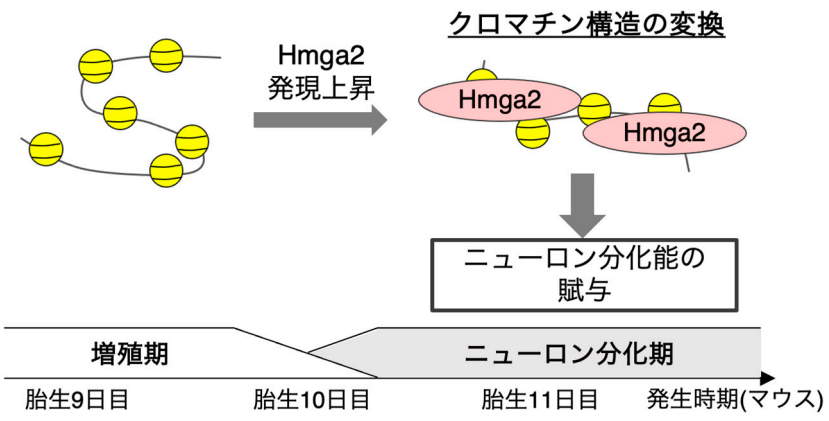
139　神経幹細胞のニューロン分化開始メカニズムの解明	岸　雄介

【目的】我々の高次脳機能をつかさどる大脳新皮質において主要な働きを担うニューロンのほとんどは、発生期に神経幹細胞から産生される。神経管閉鎖後、神経幹細胞は神経上皮細胞とも呼ばれ対称分裂にて一つの神経幹細胞が二つの神経幹細胞を産生し自己増殖を繰り返すことでその数を増やす。この増殖期のあと、神経上皮細胞は放射状グリア細胞となり、一つの神経幹細胞が一つの神経幹細胞と一つのニューロン前駆細胞を産生する非対称分裂によりニューロンを産生するニューロン分化期に移行する。神経幹細胞の増殖期からニューロン分化期への運命転換のタイミングは、最終的に産生される分化細胞の数を決定するため、成体における脳機能の獲得に重要であると考えられる。しかしながら、神経幹細胞がどのようにして増殖期から運命転換し、ニューロン分化を開始するか、という制御機構は、これまであまり明らかになってこなかった。

【方法】増殖期神経幹細胞の運命制御機構を明らかにするために、増殖期神経幹細胞に遺伝子導入を行う新規手法を開発した。また、網羅的遺伝子発現解析を行うことで、運命制御候補因子を挙げ、開発した新規遺伝子導入法と免疫染色などを組み合わせて機能解析を実施した。

【結果】私たちは新たに確立した増殖期神経幹細胞への遺伝子導入法を活用して、神経幹細胞のニューロン分化開始を担う遺伝子の同定を目指した。まずその候補遺伝子を挙げるために網羅的遺伝子発現解析を行った。E8 から E12 まで、1 日ごとに神経幹細胞を回収し RNA-seq を行った。その結果、この時期で発現が変化する数千遺伝子が検出された。私たちは、その中でも神経幹細胞がニューロン分化を開始するタイミングである E10 で一過的に発現が上昇する 284 個の遺伝子群の中に、神経幹細胞のニューロン分化開始を促進する遺伝子があると考えた。これらのうち発現量が高い遺伝子を調べると、クロマチン因子 *Hmga2* (high-mobility group, AT-hook 2) 遺伝子が含まれていることがわかった。*Hmga2* はこれまでの研究でニューロン分化期においてニューロン分化能を担う遺伝子として知られていたが、ニューロン分化開始における役割は不明であった。次に Hmga2 のノックダウンウィルスを E8 の胎児に導入しその影響を調べた。遺伝子導入したニューロン分化期に入った直後の E11 の胎児を回収して組織切片を作製し、早期ニューロンマーカーである Tbr2 による染色でニューロン分化を調べた。すると、Hmga2 のノックダウンにより Tbr2 陽性細胞が減少することがわかった。一方で、神経幹細胞マーカーSox2 陽性細胞の数は変化しなかったこの結果は、Hmga2 がニューロン分化の開始に必要であることを示唆する一方で、Hmga2 がニューロン分化期の神経幹細胞にてニューロン分化を促進している可能性もある。よって Hmga2 がノックダウンされた神経幹細胞の遺伝子発現パターンを RNA-seq によって調べた。その結果、Hmga2 をノックダウンするとより早期の神経幹細胞で発現が高い遺伝子の発現が増加することがわかった。すなわち、神経幹細胞の遺伝子発現パターンがより早期のそれに近づくことがわかった。以上の結果から私たちは、Hmga2 は神経幹細胞のニューロン分化開始を促進する因子であると考えた。

