42　中枢神経系の細胞の量的比率と器官サイズの制御機構	笹井　紀明

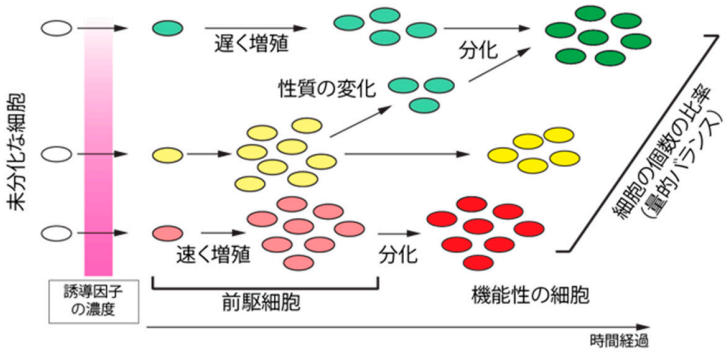
【目的】脊椎動物の中枢神経系には極めて多様な細胞が適切な量的バランス（細胞数の比率）をもって配置されている。これは、発生段階において生じる各神経前駆細胞の増殖や分化が、細胞内外のメカニズムによって制御されているからである。（下図）はその様子を概念的に示したもので、未分化な細胞が細胞外因子（誘導因子と呼ばれるもの）によって大まかに性質を付与されて「前駆細胞」となり、それらが固有の増殖スピードまたは分化のタイミングをもって特定の機能を獲得していく様子を表している。本研究は、そのメカニズムの一端を知る目的で、ソニック・ヘッジホッグ（Sonic Hedgehog: Shh）シグナルと神経前駆細胞の分化の関連について明らかにすることを目的とした。

Shh は分泌因子の１つで、神経分化・増殖、四肢の発生など多様な生物学的活性を持つ。一方、Shh を受ける細胞の反応は様々だが、特に神経前駆細胞が Shh シグナルに暴露されるといったん細胞内活性が上昇し、その後フィードバック効果によって細胞内活性が減弱化していく。この減弱にかかる時間（半減期）の違いが細胞の分化方向を決定していると考えられている。本研究では、このフィードバックに関与する遺伝子を同定してその機能を解析することにより、領域ごとの量的バランスを司るメカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

【方法】ニワトリ胚の神経前駆細胞塊に異なる濃度の Shh を作用させ、反応して発現が上昇する遺伝子を網羅的に単離した。その後 in situ ハイブリダイゼーションを用いて発現領域を確認した。次に、候補遺伝子を神経管内で強制発現し、パターン形成に対する影響を抗体染色によって解析した。また、si-RNA を同じく神経管に導入して機能喪失実験を行なった。さらに、マウス胚性幹細胞（ES 細胞）の神経分化システムを利用して、ニワトリ胚と同様のことが起こっているかを検証した。

【結果】本スクリーニングから、G タンパク質共役受容体 GPR17 がこのフィードバックを制御することがわかった。GPR17 遺伝子の発現は Shh シグナルによって誘導される一方、GPR17 をあらかじめ強制発現した細胞では Shh シグナルを阻害した。また、si-RNA を用いた実験から、神経管の腹側領域（Shh によって影響を受ける領域）が異常拡大することも明らかになった。さらに、マウス胚性幹細胞（ES 細胞）の神経分化系を用いて、ニワトリ胚同様に GPR17 が Shh シグナルに対して負の作用を持つことが明らかになった。Shh シグナルの継続的な活性化は細胞にがん化を引き起こすこともあるため、本研究は前駆細胞の分化タイミングを制御するメカニズムの一端を明らかにしたものとして重要である。

