



東北大学



平成24年3月7日
東北大学大学院医学系研究科
東北大学脳科学グローバルCOE

胎生期脳の幹細胞から神経細胞が生まれる仕組みの解明

－サイクリンD2が片方の娘細胞に受け継がれ、未分化性を維持する－

複雑な神経回路を構成する哺乳類の脳発生過程において、細胞増殖や分化により、多数の神経細胞が秩序だって産生されることは非常に重要です。東北大学大学院医学系研究科の大隅典子教授、恒川雄二研究員（当時、現所属：Scripps研究所）らは、発生期の哺乳類神経幹細胞において、細胞周期調節因子Cyclin D2（サイクリン D2）が脳原基の外側である基底膜面の先端（基底膜面突起、図1参照）に局在することを発見しました。また、Cyclin D2は神経幹細胞が2つの娘細胞に分裂する際に基底膜面突起と共に片方の娘細胞に受け継がれ、その細胞の運命を未分化な状態に維持する働きがあることを明らかにしました。さらに、このCyclin D2による細胞未分化性の維持は、哺乳類でのみ存在することから、進化の過程で獲得したメカニズムである可能性が考えられます。今後の研究の進展により、ヒト脳において莫大な数の神経細胞が産生され、脳が大きくなった仕組みの解明につながっていくことも期待されます。本研究成果は専門家の間で非常に注目される可能性があることから、欧州科学誌EMBOジャーナルに「Have you seen?」という紹介コラム付きで間もなく掲載されます。

【研究内容】

脳発生初期において神経幹細胞は対称分裂を繰り返し、未分化な細胞を増殖させていきます。必要な数の神経幹細胞が産生され、ニューロン産生期に入ると分裂パターンに変化が生じ、非対称に分裂するものが現れ始めます。片方の娘細胞は細胞周期を逸脱してニューロンへと分化し、一方基底膜面突起を受け継いだもう片方の細胞は再び細胞周期に戻るにより未分化性を維持した神経幹細胞となります（図1）。哺乳類神経幹細胞の非対称分裂において、娘細胞に非対称性を生じさせる運命決定因子、またその非対称分配のメカニズムの多くは未知のままです。

我々の研究グループは、非対称分裂の際、基底膜面突起が片方の娘細胞のみに受け継がれる現象に着目し、細胞周期調節因子として知られているCyclin D2（サイクリン D2）のmRNAおよびタンパク質が、ニューロン産生期において神経幹細胞の基底膜面突起に局在していることを発見しました（図2）。この結果から我々はCyclin D2が神経幹細胞の非対称性に関わっているという仮説を立てこれを証明する実験を始めました。

はじめに我々は、Cyclin D2 mRNAには細胞体から基底膜面突起に移動するに必要十分な、輸送配列が存在することを明らかにしました。このような配列は世界で初めて報告されたものです。さらに胎仔脳に対する電気穿孔法および全胚培養法により、Cyclin D2 mRNAが輸送された先の基底膜面突起で局所的に翻訳されていることを確認しました。次に、レンチウイルスを用いて非対称分裂後の姉妹細胞を可視化し、基底膜面突起を受け継いだ娘細胞が有意にCyclin D2を発現し、その細胞の運命が幹細胞であることを明らかにしました（図3）。さらに、Cyclin D2を細胞に強制発現させると幹細胞として振る舞い、逆にsiRNAによるCyclin D2の機能欠失を行うと分化したニューロンになることが分かり、Cyclin D2が細胞の運命を未分化な状態に維持している働きがあることを明らかにしました（図4）。

一連の結果から次のようなメカニズムが想定されます。Cyclin D2 mRNAは特異的な配列をもとに基底膜面突起に輸送され、局所的に翻訳されることにより基底膜面突起に蓄積されます。非対称分裂の際に片方の娘細胞に基底膜面突起が受け継がれることにより、そこに蓄積していたCyclin D2が非対称に片方の娘細胞に

受け継がれ、その細胞を未分化な状態に維持します。このことにより分裂した姉妹細胞間において運命の非対称性が生まれます（図5）。

Cyclin D2 は胎生期のヒト終脳においても基底膜面突起に局在し、輸送配列が存在しました（この配列はチンパンジー、アカゲザル、オラウータンでも72〜80%で保存されています）。興味深いことに、大脳皮質に層構造を持たないニワトリでは、Cyclin D2 の局在パターンも輸送配列も確認されませんでした。これらの結果は、Cyclin D2 の非対称分裂時における未分化性維持が進化の過程で哺乳類が獲得したメカニズムである可能性を示唆しています。また、本研究結果から、胎生期神経幹細胞において、幹細胞を維持することにおいて基底膜側の突起の重要であることが強く示唆されました。このことは、ヒトを含む霊長類の大脳皮質原基において、基底膜側突起を有する神経幹細胞が多数存在することに鑑みて、多数のニューロンを産生して大きな大脳皮質を構築するストラテジーの一端を示していると思われます。

