

平成 28 年 4 月 21 日

## 細胞周期を止めても「時計」は進む ～発生の時刻にそった神経前駆細胞の変化の仕組み～

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長・高橋 雅英）細胞生物学分野の川口 綾乃（かわぐちあやの）准教授と宮田 卓樹（みやたたくあき）教授の研究グループは、理化学研究所多細胞システム形成研究センターの松崎 文雄（まつざきふみお）チームリーダーらとの共同研究で、脳の発生時刻にそった神経前駆細胞の変化と、細胞周期進行との関係を明らかにしました。

哺乳類の脳の発生過程では、未分化な神経前駆細胞は分裂を繰り返しながら発生時期に応じた各種ニューロンを生み出していきます。しかし、その時間軸にそった神経前駆細胞の性質変化がどのようにしておこるのかはよくわかっていません。

本研究グループは、発生時刻の異なる一つひとつのマウス神経前駆細胞の遺伝子発現を解析し、前駆細胞の分化状態に関係なく、発生時刻の進行に伴って変化する「時間軸遺伝子」たちを見つけました。これら「時間軸遺伝子」の発現は、発生途中のマウスの脳の中で前駆細胞の細胞周期進行を止めても、引き続き変化していきました。またその後細胞周期停止を解除すると、細胞は正しい発生の時刻に応じたタイプのニューロンへと分化しました。これらの実験結果などから、細胞周期を止めても、神経前駆細胞内では発生時刻を刻む「時計」が進んでいくこと、また、この個々の細胞内にある仕組みと細胞外からの調整の両者が協調して、発生時期に応じた正しい神経前駆細胞の振る舞いを決めていることが明らかとなりました。

本研究は、「細胞は自身の細胞分裂の回数を数えて発生の時刻を計っているのか」という基本的な生物学的疑問に答えるとともに、神経前駆細胞から特定の運命の細胞が生みだされるメカニズムの解明につながることで期待されます。

本研究成果は、英国科学誌「ネイチャー・コミュニケーションズ (Nature Communications)」(英国時間 2016 年 4 月 20 日付の電子版) に掲載されました。

# 細胞周期を止めても「時計」は進む ～発生の時刻にそった神経前駆細胞の変化の仕組み～

## ポイント

- 発生時刻の異なるマウス大脳由来の神経前駆細胞一つひとつについて遺伝子発現を解析し、分化状態に関係なく発生時刻の進行に伴って変化する「時間軸遺伝子」たちを見つけました。
- 発生途中の脳の中で神経前駆細胞の細胞周期を止めても、「時間軸遺伝子」の発現は引き続き変化していきました。またその後細胞周期停止を解除すると、神経前駆細胞は正しい発生の時刻に応じたタイプのニューロンへと分化しました。
- 細胞周期を止めても、神経前駆細胞内で発生時刻を刻む「時計」が進んでいくことが明らかとなりました。

## 1. 背景

哺乳類の大脳は、未分化な神経前駆細胞(Apical progenitor cells, AP)が分裂を繰り返しながら各種ニューロンを生み出していくことで形作られていきます。その過程で、APは2つの点で性質を変化させていくことが知られています。ひとつは細胞の分裂パターンです。胎生初期には、未分化な前駆細胞を2つ生み出すような細胞分裂がほとんどであるのに対し、胎生中期には、ニューロンや中間前駆細胞(Intermediate progenitor cells, IP)といった分化細胞を生み出す分裂がメインになっていきます。もう一つが生じるニューロンのタイプで、早い時期の前駆細胞からは下層(lower-layer)ニューロン、遅い時期の前駆細胞からは上層(upper-layer)ニューロンが生み出されることが知られています。このような神経前駆細胞(AP)の時間軸にそった性質の変化が、どのような仕組みで行われているのか、これまであまり明らかとはなっていませんでした。

## 2. 研究成果

### (1) 「時間軸遺伝子」の同定

本研究グループは、まず、発生時刻の異なるマウス大脳原基(胎生11日目～16日目)から単一細胞をとりだし、一つ一つの細胞の網羅的な遺伝子発現情報をマイクロアレイにより取得しました。得られた情報をもとに細胞の種類を分類し、それらの中から神経前駆細胞(AP)と、より分化した中間前駆細胞(IP)を同定、さらにAPが胎生11日目から胎生14日目の間に遺伝子発現を大きく変化させること発見しました。このとき発現が減少する遺伝子群の中には細胞増殖の制御に関係する分子が多く含まれていました。さらに胎生11日目と14日目のAPとIPの遺伝子発現プロファイルから、前駆細胞の分化状態(APかIPか)には関係なく、時間変化に伴ってのみ変化する遺伝子として「時間軸遺伝子」たちを同定し(図1)、それらの発現が、胎生12日目を中心に変化することを明らかとしました。