未分化細胞（白の丸印）が一定の量的比率を持った機能性細胞へ分化していく概念図



42. 中枢神経系の細胞の量的比率と器官サイズの制御機構

笹井　紀明

*奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 発生医科学研究室

Key words：中枢神経系，発生生物学，脊椎動物，量的バランス，器官構築

緒　言

緒言 – 多様な細胞が量的にバランスのとれた組織を構築するしくみ

個体が持つ脳、心臓、肝臓、肺などの各器官はそれぞれ、多様な細胞からなる集合体である。例えば神経系には、運動神経、介在神経、感覚神経はもちろんのこと、その細胞を補助するオリゴデンドロサイトやアストロサイトなどのグリア細胞などが存在する。これらの細胞はすべてが神経系を構成するために不可欠であるだけでなく、それぞれの細胞が一定の比率を持って器官内に配置され、さらにその細胞総数は個体に合った数で体内に存在しなければならない。このためには、個体の発生段階において、各前駆細胞の増殖や分化がバランスよく制御される必要がある。このバランスが崩壊すると、腫瘍形成や器官形成不全が引き起こされ、胚発生や胎児の発達に重大な影響を及ぼす。したがって、前駆細胞の性質や増殖能、その分化のバランスを制御するメカニズムを知ることは、器官構築の原理を理解する上でも病因解明の上でも重要である。本研究の目的は、器官内にある様々な性質の神経細胞が正確な量的バランスを持ち、かつ特定のサイズに成長する制御機構を知ることであり、そのモデル系として、中枢神経系の発生を扱う。

発生過程において、未分化な細胞は誘導因子（分泌性のシグナル分子）に暴露されることによって大まかに運命が決定され、特定の性質を持った前駆細胞へと変化する。この前駆細胞はまだ機能は持たないが、増殖能を持ち、性質を変化させることもある（図１）。この後、前駆細胞は分化して増殖能を失い、固有の機能を獲得する。前駆細胞の量的・質的な柔軟性に比べ、分化した各種の機能的細胞の量比には個体差はほとんどない。これは、前駆細胞の増殖と分化のバランスが細胞内外の制御機構によって厳密にコントロールされているからである。

最近、個体や器官サイズの決定機構に関する研究が様々なモデル動物で行われるようになった。これらの研究においては、分泌性のシグナル因子の安定性や濃度勾配の形成メカニズムに主眼が置かれ、器官の大きさが異なっても相似形を保持する機構が解析されている ［1，2］。しかし、器官を構成する各細胞の性質に着目し、その性質の変化に焦点を当てた研究は現在のところほとんど存在しない。また、細胞の分化や増殖は、胚発生期に発現するがん関連遺伝子やエピゲノム因子によって制御されていることが示唆されているが、これが器官全体の構築にどのような影響を及ぼすのかについての知見は少ない。

そこで私たちは、分化誘導因子の１つであるソニック・ヘッジホッグ（Shh）が神経管のパターン形成に果たす役割に着目し、Shh によって発現誘導される因子を網羅的発現解析によって同定し、その中から Shh シグナル強度の経時的な変化を制御するものを、前駆細胞から神経細胞への分化のタイミングを決定する因子を単離することにした。本報告書では、その解析結果を報告することとする。

方　法

本実験では主にニワトリ胚とマウス ES 細胞を用いた。ニワトリ胚は城山鶏園（神奈川県）より購入した。

ネガティブフィードバックを制御する因子の単離のため、ニワトリ胚の神経前駆細胞塊に異なる濃度の Shh を作用させ、反応して発現が上昇する遺伝子を網羅的に単離した。その後 in situ ハイブリダイゼーションを用いて発現領域を確認した。次に、候補遺伝子を神経管内で強制発現し、パターン形成に対する影響を抗体染色によって解析した。また、si-RNA を同じく神経管に導入して機能喪失実験を行った。Shh シグナルに対する活性の評価は、Gli 結合領域に

*現在の所属：奈良先端技術大学院大学 先端科学技術研究科 バイオサイエンス領域

よって発現が誘導されるルシフェラーゼコンストラクト（Gli-Binding Site- Luciferase; GBS-Luc）を利用した。

ES 細胞の運動神経への分化は、Kutejova の方法によった ［3］。ES 細胞を単層培養とし、培養 3 日目からレチノイン酸と SAG（ソニック・ヘッジホッグのアゴニスト）を加えてさらに 3 日間培養し、抗体染色、in situ ハイブリダイゼーション並びに定量 PCR によってその発現量や分布を解析した。