* 本成果は、文部科学省科学研究費補助金「新学術領域研究（研究領域提案型）」神経細胞の多様性と大脳新皮質の構築（領域代表者 自然科学研究機構基礎生物学研究所 山森哲雄）、および文部科学省グローバルCOE プログラム（脳神経科学を社会へ還流する教育研究拠点、代表者：大隅典子 東北大学大学院医学系研究科教授）の支援によって得られました。

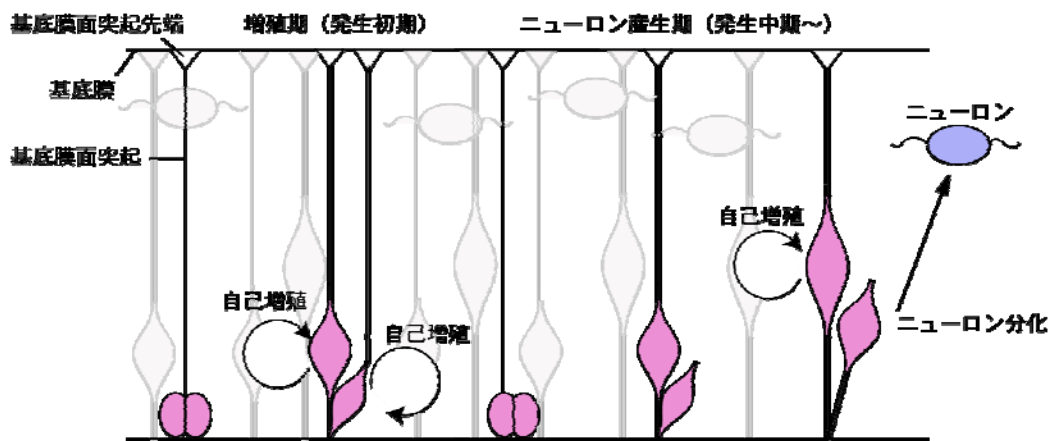


図 1. 大脳発生の模式図。増殖期において神経幹細胞は対称分裂と呼ばれる2つの神経幹細胞を生み出す分裂を繰り返し、幹細胞の数を増やしていく。ニューロン産生期になると神経幹細胞は非対称分裂と呼ばれる、1つの神経幹細胞と1つの分化したニューロンを生み出す。この分裂様式により、生み出されるニューロンの数がコントロールされ複雑な大脳が形成されていく。

