

機関番号：14301

領域設定期間：平成28年度～令和2年度

領域番号：3803

研究領域名（和文）脳構築における発生時計と場の連携

研究領域名（英文）Interplay of developmental clock and extracellular environment in brain formation

領域代表者

影山 龍一郎（KAGEYAMA Ryoichiro）

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：80224369

交付決定額（領域設定期間全体）：（直接経費）1,181,800,000円

#### 研究成果の概要

脳構築過程を中心に時間制御機構を解析したところ、神経幹細胞では Hes1 や Hes5 が自律的にリズムを刻む発生時計として正常なタイミングで分化能を転換させること、ニューロンの最終運命は生まれた時点では決まっておらず、移動した場所からのインプットに依存して最終分化すること、最終分化したニューロンは神経幹細胞の発生時計にフィードバックすることがわかった。したがって、脳構築過程を制御する発生時計と場の連携の実体が明らかになった。

研究分野：総合生物、神経科学、発生生物学

キーワード：発生時計、神経発生、脳構築、神経幹細胞

#### 1. 研究開始当初の背景

発生過程では、各臓器において組織幹細胞が増殖するとともに、あらかじめ決められたタイミングと順番で多様な細胞に分化する。これらの分化細胞は、決まったスケジュールで各々適切な場所へと移動することによって成熟し、正しい組織が構築される。組織幹細胞の増殖期は長すぎても短すぎても臓器の大きさが異常になり、また、誤ったタイミングで生まれた細胞は本来置かれるべき細胞外環境との相互作用を実現できず、正しく組織を構築できなくなる。すなわち、それぞれの発生イベントのタイミングは厳密に制御される必要があるが、その詳細な分子機構には不明の点が多い。

脳発生過程においても、神経幹細胞が決まったスケジュールで分化する。まず、深層ニューロン（5/6層）が分化し、続いて浅層ニューロン（2/3/4層）が分化する。生まれたニューロンは、それぞれ決められた場所に移動して層を形成する。ニューロン形成が終了すると、神経幹細胞からグリア細胞が分化する。最終的には、層、カラム、領野といった複雑な組織が構築されるが、この構築過程はあらかじめ決められたタイミングと順番で進行する。ES細胞の3次元培養において、神経幹細胞が増殖期を経て自律的に正しい順番とタイミングで深層ニューロンや浅層ニューロンを生み出し、これらのニューロンは決められた場所に移動して脳組織が構築されること、すなわち複雑な神経組織が内在性プログラムに従って自律的に形成されることが明らかになった。しかし、この自律的に進む内在性の時間制御機構はよくわかっていなかった。

#### 2. 研究の目的

なぜ発生過程は決まったタイミング・順番で自律的に進むのか、どのような分子機構で発生時間が計られているのか、といった発生学の長年の疑問に対する明確な答えは無かった。本領域では、発生時間に関する解析手法と情報が集積している脳を中心に据え、同様のシステムを共有していると考えられる他の臓器構築過程も含めて、発生時計が場（細胞外環境）と連携して組織構築を制御する分子機構の解明を目指した。

#### 3. 研究の方法

発生の時間進行は、細胞内に内在された時間プログラムと細胞外環境からのフィードバックによって制御されると考えられた。そこで、次の3つの研究項目を設けて研究を進めた。「研究

項目 A01:「細胞内在的な時間制御機構」は細胞内の現象を対象とし、発生時計の候補因子を中心に機能解析を行い、神経幹細胞に内在する時間制御機構を解析した。「研究項目 A02:細胞と場の連携による制御」は細胞から組織レベルの現象を対象とし、細胞外環境である「場」と神経幹細胞やニューロンとの相互作用の実体や役割を解析した。「研究項目 A03:実験技術開発」では、ES 細胞 3次元培養の応用、新規プローブ開発、数理モデル構築を研究項目 A01 や A02 の研究者と共同で行った。また、公募班として、新しい技術や手法を用いた研究、計画研究に含まれない生物種を用いた研究、計画研究でカバーされていない時間制御機構に関する研究、発生時間スケールの種差に関する研究など、発生の時間制御機構の全体像の理解につながる提案や研究領域において共同研究を積極的に推進する提案を募集した。

