HMGA2 *PLOS One* 2011
 57. Nishino, J., Kim, I., Chada, K. & Morrison, S.J. Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell* 135, 227–239.2008
 58. Odorico JS1, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 2001
 59. Qian X, Shen Q, Goderie SK, He W, Capela A, Davis AA, Temple S. Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron*. 2000
 60. Reeves, R., Leonard, W.J. & Nissen, M.S. Binding of HMG-I(Y) imparts architectural specificity to a positioned nucleosome on the promoter of the human interleukin-2 receptor alpha gene. *Mol Cell Biol* 20, 4666–4679.2000
 61. Sakakibara S, Imai T, Hamaguchi K, Okabe M, Aruga J, Nakajima K, Yasutomi D, Nagata T, Kurihara Y, Uesugi S, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Okano H. Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev Biol*. 1996 Jun 15;176(2):230–42.
 62. Sally Temple The development of neural stem cells *Nature* 2001
 63. Samuel Weiss, Christine Dunne, Jennifer Hewson, Cheryl Wohl, Matt Wheatley, Alan C. Peterson and Brent A. Reynolds Multipotent CNS Stem Cells Are Present in the Adult Mammalian Spinal Cord and Ventricular Neuroaxis. *Journal of Neuroscience* 1 December 1996
 64. Sanosaka, T., Namihira, M., Asano, H., Kohyama, J., Aisaki, K., Igarashi, K., Kanno, J. & Nakashima, K. Identification of genes that restrict astrocyte differentiation of midgestational neural precursor cells. *Neuroscience* 155, 780–788.2008
 65. Sardi, S.P., Murtie, J., Koirala, S., Patten, B.A. & Corfas, G. Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain. *Cell* 127,185–197. 2006
 66. Sauer, F C. Mitosis in the neural tube. *J. Comp. Neural*. 62,1935
 67. Schuurmans, C., Armant, O., Nieto, M. et al. Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and-independent pathways. *EMBO J* 23, 2892–2902.2004
 68. Sgarra, R., Rustighi, A., Tessari, M.A., Di Bernardo, J., Altamura, S., Fusco, A., Manfioletti, G. & Giancotti, V. Nuclear phosphoproteins HMGA and their relationship with chromatin structure and cancer. *FEBS Lett* 574, 1–8.2004
 69. Shen Q, Wang Y, Dimos JT, Fasano CA, Phoenix TN, Lemischka IR, Ivanova NB, Stifani S, Morrisey EE, Temple S.The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of

- individual progenitor cells. *Nat Neurosci.* 2006
70. Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M.Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G. & Greenberg, M.E. Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104, 365–376.2001
 71. Takizawa, T., Nakashima, K., Namihira, M., Ochiai, W., Uemura A., Yanagisawa, M., Fujita, N., Nakao, M. & Taga, T. DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell* 1, 749–758.2001
 72. Thomson JA1, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998
 73. Tomita, K., Moriyoshi, K., Nakanishi, S., Guillemot, F. & Kageyama, R. Mammalian achaete-scute and atonal homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system. *EMBO J* 19, 5460–5472.2000
 74. Yie, J., Merika, M., Munshi, N., Chen, G. & Thanos, D. The role of HMG I(Y) in the assembly and function of the IFN-beta enhanceosome. *EMBO J* 18, 3074–3089.1999
 75. Zatkova A, Rouillard JM, Hartmann W, Lamb BJ, Kuick R, Eckart M, von Schweinitz D, Koch A, Fonatsch C, Pietsch T, Hanash SM, Wimmer K. Amplification and overexpression of the IGF2 regulator PLAG1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004
 76. Zha L, Wang Z, Tang W, Zhang N, Liao G, Huang Z. Genome-wide analysis of HMGA2 transcription factor binding sites by ChIP on chip in gastric carcinoma cells. *Mol Cell Biochem.* 2012
 77. Zheng H, Ying H, Wiedemeyer R, Yan H, Quayle SN, Ivanova EV, Paik JH, Zhang H, Xiao Y, Perry SR, Hu J, Vinjamoori A, Gan B, Sahin E, Chheda MG, Brennan C, Wang YA, Hahn WC, Chin L, DePinho RA. PLAGL2 regulates Wnt signaling to impede differentiation in neural stem cells and gliomas. *Cancer Cell.* 2010 May 18;17(5):497–509
 78. Zhou, M., Doetschman, T., Coffin, J.D., Wyland, J.J. & Hung, Y.T. Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis. *Nat Neurosci* 2, 848.1999

発表実績

発表論文

Kuwahara A¹, Sakai H¹, Xu Y¹, Itoh Y, Hirabayashi Y, Gotoh Y.

Tcf3 Represses Wnt- β -Catenin Signaling and Maintains Neural Stem Cell Population during Neocortical Development

1: Contributed equally to this work with
PLoS One. 2014

Yasuhiro Itoh, Maiko Higuchi, Koji Oishi, Yusuke Kishi, Tomohiko Okazaki, Hiroshi Sakai, Takaki Miyata, Kazunori Nakajima, and Yukiko Gotoh

The PDK1-Akt pathway regulates radial neuronal migration and microtubules in the developing mouse neocortex

Proc. Natl. Acad. Sci. USA(2016)

Sakai H, Kishi Y, Fujii Y, Gotoh Y

Plag1 promotes neuronal differentiation of mouse neocortical progenitor cells

In preparation

学会発表

酒井 寛、桑原 篤、平林 祐介、後藤 由季子

Tcf3 Maintains undifferentiated neuronal precursor cells in the developing mouse neocortex.

第35回日本分子生物学会年回 平成24年12月11日-14日 福岡国際会議場

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました、後藤由季子教授に深く御礼申し上げます。研究方針についていつも親身にディスカッションを行って下さり、的確なアドバイスを下さいました。そして、普段から研究のおもしろさや、研究を進めるにあたっての考え方など様々なこととお話し下さり、そのたびに研究に対するモチベーションを上げることができました。また、様々な勉強の機会を与えて下さることに感謝しています。

研究室に加わった直後からサイエンスのみならず親身に生き方、ものの考え方も含め教えてくださった平林祐介氏、本研究を通して、実験手法など、研究の基礎を教えて下さった岸雄介氏に感謝致します。また、樋口麻衣子氏、伊藤靖浩氏、長尾元史氏をはじめとする研究室の先輩方にも非常にお世話になり、常に前向きに研究に向かうメンタリティを支えていただいたことに、大変感謝いたします。

また、修士課程と博士課程の計5年間、充実した研究生活を送ることができたのも後藤研究室のメンバーの皆様のお陰です。深く御礼申し上げます。研究生活を送るにあたって、生活面でサポートしてくれた家族に感謝します。色々と心配をかけたと思いますが、自由な私を理解してくれた家族のおかげで安心して研究に打ち込むことができました。

最後になりますが、本論文の審査を行って下さった主査の後藤由季子教授、副査の鈴木勉教授、岡本晃充教授、長棟輝行教授、三浦正幸教授、鈴木健夫先生に深く御礼申し上げます。