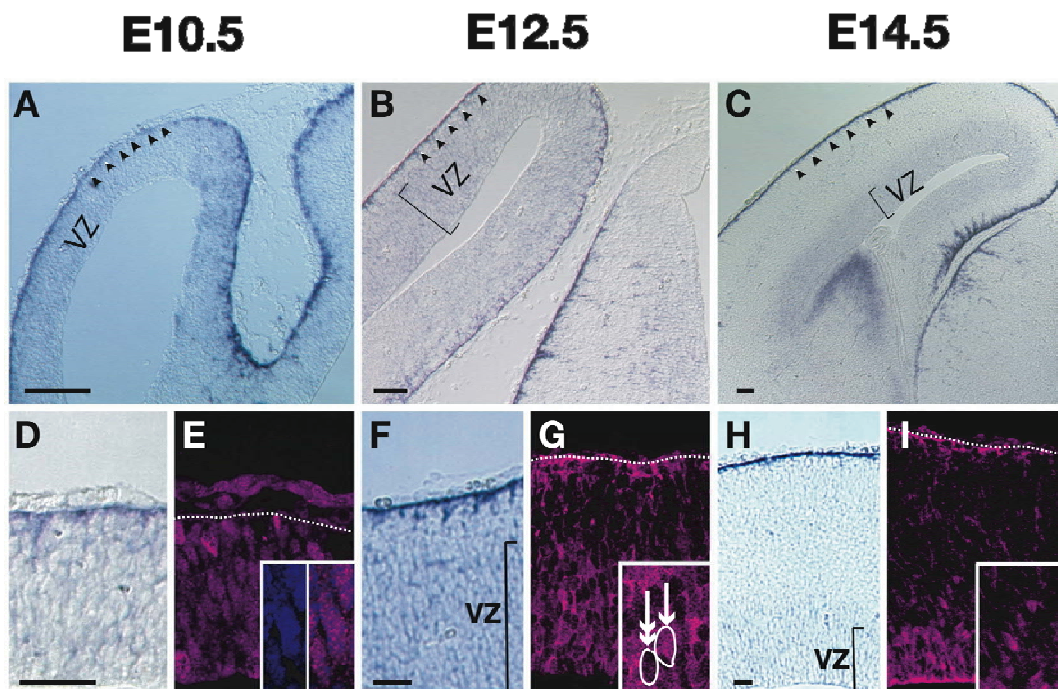


図 2. E (胎生) 10.5, 12.5, 14.5 日マウスの終脳における Cyclin D2 の mRNA およびタンパク質の発現パターン。(A-C) E10.5, 12.5, 14.5 日マウス終脳で in situ hybridization (ISH) 法を用いて Cyclin D2 mRNA の発現パターンを解析した。Cyclin D2 mRNA は全ての発生期において VZ (脳質帯) と呼ばれる神経幹細胞の存在する層と、神経幹細胞基底膜面突起が存在する基底膜面に存在することが示された (矢頭)。(D-I) E10.5, 12.5, 14.5 日マウス大脳皮質における Cyclin D2 の mRNA およびタンパク質の発現を ISH 法および抗体染色法により解析した。E10.5 (増殖期) においては *Cyclin D2* mRNA は基底膜側突起先端に存在するものの、タンパク質は核のみに存在し、細胞間での発現レベルに差はみられない (E 拡大図)。E12.5, E14.5 (ニューロン産生期) になると Cyclin D2 タンパク質は mRNA と同様に基底膜側突起先端に存在するようになり、核においても細胞間で発現レベルの差が確認できるようになった。(G 拡大図 矢、二重矢)

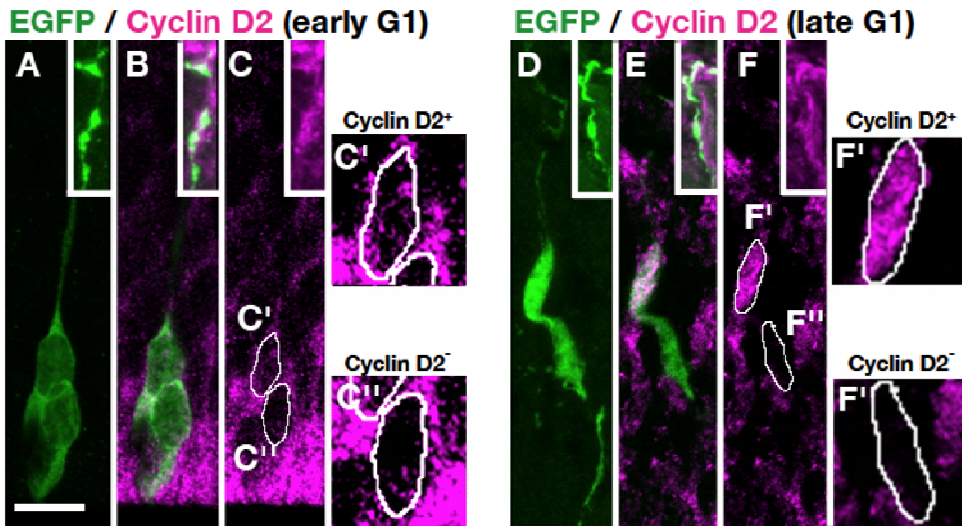


図3. Cyclin D2 は片方の娘細胞に基底膜面突起と共に受け継がれる。レンチウイルスを用いて E14.5 の神経幹細胞を可視化し、分裂直後である G1 期の細胞における Cyclin D2 の局在を観察した。(A-C) Cyclin D2 は G1 期初期から基底膜面突起を受け継いだ娘細胞 (C') に有意に発現が強く、受け継がない細胞では弱く (C'')、G1 期後期にはその差が顕著に観察された (D-F)。さらに Cyclin D2 は神経幹細胞基底膜面突起先端にも局在していることが観察された (A-F 右上拡大図)。