## (2)細胞周期進行を止めても「時間軸遺伝子」の発現は変化しつづける

次に「前駆細胞は自身の細胞分裂の回数を数えて発生の時刻を計っているのか」という生物学的疑問について検討するため、前駆細胞の細胞周期進行を止める実験を行いました。

cdk インヒビターである p18 を前駆細胞に過剰発現させると細胞周期進行を止めることができますが、同時に細胞は分化してしまいます。そこで前駆細胞の未分化性を維持するため、p18 と同時に活性化型 Notch(Notch intracellular domain, NICD)を前駆細胞に過剰発現させました。時間軸遺伝子は「前駆細胞の分化状態に関係なく、時間変化に伴って変化する遺伝子」であり、NICD の発現は時間軸遺伝子の経時的な発現変化に大きな影響を与えませんでした。

p18 と NICD を胎児脳中の AP へ過剰発現させて細胞周期を停止させ、1-3 日後に細胞を脳組織内から取り出し、時間軸遺伝子の発現がどうなっているかを調べました。その結果、細胞周期を止めても、対応する発生時刻に応じて時間軸遺伝子の発現は変化しつづけていることが明らかとなりました(図 2)。

## (3)細胞周期停止を解除すると、時期相応なニューロンが生まれる

下層ニューロンを生み出す胎生初期に神経前駆細胞の細胞周期進行を止め、上層ニューロンを生み出す胎生中期にそれを解除して、一時的に細胞周期を止められた AP がどのような種類の細胞を生み出すのかを検討しました。この目的のため、胎生 10 日目あるいは 11 日目のマウス胎児脳に、loxP 配列で挟んだ p18+NICD 配列を過剰発現させて細胞周期進行を止め、2-3 日後に Cre レコンビナーゼ配列を導入して組み換えを起こし p18+NICD の人為的発現を解除、その後に生じた細胞の種類を胎生 19 日目に検討しました。その結果、胎生初期から一時的に細胞周期進行を停止させた AP も、発生時刻進行に応じて上層ニューロンを産生することがわかりました(図 3)。これらの結果から、発生時期に応じた AP の遺伝子発現と生みだされるニューロン種の変化には、AP 自身の細胞周期進行は必要ではないということが明らかとなりました。

## (4)周囲の細胞からの影響を受けない細胞自律的な時間軸遺伝子の変化

周囲の細胞からの影響を排除したとき、AP 内における時間軸遺伝子の発現変化はどのようなのでしょうか。AP は培養期間中に分裂増殖して細胞集団を形成してしまうため、従来は周囲の細胞がない状態を作り出して解析することは困難でした。一方、p18+NICD が過剰発現された AP は低密度分散培養下で孤立させた状態でも培養し続けることが可能なため、上記研究を行うことが可能です。実験の結果、孤立した AP 内でも一部の時間軸遺伝子は依然変化していることが明らかになりました。このことから、AP 自身の中に、自律的に時間経過に伴う変化をひきおこす仕組みが存在していること、この細胞内の仕組みと細胞外からの調整の両者が協調して、発生時期に応じた正しい前駆細胞の振る舞いを決めていることが示されました。(図 4)