結　果

1. Shh シグナルによって、G タンパク質共役受容体 GPR17 の発現が誘導された

本研究では、Shh シグナルによって発現が誘導される因子を、報告者の以前の論文 ［4］ も参考にして抽出し、定量 PCR と in situ ハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行ってその活性を調べた。その結果、G タンパク質共役受容体の 1 つ GPR17 の発現が Shh シグナルによって誘導されることが明らかになった（図 2A）。また、培養細胞 NIH3T3 細胞に GPR17 を強制発現すると、Shh シグナルがブロックされ、Shh のターゲット遺伝子である Ptc1 や Gli1 の発現量が減少した。したがって、GPR17 は Shh シグナルによって発現が誘導され、かつそのシグナルをブロックする、いわゆる「負のフィードバック調節因子」であることが示唆された。

2. si-GPR17 によって腹側神経管領域が拡大した

次に、ニワトリ胚の神経管に GPR17 の発現をブロックする siRNA（si-GPR17）を導入した。その結果、si-GPR17 が導入された神経管において、腹側神経領域 (Shh シグナルの影響を強く受ける領域) が大きく拡大した。このことは、Shh シグナルが異常に細胞内に導入されることを示している。また Shh の細胞内シグナルは、経時的にはいったん強く活性化された後徐々に減弱する。そこで、神経前駆細胞の Shh シグナルの経時的変化を、対照細胞と si-GPR17 導入細胞で比較した。その結果、si-GPR17 が導入された細胞では負のフィードバックが弱められており、その結果腹側神経領域の拡大につながっていることが明らかになった（図 2B）。このことは、負のフィードバック制御が細胞運命の決定に必須の役割を果たすことを意味している。

3. マウス ES 細胞の神経分化システムにおいても GPR17 が Shh シグナルに対して負の効果を持つ

以上の結果が他の脊椎動物でも見られるかを検証する目的で、マウス ES 細胞から運動神経を分化させ、GPR17 の効果を調べた。その結果、si-GPR17 を導入した細胞で運動神経が正常に分化せず、より腹側に位置する p3 介在ニューロン前駆細胞が多数分化することが明らかになった。このことは、si-GPR17 導入細胞内で、Shh シグナルをより多く必要とする p3 領域が分化したことを表す。したがって、GPR17 は種を超えて Shh シグナルに負のフィードバック効果を持つことが明らかになった。

考　察

これまで、「モルフォゲン」と呼ばれるシグナル因子は、濃度依存的に複数のタイプの細胞の分化が誘導されることが知られてきた ［5］ が、筆者らの近年の研究から、Shh シグナルがネガティブフィードバックによって経時的に変化し、そのネガティブフィードバックが神経分化のタイミングを決定することが示唆された ［6］。これまでの研究から、Shh シグナルが細胞内で恒常的に活性化されると、神経分化が抑制され、前駆細胞の増殖が止まらなくなることが示されている［7］。実際に細胞内で Shh シグナルが継続的に活性化されると、細胞によってはがん化する（増殖状態が）ことが知られており、今回の結果はそのメカニズムの一端を示したものとして重要である。今後、GPR17 のアゴニストまたはアンタゴニストを利用した実験により、神経分化のタイミングや Shh シグナルの強度への影響を調べ、脱髄（グリア細胞異常）への影響や抗がん剤開発の研究へとつなげていきたい。［8, 9］。