Hmga2 の発現上昇により神経幹細胞はニューロン分化を開始する



139. 神経幹細胞のニューロン分化開始メカニズムの解明

岸　雄介

東京大学 大学院薬学系研究科 分子生物学教室

Key words：神経幹細胞，ニューロン分化，Hmga2，子宮内遺伝子導入

緒　言

我々の高次脳機能をつかさどる大脳新皮質において主要な働きを担うニューロンのほとんどは、発生期に神経幹細胞から産生される［1，2］。神経管閉鎖後、神経幹細胞は神経上皮細胞とも呼ばれ対称分裂にて一つの神経幹細胞が二つの神経幹細胞を産生し自己増殖を繰り返すことでその数を増やす。この増殖期のあと、神経上皮細胞は放射状グリア細胞となり、一つの神経幹細胞が一つの神経幹細胞と一つのニューロン前駆細胞を産生する非対称分裂により、ニューロンを産生するニューロン分化期に移行する。本稿では神経上皮細胞と放射状グリア細胞の両方を、大脳新皮質を形成するもととなる細胞として神経幹細胞と呼ぶ。

神経幹細胞の増殖期からニューロン分化期への運命転換のタイミングを正しく制御することは成体における脳機能に重要であると考えられる。なぜなら、もし神経幹細胞の増殖期が細胞周期 1 回分長くなってしまうと、神経幹細胞の数が 2 倍になり、そうするとその後の非対称分裂で産生されるニューロンの数も 2 倍になってしまうかもしれない。これは極端な例であるが、例えば大頭症や小頭症は様々な精神疾患と関係していることが知られており［3］、神経幹細胞の数、ひいてはそこから産生されるニューロンの数は脳機能に直結する重要な制御点であると考えられる。しかしながら、神経幹細胞がどのようにして増殖期から運命転換し、ニューロン分化を開始するか、という制御機構は、これまであまり明らかになってこなかった。

この制御機構が研究されてこなかった理由の一つには、技術的な問題があった。ニューロン分化期以降の神経幹細胞の運命制御メカニズムについてはこれまでによく調べられてきているが、その多くの研究では野生型マウスの胎児の神経幹細胞に直接遺伝子導入することができる子宮内実験が用いられている［4］。これは、子宮内の胎児の脳室にウィルスベクターを注入したり、プラスミド DNA を注入したりしてエレクトロポレーションを行って脳室面に存在する神経幹細胞に直接遺伝子を導入する方法である。これにより作製や解析に時間のかかる遺伝子改変マウスを用いることなく簡便に遺伝子の機能を調べることができる。しかし、この手法はマウス胎児の脳が子宮外から目視で確認でき、キャピラリーによる注入が可能な胎生 11 日（embryonic day 11：E11）以降である。神経幹細胞がニューロン分化を開始するのはマウスの大脳新皮質だと E10 前後なので、増殖期からニューロン分化期への移行を調べるために子宮内実験を適用するのは難しかった。

方　法

1. 神経管閉鎖前神経幹細胞への遺伝子導入

本研究ではまず、これまでに簡便な方法がなかった野生型の神経管閉鎖前の遺伝子導入法の開発を行った。神経管閉鎖前の神経幹細胞は羊水に面しているため、羊水にウィルスベクターを注入すれば遺伝子導入が可能なのではないかと考えた。そこで、E7.0 あるいは E8.0 の妊娠マウスを麻酔にて眠らせたのち子宮を取り出した。光ファイバーケーブルを用いてその光を当てると子宮内部の構造が浮かび上がる（図 1a）［5］。その中心部にガラスキャピラリーを用いて GFP を発現するウィルスベクターを注入した。また、mCherry を発現するプラスミドベクターを注入してエレクトロポレーションも行った。その後、子宮を腹腔内に戻し、皮膚を縫合し、発生を進めた。