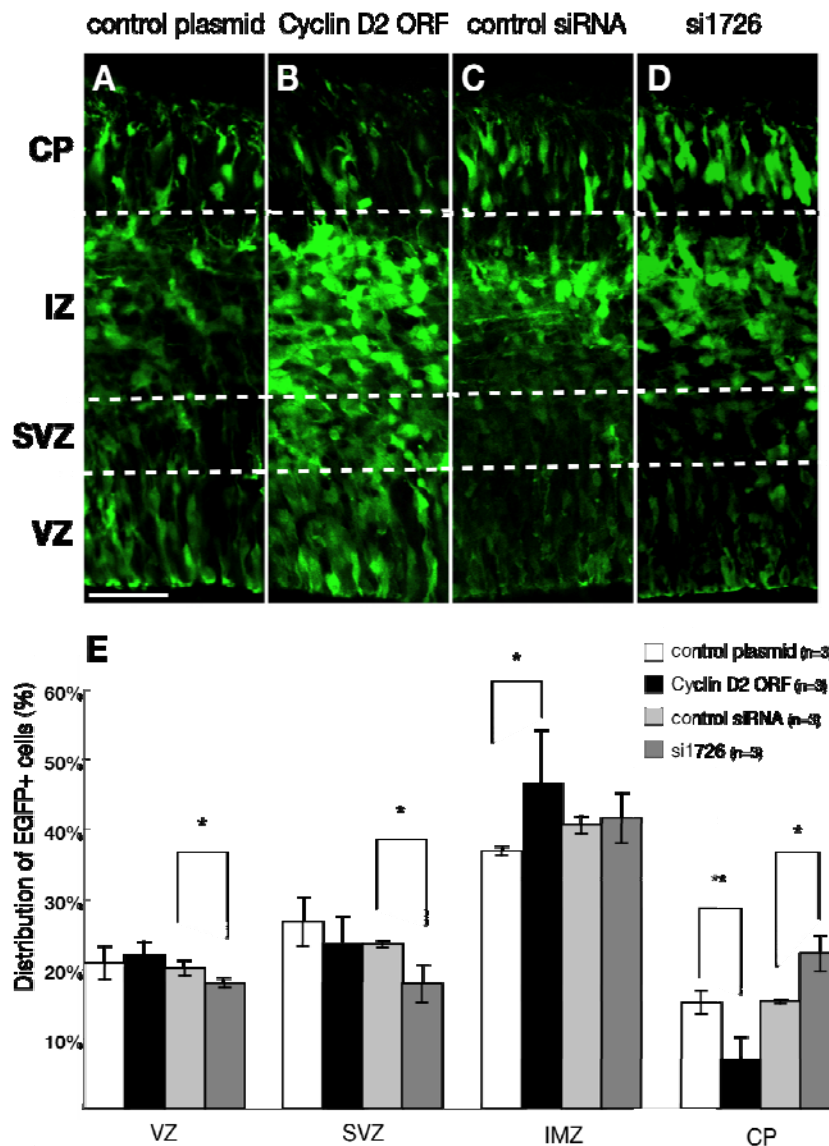


図4. Cyclin D2 は神経幹細胞の運命決定に寄与している。(A-D) E12.5 日マウス胎児大脳皮質に電気穿孔法を用いてコントロール空ベクター (control plasmid)、Cyclin D2 発現ベクター (Cyclin D2 ORF)、コントロール siRNA (control siRNA)、Cyclin D2 に対する siRNA (si1726) を EGFP 発現ベクターと共に導入した。48 時間後の大脳切片を成熟したニューロンが存在する皮質板 (CP)、移動中の未熟なニューロンが存在する中間層 (IZ)、神経幹細胞が存在する脳質下帯 (SVZ)、VZ に分け EGFP 陽性細胞の局在を観察した。(E) 観察の結果 Cyclin D2 が過剰に存在すると優位に神経幹細胞の割合が増えてニューロンの割合が減り、またその逆の現象が Cyclin D2 の機能欠失を行った場合に観察された。これらの結果から Cyclin D2 が神経幹細胞の運命決定に寄与していることが示唆された。