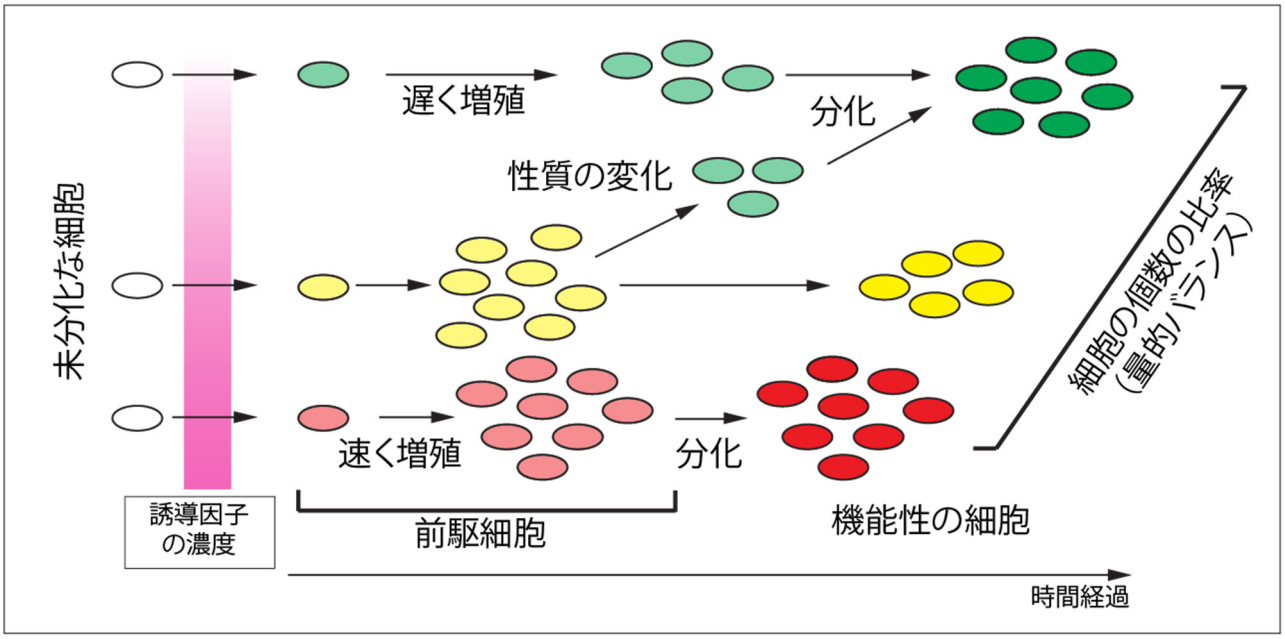


図 1. 未分化細胞（白の丸印）が機能性細胞へと分化し、一定の量的比率を持った期間が構築されていく様子を表した概念図

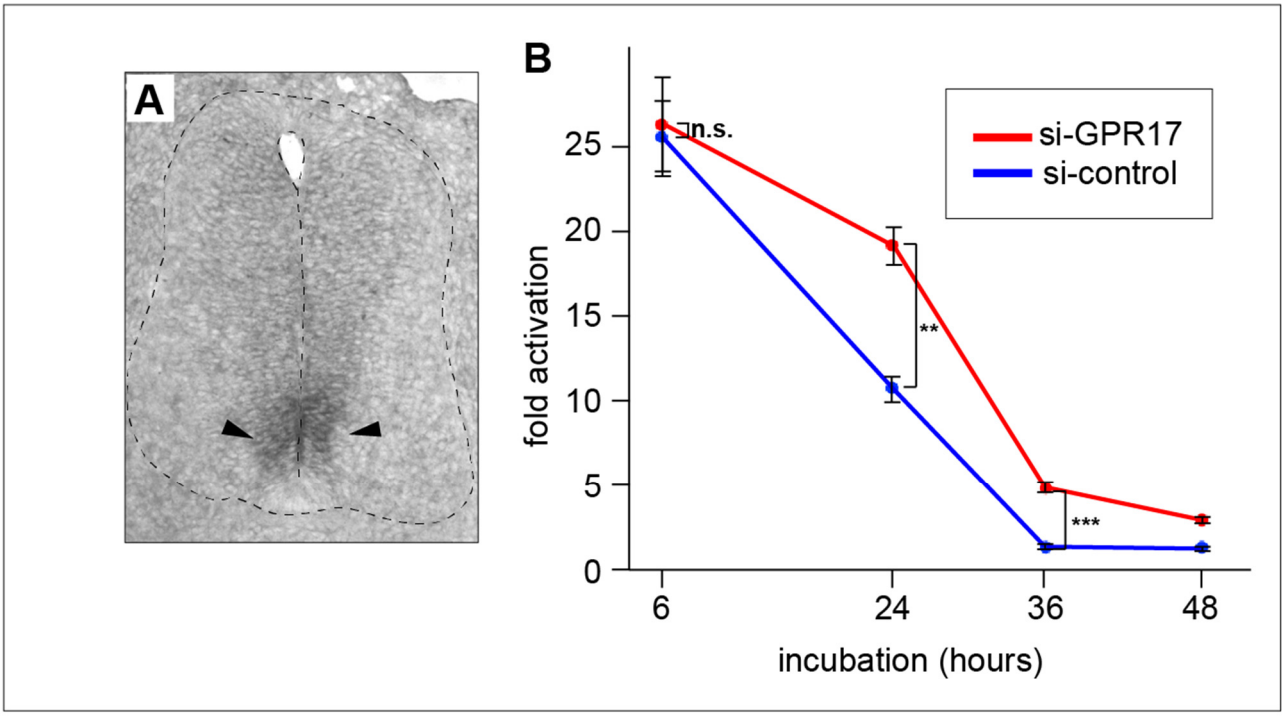


図 2. GPR17 の単離と、Shh シグナルの負のフィードバックへの影響

（A）図に示したのは神経管の断面図で、GPR17 の in situ ハイブリダイゼーションの結果である。GPR17 は運動神経前駆細胞を中心に発現している。（B）GPR17 が Shh 強度に及ぼす影響。神経前駆細胞に GBS-Luc と si-control または si-GPR17 を GBS-Luc と共に導入し、その後 Shh を作用させた。その細胞内シグナル強度（ルシフェラーゼの活性）を経時的に評価した。si-GPR17 を作用させた細胞でフィードバックが一部阻害されているのがわかる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、北海道大学遺伝子病制御研究所・近藤亨教授、筑波大学医学医療系・松尾–高崎真美助教である。

文　献

1) Uygur A, Young J, Huycke TR, Koska M, Briscoe J, Tabin CJ. “Scaling pattern to variations in size during development of the vertebrate neural tube”. Dev. Cell (2016) 37, 127–135. doi: 10.1016/i.devcel.2016.03.024
2) Inomata H. “Scaling of pattern formations and morphogen gradients”. Dev. Growth Diff. (2017) 59, 41-51.PMID: 28097650
3) Kutejova E, Sasai N, Shah A, Gouti M, Briscoe J. “Neural progenitors adopt specific identities by directly repressing all alternative progenitor transcriptional programs”. Dev Cell. (2016) 21, 639-653. PMID: 26972603