その結果、いずれの方法を用いても神経幹細胞に遺伝子導入し GFP でラベルすることに成功した（図 1b）[6, 7]。これまでに同様の目的で超音波顕微鏡を用いた遺伝子導入が行われていたが、この報告では胎児の多く（54 匹中 41 匹）が死亡するか発生異常を示していた。一方、本研究で開発した方法では 89%の胎児が生存し、74%の胎児で GFP の発現が確認できた。すなわち、高価な機器を用いることなく、実験の効率を上昇させることに成功した。

2. 増殖機からニューロン分化期にかけての網羅的遺伝子発現解析

E8 と E9 の大脳全体、あるいは E10 から E12 までの大脳新皮質を実体顕微鏡下にて切り出し、パパインを含む分散液で分散した。その後、神経幹細胞マーカーである CD133 に対する蛍光ラベルされた抗体にて免疫染色を行い、FACS（fluorescence activated cell sorting）にて CD133 強陽性細胞を回収した。その後、細胞から RNA を抽出し、逆転写、DNA 末端へのアダプター付加、増幅を行うことで RNA-seq ライブラリを調製した。そして、高速シークエンサーにてシークエンス解析を実施した。得られたリードをマウスゲノムにマッピングし、それぞれの遺伝子領域にマップされたリードをカウントし、遺伝子の発現量を定量した。

3. Hmga2 のノックダウンと免疫染色

1 で開発した新規遺伝子導入法を用いて Hmga2 のノックダウンウィルスベクターを E8 の神経幹細胞に導入した。その後 E10 あるいは E11 まで発生を進め、胎児を回収、固定、包埋し、凍結切片を作製した。凍結切片を遺伝子導入マーカーGFP、神経幹細胞マーカーSox2、ニューロン分化マーカーTbr2 と、DNA 染色試薬 Hoechst で染色し、蛍光共焦点顕微鏡にて観察した。

結　果

1. Hmga2 の発現が増殖期からニューロン分化期への転換期である E10 で一過的に増加した

私たちは新たに確立した増殖期神経幹細胞への遺伝子導入法を活用して、神経幹細胞のニューロン分化開始を担う遺伝子の同定を目指した。まずその候補遺伝子を挙げるために網羅的遺伝子発現解析を行った。E8 から E12 まで、1 日ごとに神経幹細胞を回収し RNA-seq を行った［6, 7］。その結果、この時期で発現が変化する数千遺伝子が検出された。私たちは、その中でも神経幹細胞がニューロン分化を開始するタイミングである E10 で一過的に発現が上昇する 284 個の遺伝子群の中に、神経幹細胞のニューロン分化開始を促進する遺伝子があると考えた。これらのうち発現量が高い遺伝子を調べると、クロマチン因子 *Hmga2*（high-mobility group, AT-hook 2）遺伝子が含まれていることがわかった。*Hmga2* はこれまでの研究でニューロン分化期においてニューロン分化能を担う遺伝子として知られていたが［8］、ニューロン分化開始における役割は不明であった。

2. Hmga2 をノックダウンするとニューロン分化期の開始が遅延した

次に Hmga2 のノックダウンウィルスを E8.0 の胎児に導入しその影響を調べた。遺伝子導入したニューロン分化期に入った直後の E11.0 の胎児を回収して組織切片を作製し、早期ニューロンマーカーである Tbr2 による染色でニューロン分化を調べた［6, 7］。すると、Hmga2 のノックダウンにより E11.0 における Tbr2 陽性細胞が減少することがわかった（図 1c、d）。

一方で、神経幹細胞マーカーSox2 陽性細胞の数は変化しなかったこの結果は、Hmga2 がニューロン分化の開始に必要であることを示唆する一方で、Hmga2 がニューロン分化期の神経幹細胞にてニューロン分化を促進している可能性もある。よって Hmga2 がノックダウンされた神経幹細胞の遺伝子発現パターンを RNA-seq によって調べた［6, 7］。その結果、Hmga2 をノックダウンするとより早期の神経幹細胞で発現が高い遺伝子の発現が増加することがわかった。すなわち、神経幹細胞の遺伝子発現パターンがより早期のそれに近づくことがわかった。以上の結果から私たちは、Hmga2 は神経幹細胞のニューロン分化開始を促進する因子であると考えた（図 2）。

