

研究報告書

「大脳皮質細胞構築における血管発生制御機構の意義」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 4 月～平成 26 年 3 月

研究者: 水谷 健一

1. 研究のねらい

高度で複雑な思考や行動様式を担う大脳皮質は、発生過程において適切な種類の神経細胞を正しい位置に配置し、極めて規則的な細胞構築を完了することで多様な機能の発現を可能にしている。

近年、大脳皮質細胞構築を制御する分子機構を明らかにするために、神経前駆細胞の時間特性・領域特性を決定付ける分子機構の解析が飛躍的に進歩する一方で、発生過程の大脳皮質に存在する「もう一つの幹細胞、血管内皮前駆細胞」の役割については注目されていない。つまり、発生期の大脳皮質発生過程では、神経発生と呼応して、微小血管が定められた場所に、定められた時期に配置されることから、神経前駆細胞-血管内皮前駆細胞間(あるいは分化した内皮細胞)の相互作用、および血管由来の種々の調節因子(供給される酸素や液性因子等)が重要な意義を持つと考えられる。

本研究提案では、神経発生と血管発生のクロストークの可能性に焦点を当て、大脳皮質を構成する神経細胞の分化制御における血管発生、およびこれによって構築される酸素環境の役割を追求することを目的として、次の3つの研究テーマを中心に研究を展開した。

研究テーマ1 「発生期大脳皮質における血管リポーターマウスの解析」

研究テーマ2 「血管発生によって調節される発生期大脳皮質の酸素環境の解析」

研究テーマ3 「PRドメインタンパク質 Prdm8 の解析」

2. 研究成果

(1) 概要

本研究課題では、中枢神経系の血管は、単に成長する神経集団からの酸素や栄養の要求に応答するために受動的に発生するのではなく、時間特性・領域特性を付与された内皮細胞が決まった場所に、決まったタイミングで極めて綿密な分子機構の元にネットワークを構築し、これが様々な神経分化過程の様々な分子機構を制御することで、大脳皮質細胞構築、および回路構築を可能にするとの仮説を元に、研究を展開した。特に、発生過程の大脳皮質実質に形成される“periventricular vessels”のネットワークについては、極めて情報が限られていることから、まず発生期大脳皮質に形成される血管発生を詳細に観察し、これによって見出された分子機構の詳細を追求することで、研究を展開した。

(2) 詳細

研究テーマ1 「発生期大脳皮質における血管リポーターマウスの解析」

哺乳類大脳皮質の実質に形成される微小血管の発生様式に関する知見が極めて乏しいことに着目し、まず、血管リポーターマウス (Flt1-tdsRed BAC tg) を用いて、いつ、どこに大脳皮質実質の血管が形成されるかについて、前後軸・内外側軸に沿った詳細なマッピングを行った (図1)。その結果、①発生期大脳皮質に形成される血管は、解剖学的・発生学的に”pial vessels”と”periventricular vessels”の2種類に分類されるが、前者は軟膜周囲に一様に形成され、マウスでは胎齢9.0日 (E9.0) 前後に既に発生が完了するが、後者はE10.0前後から徐々に腹側から順次、背側に形成され、グラジエントを持った発生様式が観察され、極めて規則的に前後軸・内外側軸に沿って構築されることが確認された。この際、periventricular vessels は極めて規則的に発生し、中間帯 (intermediate zone; IZ) 近傍にまず血管が侵入し、IZ を起点として脳室側へと expand する結果、脳室下帯 (subventricular zone; SVZ) や脳室帯 (ventricular zone; VZ) に血管が構築される一方で、将来の大脳皮質となる皮質板 (cortical plate; CP) への血管は IZ を起点として CP へ expand する血管に加えて、pial vessels から CP へと expand する血管によって、大脳皮質実質の血管構築が極めて規則的に進行することが明らかとなった。②血管リポーターマウスにおけるDsRedの蛍光を指標として、VZ、SVZ、IZ、CPにおけるperiventricular vesselsの密度、方向性、その特徴を詳細に調べたところ、発生期大脳皮質に形成される血管は極めて秩序だった様式によって発生が進行することが見出された (詳細は省略)。これらの発生期大脳皮質における血管発生に関する基礎的知見は、血管発生が神経組織の構築における特徴に対応して極めて規則的に発生することを示唆している (未発表)。

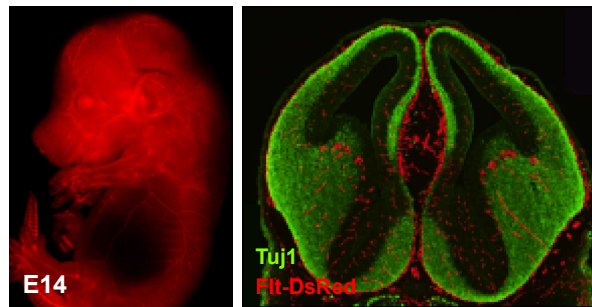


図1 血管リポーターマウスの解析

E14のFlt1-tdsRed BAC tgマウスの蛍光像 (左図) および終脳切片 (右図) の免疫染色画像 (緑色蛍光はTuj1)。腹側から背側へ血管発生が進行し、最初に血管が侵入していく場所はIZ近傍であることが観察される。