図 1. 「時間軸遺伝子」は前駆細胞の分化状態とは独立に変化する。

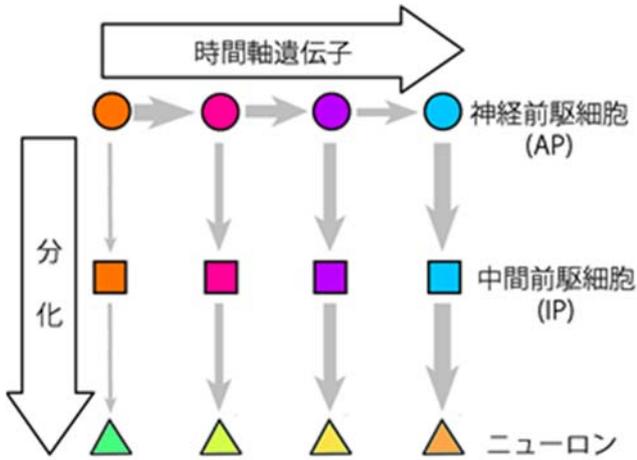


図 2. 細胞周期進行を止めても神経前駆細胞内の時間軸遺伝子の発現は変化する。

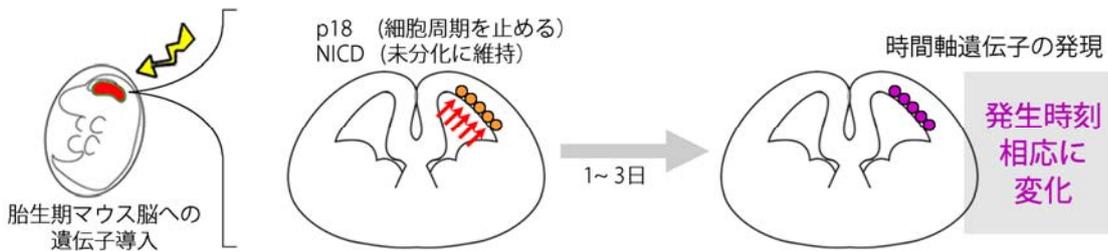


図 3. 細胞周期停止と未分化維持を解除した神経前駆細胞は、解除時の時刻に対応するタイプのニューロンに分化する。

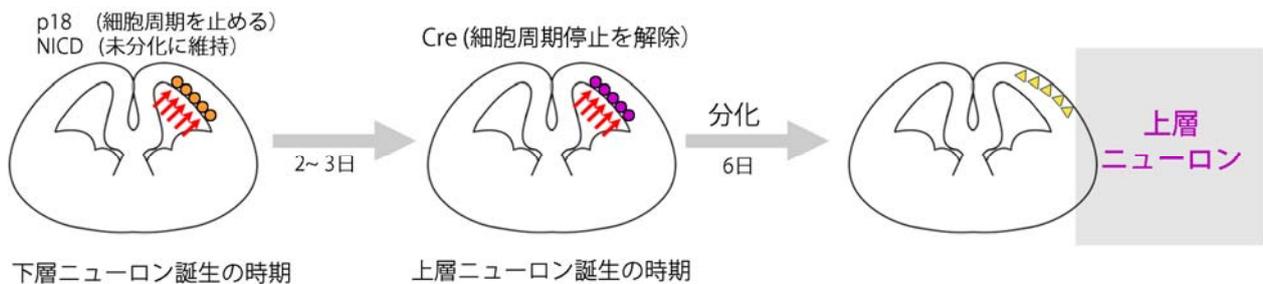
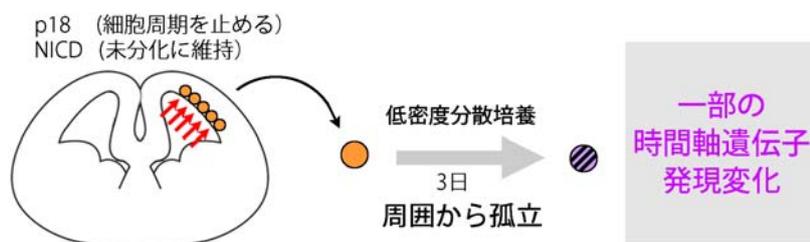


図 4. 孤立した AP 内でも一部の時間軸遺伝子の発現は変化する。



### 3. 本研究の意義と今後の展開

発生期の脳の中で起きている神経前駆細胞内の遺伝子発現変化と、「自身の細胞分裂の回数を数えて発生の時刻を計っている」わけではない、発生の時期に応じた前駆細胞の振る舞いを規定する仕組みがわかりました。本研究で得られた、発生時期の異なる各種前駆細胞・ニューロンの単一細胞レベルでの網羅的な遺伝子発現情報は、インターネット上のデータベースで公開されます

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE55981>)。今後、未分化な神経前駆細胞から特定の運命の細胞が生みだされるメカニズムの解明につながることを期待されます。

### 4. 発表雑誌

Mayumi Okamoto, Takaki Miyata, Daijiro Konno, Hiroki R. Ueda, Takeya Kasukawa, Mitsuhiro Hashimoto, Fumio Matsuzaki\*, and Ayano Kawaguchi\* (\*co-corresponding authors). Cell cycle-independent transitions in temporal identity of mammalian neural progenitor cells. *Nature Communications* (2016年4月20日 オンライン版 日本時間午後6時、ロンドン時間午前10時)

#### English ver.

[http://www.med.nagoya-u.ac.jp/english01/dbps\\_data/material/nu\\_medical/en/res/ResearchTopics/2016/cycle\\_20160421en.pdf](http://www.med.nagoya-u.ac.jp/english01/dbps_data/material/nu_medical/en/res/ResearchTopics/2016/cycle_20160421en.pdf)