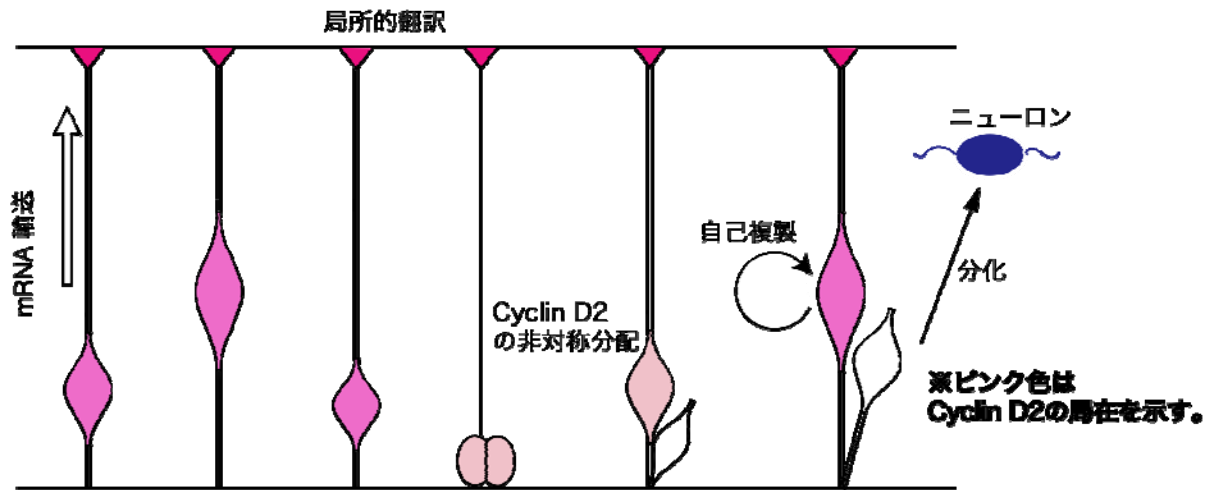


図 5. Cyclin D2 の神経幹細胞における非対称運命決定機構の仮説。Cyclin D2 mRNA は神経幹細胞基底膜面突起先端に輸送され、そこで局所的に翻訳されることにより局在する。細胞分裂時に基底膜面突起は片方の娘細胞に受け継がれ、その基底膜面突起と一緒に多量の Cyclin D2 も片方の細胞のみに受け継がれる。Cyclin D2 を受け継いだ細胞は自己増殖を繰り返す幹細胞のとして増殖を繰り返し、受け継がなかった娘細胞は分化したニューロンとなる。

【用語説明】

専門用語： その用語の解説。

- * 1 Cyclin D2: 細胞周期調節因子として知られている分子。
- * 2 細胞周期: 細胞は G1 期 (間期) → S 期 (DNA 合成期) → G2 期 (間期) → M 期 (分裂期) → G1 期 → というサイクルを繰り返すことにより増殖しその数を増やしていく。
- * 3 *insitu* hybridization: タンパク質の鋳型となるメッセンジャーRNA (mRNA) の発現している細胞、組織を調べる方法。
- * 4 抗体染色法: あるタンパク質を特異的に認識する抗体を用いて、タンパク質の細胞内、組織内局在を調べる方法。
- * 5 電気穿孔法: ごく短い電気パルスを与えることにより細胞に極小の穴をあけ、そこから遺伝子を発現するベクターを挿入し、任意の遺伝子を細胞に発現させる方法。東北大学大学院生命科学研究所の仲村春和教授らがオリジナルに開発し、現在世界中で利用されている基盤技術。
- * 6 ベクター: プラスミドと呼ばれる環状 DNA で、発現させたい遺伝子を組み込み細胞に導入することにより遺伝子が発現する。
- * 7 レンチウイルス: 実験用に改良されたウイルスで、発現させたい任意の遺伝子を組み込み細胞に感染させると、宿主で遺伝子を発現させることができる。
- * 8 siRNA: 非常に短い RNA の 2 重鎖断片で、機能欠失をしたい任意の遺伝子に対して相補的な配列を設計し細胞に導入すると、その遺伝子の RNA を分解することにより機能欠失を行う。

【論文題目】

Cyclin D2 in the basal process of neural progenitors is linked to non-equivalent cell fates
(EMBO Journal)

「神経幹細胞基底膜面突起に局在する Cyclin D2 は非対称運命決定に関わる」

(お問い合わせ先)

東北大学大学院医学系研究科発生発達神経科学分野

教授 大隅典子 (おおすみ のりこ)

電話番号: 022-717-8203

Eメール: osumi@med.tohoku.ac.jp

(報道担当)

東北大学大学院医学系研究科・医学部広報室

長神 風二 (ながみ ふうじ)

電話番号: 022-717-7908

ファックス: 022-717-8187

Eメール: f-nagami@med.tohoku.ac.jp