研究テーマ2 「血管発生によって調節される発生期大脳皮質の酸素環境の解析」

血管からの拡散により、酸素は組織へと供給されるため、発生期大脳皮質における血管発生の密度や方向性についての規則性は、組織内の酸素濃度や代謝環境に密接に影響を及ぼしていると考えた。まず①マイクロ酸素センサーを用いて、発生期終脳における酸素濃度を定量したところ、大脳皮質組織が5%以下の生理的な低酸素環境に置かれていることを見出した (詳細は省略)。②免疫組織学的な手法を用いて、発生期大脳皮質における低酸素領域を調べたところ、VZの近傍とIZの上部が周囲と比較して血管発生が疎であり、低い酸素濃度環境にあることが確認された。③Hes1プロモーターおよびNeurogenin2プロモーター制御下でルシフェラーゼを発現するベクターを初代神経前駆

細胞に遺伝子導入し、生理的な低酸素環境下で細胞を維持したところ、低酸素環境によって Hes1 の転写活性が亢進する一方で、Neurogenin2 の転写活性が抑制されることが確認された。加えて、④低酸素環境に応答して、神経前駆細胞は活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) の産生を促すことが確認され、分化と共に細胞内の ROS 量が変化することが見出された (詳細は省略)。このように、神経組織で構築される血管発生の特徴に依存して、低酸素領域が形成され、この低酸素領域で促される細胞内の ROS 量が分化運命の決定に重要な役割を果たす可能性が示された (未発表)。

研究テーマ3 「PRドメインタンパク質 Prdm8 の解析」

血管発生が疎になり、比較的 low oxygen に保たれている場として観察された「IZ 上部」で優位に発現する分子の一つとして、PRドメインタンパク質の一種である Prdm8 に着目し、機能解析を行った。①Prdm8 リポーターマウス (Prdm8-mVenus) を作製し、その発現様式を詳細に調べた結果、Prdm8 の発現は IZ 上部で特異的に発現することが確認され、多極性形態の後期および多極性から双極性細胞へと形態変化する時期に優位に発現することが確認された。そこで、②*in utero* エレクトロポレーション法を用いて機能解析を行ったところ、Prdm8 の過剰発現は多極性細胞の維持に働き、

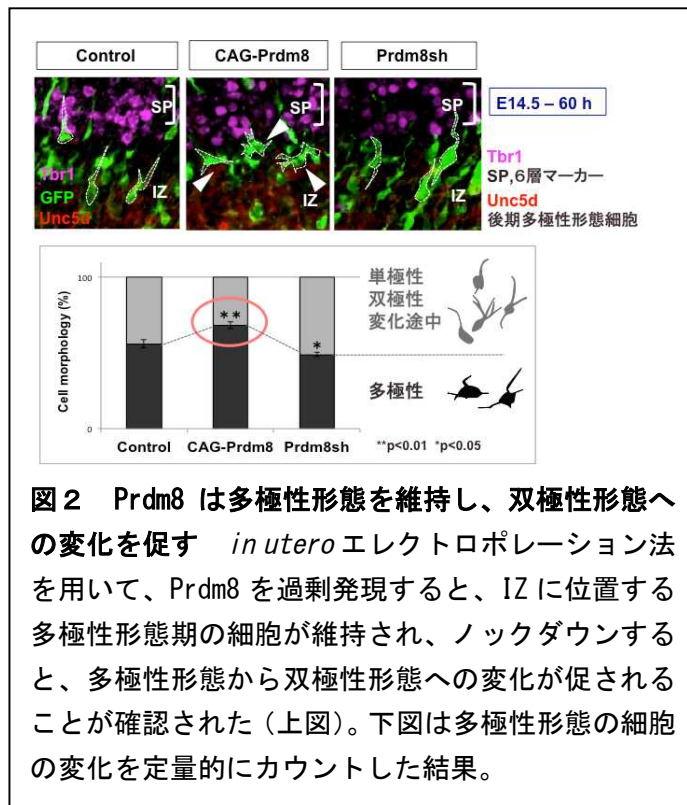


図2 Prdm8 は多極性形態を維持し、双極性形態への変化を促す *in utero* エレクトロポレーション法を用いて、Prdm8 を過剰発現すると、IZ に位置する多極性形態期の細胞が維持され、ノックダウンすると、多極性形態から双極性形態への変化が促されることが確認された (上図)。下図は多極性形態の細胞の変化を定量的にカウントした結果。