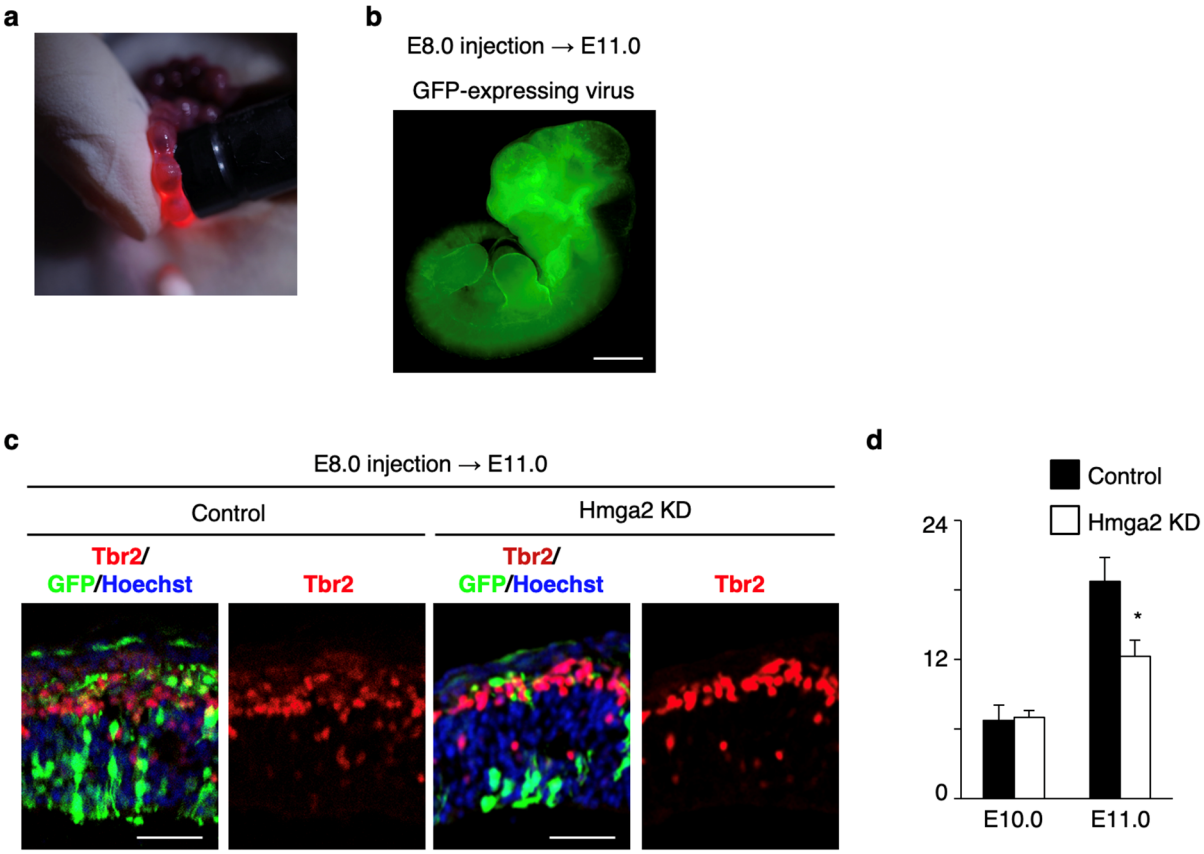


図 1. 増殖期神経幹細胞への新規遺伝子導入法の確率と、Hmga2 の機能解析

a) E8 の子宮を光ファイバーケーブルで照らし、内部構造を可視化した。

b) E8.0 に GFP 発現ウィルスを遺伝子導入し、E11.0 にて実体蛍光顕微鏡下で観察した。Scale bar：1 mm。

c、d) E8.0 にコントロールあるいは Hmga2 ノックダウンウィルスを遺伝子導入し、E10.0 あるいは E11.0 にて切片を作製した。その後、GFP と Tbr2 を免疫染色し、また Hoechst にて DNA を染色した（c）。Scale bar：50 μm。GFP 陽性細胞中の Tbr2 陽性細胞の数を定量した（d）。平均値＋SEM。*p<0.05（Student's t-test）。

