

学位論文内容の要旨

マウス大脳新皮質神経系前駆細胞における分化運命転換機構の解析

後藤研究室 37097174 森本（鈴木）菜央

1. 緒言

大脳は行動、思考などの高次機能を担う組織である。特に、哺乳類大脳新皮質には、感覚、運動、言語、認知などに関わる脳の各システムが集中している。大脳新皮質はニューロンの細胞体が層状に配列した構造からなる。各層には異なる種類のニューロンが存在し、各システムを担う領域ごとに各層のニューロンの数が異なる。このようなニューロンとグリア細胞が複雑なネットワークを形成することで、脳の高度な機能を支えている。そして、この複雑な脳は発生過程におけるプログラムに従って構築される。ここには厳密な制御メカニズムが存在すると考えられるが、発生過程における脳の構築に関する制御メカニズムは未だ明らかにされていない部分が多い。

本研究では、ニューロンの数を制御するメカニズムの一つを明らかにするため、神経系前駆細胞が産み出すニューロンの種類を発生時期依存的に変える制御メカニズムの検討を行った。

2. 時期依存的な分化運命転換メカニズム

【序論】

哺乳類大脳新皮質は 6 つの層から構成される。層ごとに様々な種類のニューロンが存在し、投射先や形態などが異なる。各層のニューロンは大脳発生期に共通の神経系前駆細胞から順序立てて生み出されることが分かっている。神経系前駆細胞はまず、各層のニューロンを順に（VI 層，V 層，IV 層，II/III 層）生み出し、次にニューロンの機能を支えるグリア細胞を生み出す（図 1）。

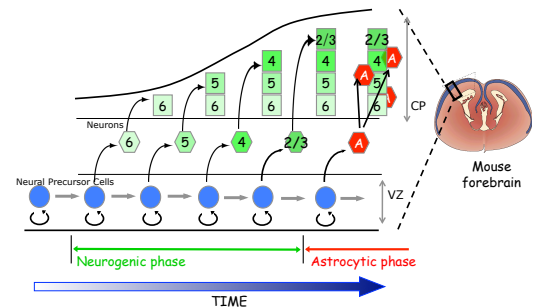


図 1 神経系前駆細胞は発生時期依存的に各層のニューロンを順序立てて産み出す

大脳が正常に機能するには、層ごとのニューロンが適切な数だけ存在することが重要である。従って、神経系前駆細胞において運命転換のタイミングは厳密に決まっていると考えられる。しかしながら、神経系前駆細胞が発生時期依存的に生み出すニューロンを変えるメカニズムについてはほとんど分かっていない。近年の報告から、時期依存的な神経系前駆細胞の分化運命の転換には細胞内因性の制御機構が存在することが示唆された(Shen et al., 2006)。そこで本研究では、神経系前駆細胞が産出するニューロンの種類を時期依存的に順次変えていく内因性の制御機構の解明を目的とした。

私ははじめに、V 層ニューロン産生期から IV 層ニューロン産生期の転換期に注目した。V 層には皮質外に投射する大型のニューロンが存在し、IV 層には視床から投射を受け皮質内へ投射するようなニューロンが存在する。V 層皮質外投射ニューロン（転写因子 CTIP2 がマーカーとして用いられる）の決定因子としては転写因子 Fezf2 がすでに知られている。Fezf2 は神経系前駆細胞が存在する大脳新皮質脳室帯において V 層ニューロン産生期まで発現し、IV 層ニューロン産生期にはその発現が見られなくなる。また、IV 層ニューロン産生期の神経系前駆細胞および未成熟ニューロンに Fezf2 を過剰発現することで遺伝子導入細胞は CTIP2 陽性 V 層皮質外投射ニューロンに分化すること、および Fezf2 欠損マウスでは CTIP2 陽性 V 層皮質外投射ニューロンが消失することが報告されている(Molyneaux et al., 2005;Chen et al., 2005;Chen et al., 2005;Rossa et al., 2013;Rounaux and Arlotta, 2013)。このように、Fezf2 の発現抑制が V 層ニューロン産生の終了に重要であること

が知られていたが、**Fezf2** の発現がいかにして **V** 層ニューロン産生のあとで抑制されるのかは明らかにされていなかった。そこで、**Fezf2** の発現抑制が内因性の制御機構によるものかどうか、またそうであるならばどのような機構であるのかを検討することにした。