4) Sasai N, Kutejova E, Briscoe J. “Integration of Signals along Orthogonal Axes of the Vertebrate Neural Tube Controls Progenitor Competence and Increases Cell Diversity”. PLoS Biology (2014) 12, e1001907. PMID: 25026549
5) 笹井紀明（2018）脳科学辞典「位置情報」https://bsd.neuroinf.jp/wiki/位置情報
6) Dessaud E, Ribes V, Balaskas N, Yang LL, Pierani A, Kicheva A, Novitch BG, Briscoe J, Sasai N. “Dynamic assignment and maintenance of positional identity in the ventral neural tube by the morphogen sonic hedgehog”. PLoS Biol. (2010) 8, e1000382. PMID: 20532235
7) Stamataki D, Ulloa F, Tsoni SV, Mynett A, Briscoe J. “A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube.” Genes and Dev. (2005) 19, 626-641. doi: 10.1101/gad.325905
8) Peco E, Escude T, Agius E, Sabado V, Medevielle F, Ducommun B, Pituello F. “The CDC25B phosphatase shortens the G2 phase of neural progenitors and promotes efficient neuron production”. Development (2012) 139, 1095-1104. doi: 10.1242/dev.068569
9) Gupta S. “Targeting the Hedgehog pathway in cancer”. Ther Adv Med Oncol. (2010) 2, 237–250. PMID: 21789137