いずれも Kuwayama ら［6］より転載。

考　察

以上のように、これまで不明な点が多かった神経幹細胞のニューロン分化開始のメカニズムについて、Hmga2 の関与を明らかにすることができた（図 2）。Hmga2 はクロマチン因子であることから、神経幹細胞のニューロン分化開始においてはクロマチン構造の制御が重要な役割を果たすことを示唆している。一方で、増殖期からニューロン分化期にかけての神経幹細胞におけるクロマチン構造の転換については、得られる細胞数の制限などが原因で未だ不明である。近年発達している少数細胞での非ゲノム情報の解析技術である、クロマチンのオープン具合を調べる ATAC-seq (assay for transposase-accessible chromatin sequencing) や、ヒストン修飾や転写因子の結合を調べる CUT&RUN (cleavage under targets and release using nuclease) や CUT&Tag (cleavage under targets and tagmentation)、ChIL (chromatin integration labelling) などの手法を用いることで、今後明らかにされていくだろう。これらの解析に単一細胞 RNA-seq などの網羅的遺伝子転写解析が加わることで、神経幹細胞の運命転換におけるクロマチン構造変換の重要性と、その分子メカニズムを包括的に明らかにすることができると期待される。

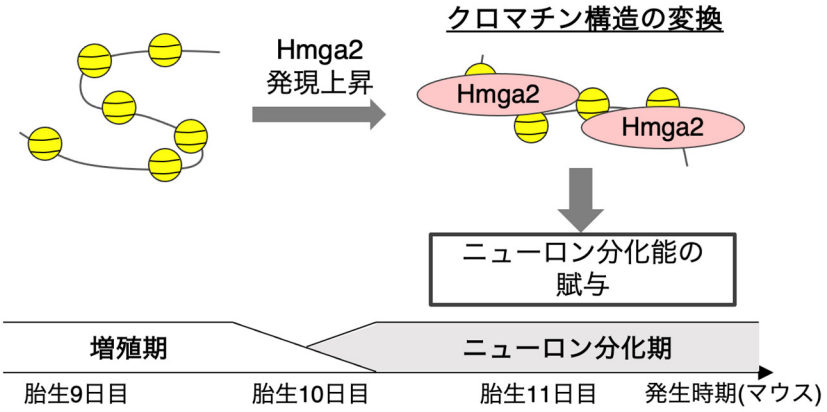


図 2. Hmga2 の発現上昇により神経幹細胞はニューロン分化を開始する
岸ら［7］を改変。

共同研究者・謝辞

本研究は、東京大学大学院薬学系研究科分子生物学教室の後藤由季子教授と桑山尚大氏と共に実施した。また、その他の分子生物学教室の構成員には多大なるご支援をいただいた。この場を借りて深くお礼申し上げる。

文　献

1) Nakagawa, T., Wada, Y., Katada, S., Kishi, Y., 2020. Epigenetic regulation for acquiring glial identity by neural stem cells during cortical development. Glia 14, 67–14. PMID:32163194 doi:10.1002/glia.23818
2) Hirabayashi, Y., Gotoh, Y., 2010. Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. Nat Rev Neurosci 11, 377–388. PMID: 20485363 doi:10.1038/nrn2810
3) Sun, T., Hevner, R.F., 2014. Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations. Nat Rev Neurosci 15, 217–232. PMID:24646670 doi:10.1038/nrn3707
4) Tabata, H., Nakajima, K., 2001. Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: visualization of neuronal migration in the developing cortex. Neuroscience 103, 865–872. PMID:11301197 doi:10.1016/s0306-4522(01)00016-1
5) Matsui, A., Yoshida, A.C., Kubota, M., Ogawa, M., Shimogori, T., 2011. Mouse in utero electroporation: controlled spatiotemporal gene transfection. J Vis Exp. PMID:21860382 doi:10.3791/3024
6) Kuwayama N, Kishi Y, Maeda Y, et al. In utero gene transfer system for embryos before neural tube closure reveals a role for Hmga2 in the onset of neurogenesis. *bioRxiv*. 2020;125:2020.05.14.086330. doi:10.1101/2020.05.14.086330.
7) 岸雄介, 桑山尚大, 2020. 新規遺伝子導入法による神経幹細胞のニューロン分化開始メカニズムの解明. 細胞, Vol.59 No.9
8) Kishi, Y., Fujii, Y., Hirabayashi, Y., Gotoh, Y., 2012. HMGA regulates the global chromatin state and neurogenic potential in neocortical precursor cells. Nature Neuroscience 15, 1127–1133. PMID:22797695 doi:10.1038/nn.3165