細胞内因性の制御機構としてポリコーム群タンパク質 (**PcG**) に着目した。**PcG** はヒストン修飾を介して、クロマチンの構造変化をもたらし、遺伝子の発現制御を行うことが知られている。近年、**PcG** が幹細胞や癌において非常に重要な役割を担っていることに加え、神経系前駆細胞においても様々な役割を担うことが明らかになりつつある。我々の先行研究においても、**PcG** がニューロン分化期からグリア分化期への移行のタイミングを決定していることが明らかになった (**Hirabayashi et al., 2009**)。そこで、**PcG** がニューロン分化期のなかで、神経系前駆細胞の分化運命転換を制御しているかを検討することにした。本研究により、神経系前駆細胞における **PcG** の役割の一端を明らかにすることを目的とした。

【結果】

PcG が **V** 層 **CTIP2** 陽性ニューロンの数を制御しているかどうかを検討するため、**V** 層ニューロン産生の前の時期に **PcG** 構成因子 **Ring1B** の条件的遺伝子破壊を行った。その結果、**Ring1B** のノックアウトマウス大脳新皮質では野生型と比較して **CTIP2** 陽性ニューロンの数が増加し、II/III, IV 層ニューロンマーカである **Cux1** 陽性ニューロンの数が減少していた (図 2)。さらに、この **CTIP2** 陽性ニューロンの増加が、**CTIP2** 陽性ニューロン産生期が延びたことによるものかどうかを検討するために、

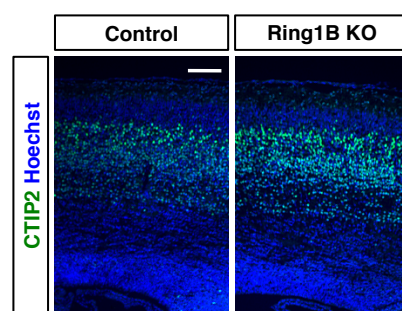


図 2 **Ring1B** 欠損マウス大脳新皮質において、**CTIP2** 陽性ニューロン数が増加した
スケールバーは 100 μ m である。

5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) による **Birthdate** ラベルを行った。**V** 層ニューロン産生が終了する時期である胎生 14 日目頃に **BrdU** を投与した結果、実際に野生型においては **BrdU** 陽性ニューロンのほとんどは **CTIP2** 陰性であった。一方で、**Ring1B** ノックアウトマウス大脳新皮質においては、**BrdU** 陽性ニューロンのうち、**CTIP2** 陽性なニューロンの割合が野生型に比較して多く観察された。このことから、**Ring1B** ノックアウトマウス大脳新皮質において、野生型と比較して **V** 層皮質下投射ニューロン産生期がより長く続いていると考えられる。さらに、ニューロンの数の制御に対する **Ring1B** の作用点を調べるために、ニューロン分化後に **Cre** を発現する **Nex-Cre** マウスを用いて **Ring1B** 遺伝子をニューロン分化後に条件的に破壊した。その結果、**Ring1B**;**Nex-Cre** マウスでは野生型に比較して、**CTIP2** 陽性ニューロンの増加は見られなかった。このことから、ニューロンに分化してからではなく、神経系前駆細胞において **Ring1B** が **CTIP2** 陽性ニューロン産生期の終了を制御していることが示唆された。

次に、**PcG** がどのようなメカニズムで **CTIP2** 陽性ニューロン産生期の終了を制御しているかを検討した。そこで、**Ring1B** 欠損マウス由来細胞において野生型に比較し脱抑制している遺伝子を調べた。**V** 層ニューロン産生期の終わったあとの **Ring1B** 欠損マウス大脳新皮質から **Fluorescence activated cell sorting (FACS)** を用いて、幹細胞マーカである **CD133** 強度依存的に 4 群の細胞を回収した。その結果、**CD133^{High}** 神経系前駆細胞においては **Fezf2** の脱抑制は見られなかったが、**CD133^{Mid}**, **CD133^{Low}**, **CD133^{Nega}** の 3 群において **Fezf2** が脱抑制していた。このことは、**V** 層ニューロン産生期のあとで **PcG** が **Fezf2** を抑制していることを示す。