て機能解析を行ったところ、Prdm8 の過剰発現は多極性細胞の維持に働き、ノックダウンによって多極性から双極性への形態変化が促されることが見出された (図2)。また、③Prdm8 を発現抑制した細胞は下層ニューロンへと優先的に分化することが明らかとなり、発生期 IZ における形態変化のタイミングが、大脳皮質の層形成に影響を及ぼしうることが見出された。④Prdm8 が大脳皮質の発生機構に及ぼす影響を直接的に調べるために、Cre-loxP システムを利用して Prdm8-null の遺伝子座を持つ ES 細胞を樹立し、ノックアウトマウスを作製した。その結果、Prdm8 ノックアウトマウスでは同様に多極性から双極性への形態変化の異常が観察された (Inoue et al., *PLoS ONE* 2014)。更には、⑤ChIP-シーケンスによるゲノムワイドな結合能力の評価により、Prdm8 が上層ニューロン特異的に発現する Satb2、Cux1、Unc5d などの遺伝子座と結合しうることが明らかとなった。加えて、⑥Prdm8-mVenus マウスを用いたマイクロアレイ解析によって、ターゲット遺伝子を解析したところ、セマフォリン、ネトリン、エフリンなどのガイダンス分子が Prdm8 によって発現制御されていることが見出された。こ

これらのガイダンス分子は、神経系の軸索伸長、形態変化、細胞移動と密接に関与する一方で、血管系の発生にも密接に関与することが報告されている(Melani and Weinstein, *Annu Rev Cell Dev Biol* 2010)。実際、⑦Prdm8 ノックアウトマウスの血管発生を観察したところ、顕著な発生異常が観察されたことから(未発表)、発生期大脳皮質における神経系と血管系の相互依存的な関連性が、大脳皮質の細胞構築に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

3. 今後の展開

大脳皮質における血管発生の規則性と、これによって構築される低酸素領域および ROS の役割の一端が本研究によって明らかとなった。今後、血管発生における規則性が、如何なる分子機序を介して構築され、これが如何なる生理的な意義を果たすのかについて、更に追求していきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

大脳皮質を構成するニューロンは、発生過程の脳室帯に存在する神経前駆細胞によって生み出され、生み出された細胞集団の多くは中間帯で一過的に多極性形態を獲得し、その後双極性形態へと再び形態変化して脳表面に向かって移動した後、皮質板の内部で最終分化を遂げる。このように、必要な数のニューロンが生み出された後、それらの細胞が正しい分化・移動過程を経て、機能を発揮すべき最終目的地に到達することは、正常な脳の構築・機能発現において最も基盤となる細胞挙動と考えられている。実際、中間帯における多極性形態細胞の分化過程の異常が、様々な神経変性疾患の発症と深くかかわることが明らかとなり、大脳皮質の細胞構築における中間帯の役割が注目されている。本研究によって、多極性形態期を制御する分子機序の一端が明らかとなり、これが血管発生の特徴やこれによって形成される酸素環境によって調節されている可能性が示され、今後さらに神経系と血管系の発生を取り次ぐ分子機序の詳細が解明されることが期待される。

(2) 研究総括評価

発生初期の神経組織における血管内皮(前駆)細胞と神経細胞の分化・移動との関係は重要であるが研究が進んでいない分野である。本研究では発生期のマウス大脳皮質を材料とし局所の酸素環境に着目して解析を進めたものである。大脳皮質組織への血管の侵入を血管レポーターマウスを用いて詳細に調べたところ、その中間層が血管網形成の一つの要となっていることを見出したことは興味深い。さらにマイクロ酸素センサーや免疫組織学的方法による解析を経て、中間層の上部が比較的低酸素環境にあると考え、また神経前駆細胞における活性酸素種(ROS)が鍵を握っていると想定しているが、そこから神経細胞の移動等神経回路構築への関係については今後の解析が待たれる。一方、発生期の大脳皮質中間層の神経細胞で発現する転写因子 Prdm8 が遊走途上の神経細胞の形態を制御していることを明らかにした研究は論文発表した。今後、血管からのシグナルは酸素濃度だけで説明できるかなどを含めて血管系が神経発生に果たす役割がより明確になることが期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Mayuko Inoue, Takao Kuroda, Aya Honda, Mariko Suzuki-Komabayashi, Tae Komai, Yoichi Shinkai, and Ken-ichi Mizutani. Prdm8 regulates the morphological transition at multipolar phase during neocortical development. PLoS ONE. 2014, 9, e86356.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- [1] 井上 真悠子、黒田 貴雄、加藤 雅紀、眞貝 洋一、水谷 健一「神経特異的 PR ドメインタンパク質 Prdm8 は大脳皮質神経発生を調節する」、日本神経科学会、2013年6月20日、京都
- [2] 井上 真悠子、黒田 貴雄、加藤 雅紀、駒井 妙、眞貝 洋一、水谷 健一「Prdm8は発生期大脳皮質において多極性形態期を調節する」、日本分子生物学会、2013年12月4日、神戸
- [3] Mayuko Inoue, Yoichi Shinkai, Ken-ichi Mizutani「Role of PR domain protein Prdm8 in neocortical development」、Neuroscience 2013、2013年11月13日、アメリカ サンディエゴ
- [4] Ken-ichi Mizutani, Mayuko Inoue, Yoichi Shinkai「Prdm16 contributes critically to the fate of neural progenitors by regulating the multipolar phase」、Neuroscience 2013、2013年11月13日、アメリカ サンディエゴ