さらに、PcG が直接 *Fezf2* を抑制しているかを検討するために、*Fezf2* プロモーター領域における PcG 量を調べた。その結果、*CD133^{High}* 神経系前駆細胞において、E14 から E16 にかけて、*Fezf2* プロモーター領域における H3K27me3 修飾量、および Ring1B 量が増加することが分かった。このタイミングは、*Fezf2* の発現が低下するタイミングに一致する。従って、PcG が *Fezf2* を直接抑制することが明らかになった。

以上の結果から、PcG が発生時期依存的に神経系前駆細胞において *Fezf2* の発現を抑制し、V 層ニューロン産生期の終了時期を決定していることが示唆された (図 3)。

次に、PcG による *Fezf2* の抑制が神経系前駆細胞内因的にプログラムされたものであるかを検討するために、マウス大脳新皮質より神経系前駆細胞を単離し、*in vitro* 培養した。この *in vitro* 培養系において、V 層ニューロン産生期から IV 層ニューロン産生期への転換が模倣できることが報告されている。胎生 11 日目マウス大脳新皮質由来の神経系前駆細胞を未分化条件下で培養したところ、ニューロン分化期後期に相当する時期において培養日数に伴って *Fezf2* の転写量が低下した。さらにこのとき分化条件で培養し、神経系前駆細胞が生み出すニューロンの種類について検討したところ、同様にニューロン分化期後期に相当する時期において CTIP2 陽性 V 層皮質外投射ニューロンの割合も減少した。従って、V 層ニューロン産生期の終了を模倣する *in vitro* 培養系が得られた。

次に、この系を用いて *Fezf2* プロモーター領域における培養時間依存的なヒストン H3K27me3 化修飾量および Ring1B 量の変化を検討した (図 4)。その結果、H3K27me3 修飾量および Ring1B 量が培養日数に伴い増加することを見いだした。従って、PcG による *Fezf2* の抑制は細胞内因的にプログラムされている機構である可能性が示唆された。

さらに、*in vitro* 培養系においても PcG の蓄積が *Fezf2* を抑制し、V 層ニューロン産生の終了の原因となりうるかを検討するために、PRC1 構成因子 Ring1B のノックアウトを行った。その結果、*in vitro* 初代培養系において、本来 *Fezf2* の転写量が減少し CTIP2 陽性 V 層皮質外投射ニューロンの割合が減少する時期においても、Ring1B ノックアウト細胞では野生型細胞に比較して *Fezf2* の発現が保持されていること、および、CTIP2 陽性ニューロンの産生が続くことが明らかになった。このことから、Ring1B が *Fezf2* の転写抑制および、V 層ニューロン産生期の終了に必要なことが示唆された。

また、Ring1B は PRC1 以外の複合体で機能する可能性も示唆されている。そこで、ポリコーム群複合体が *Fezf2* の転写抑制および V 層ニューロン産生期の終了に重要であるかを検討するため、

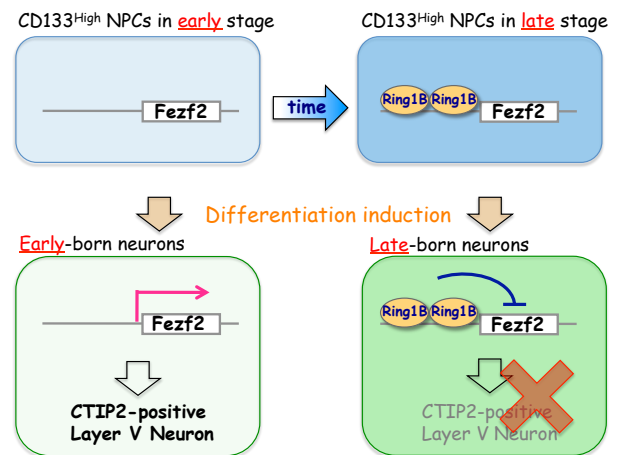


図 3 PcG は *CD133^{High}* 神経系全細胞において *Fezf2* プロモーター領域に蓄積し、分化誘導時に *Fezf2* が発現するか否かを決定する

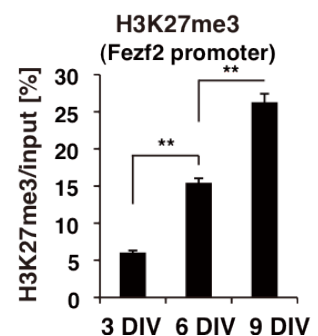


図 4 培養時間依存的に *Fezf2* プロモーター領域でのヒストン H3K27me3 修飾量が増加した。胎生 11 日目マウス大脳新皮質より神経系前駆細胞を採取し、3, 6, 9 日間 *in vitro* 培養 (days in vitro (DIV)) を行った

PRC2 必須構成因子 **Ezh2** のノックアウトを *in vitro* 培養系で行った。その結果、**Ezh2** ノックアウト細胞においても、野生型細胞と比較して **Fezf2** の発現はニューロン分化期後期においても保持され、さらに、**CTIP2** 陽性 **V** 層皮質外投射ニューロンの産生が続いた。従って、*in vitro* 初代培養系において、ポリコーン群複合体が発生時期依存的な **Fezf2** の発現抑制および、**V** 層ニューロン産生期の終了時期を決定していることが示唆された。

以上の結果から、**PcG** が発生の時間依存的に神経系前駆細胞において **Fezf2** プロモーター領域に蓄積し、**Fezf2** の発現を抑制することで **V** 層ニューロン産生の終了時期を決定していることが示唆された。

【考察・課題】

哺乳類大脳新皮質において、神経系前駆細胞が産み出すニューロンの種類を変えるタイミングは厳密に決まっていると考えられる。しかしながら、神経系前駆細胞の具体的な運命転換のメカニズムやそのタイミングの制御機構についてはほとんどわかっていなかった。

本研究において私は発生時期依存的な分化運命転換メカニズムの検討を行い、(1) **Fezf2** 転写量は *in vitro* 培養においても時期依存的に低下すること、(2) **Fezf2**

プロモーター領域でヒストン **H3K27** トリメチル化修飾および **Ring1B** 量が発生時期と共に増加すること、(3) **PcG** 構成因子欠損細胞ではニューロン分化期後期においても野生型と比較して **Fezf2** の発現が保持されていること、(4) またこのときの細胞を分化させるとポリコーン構成因子欠損細胞では野生型細胞と比較して **V** 層ニューロンの産生が延長していることを見いだした。つまり、発生時期依存的に **Fezf2** ローカスにおけるヒストン **H3K27** トリメチル化修飾量が増加し、それをポリコーン群タンパク質認識することで **Fezf2** の発現が抑制され、神経系前駆細胞の分化運命が **V** 層皮質外投射ニューロンから **IV** 層ニューロンへと転換するというモデルを考えている。すなわち、ポリコーン群タンパク質が正しいタイミングで **Fezf2** の発現を抑制することが、**V** 層皮質外投射ニューロン産生が正しいタイミングで終了することに必要であると考えている。本研究により、神経系前駆細胞が時間を計り、産生するニューロンの種類を変える内因性のメカニズムの一端が初めて明らかになった。さらに私たちはすでに、ポリコーン群タンパク質がニューロン分化期からアストロサイト分化期の転換のタイミングも制御していることを報告している (Hirabayashi et al., 2009)。このことから、ポリコーン群タンパク質が、共通のメカニズムで神経系前駆細胞の各分化運命転換のタイミングを担っている可能性は十分にあり得ると考えている。

3. 結言

本研究により、大脳新皮質発生において、神経系前駆細胞の分化運命転換メカニズムの一つが明らかになった。これまで、ニューロン分化期の神経系前駆細胞において産み出すニューロンの種類を変えるメカニズムの報告はほとんどなく、これは非常に新しい発見である。これらの知見は、大脳発生学に留まらず、再生医療という観点からみても、幹細胞を目的の種類のニューロンに分化させる等の技術の進歩に貢献するのではないかと考えている。

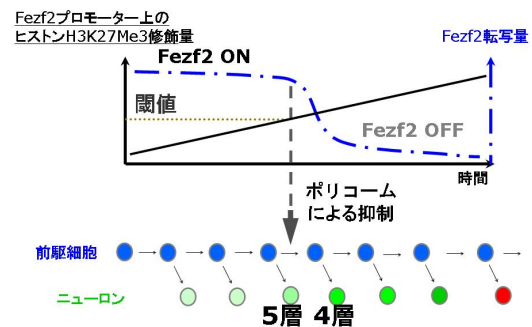


図5 本研究における作業仮説
Fezf2 プロモーター領域において H3K27 トリメチル化修飾量は発生時期と共に増加する。この修飾量が閾値を超え、Fezf2 の発現が抑制されるタイミングが、神経系前駆細胞が産み出すニューロンの種類を変えるタイミングの決定に貢献する。