#### 4. 研究の成果

##### 研究項目 A01:細胞内在的な時間制御機構

神経幹細胞は、あらかじめ決められたスケジュールに従って、初め深層ニューロンを、続いて浅層ニューロンを産生し、最後にはグリア細胞であるアストロサイトを産生する(図1)。A01 影山は、この神経幹細胞の分化能が移行するタイミングを制御する生物時計、いわゆる発生時計の実体を明らかにすることを目標とした。分節時計遺伝子 Hes7 と同じファミリーに属し、かつ神経幹細胞の維持に重要な役割を担う転写抑制因子 Hes1 や Hes5 はネガティブフィードバックを介して自律的に2~3時間周期で発現振動することから、Hes1 や Hes5 が神経発生過程において生物時計として機能する可能性について調べた。その結果、神経幹細胞で Hes1 や Hes5 の発現レベルが持続して増加あるいは低下すると、神経幹細胞の分化能の移行がそれぞれ加速あるいは遅延することを明らかにした。従って、Hes1 や Hes5 は神経発生過程の進行を制御する発生時計として働くことが明らかになった(図1①)。

また、神経幹細胞や分節時計における安定な発現振動は Notch シグナルによって制御されること、この発現振動の周期に見られる種差は神経幹細胞や分節時計に共通に見られる機構によることを示した。

上述のように、神経幹細胞は未分化状態を保ちつつ様々な細胞に分化する能力を併せ持つが、この発生時計依存的な分化状態制御機構について探った。この2つの性質を維持するために、神経幹細胞は分化細胞で機能する遺伝子の転写を「仮抑制(一過的抑制)」しており、分化を促すシグナルにより転写活性化しうる準備状態を保持している。

しかし、発生が進行すると発生時計依存的に分化能を徐々に限定し、特定の分化系譜が選ばれる過程で選ばれなかった分化系譜で機能する遺伝子は「永続抑制」される。A01 後藤は、この発生時計依存的な分化運命制御機構を検討したところ、ポリコーン群タンパク質(PcG)が分化関連遺伝子の「仮抑制」状態と「永続抑制」状態を異なる機序で司ることを明らかにした(図1②)。

以上のように、当初の目標であった、神経幹細胞の分化能の移行タイミングを制御する内在性生物時計の実体、その下流の分化状態制御機構を明らかにできた。

一般に、ヒトの発生過程はマウスよりも遅く進行し、発生時計の時間スケールには種差があるが、その分子機構は不明であった。そこで、ヒトとマウスの分節時計遺伝子 Hes7 の発現振動の周期を *in vitro* 未分節中胚葉誘導系を用いて調べたところ、マウスは約2時間で、人は約5時間であった。A01 影山と A01 松田とは共同で、この周期長の違いを生み出す原理を明らかにするために遺伝子スワッピング等の解析を行ったところ、分節時計遺伝子 Hes7 の塩基配列の種差には依存せず、転写、スプライシング、翻訳、分解のスピードの種差によることがわかった。さらに、この違いによって神経発生過程の発生時計の種差も起こることが明らかになった。

##### 研究項目 A02:細胞と場の連携による制御

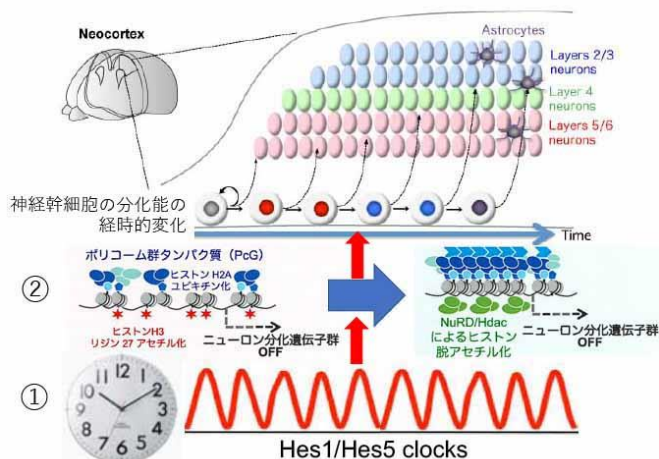


図1:細胞内在的な時間制御機構。①Hes1/Hes5 時計による神経発生制御。②PcG による発生時計依存的な仮抑制と永続抑制。

発生期の脳皮質においては、発生時計に依存して神経幹細胞から次々に異なる特徴を持ったニューロンが産生されるが、それらが場との連携によっていかにして脳表面近くへと適切に移動し、その後、層構造を作って分化していくのかを明らかにすることを目指した。新たに産生されたニューロンを適切に辺縁帯直下まで移動させ、誕生時期に応じて層状に並べていく過程の制御として、**A02 仲嶋**は、**A03 安達**、**A01 影山**、**A03 松田**と連携し、

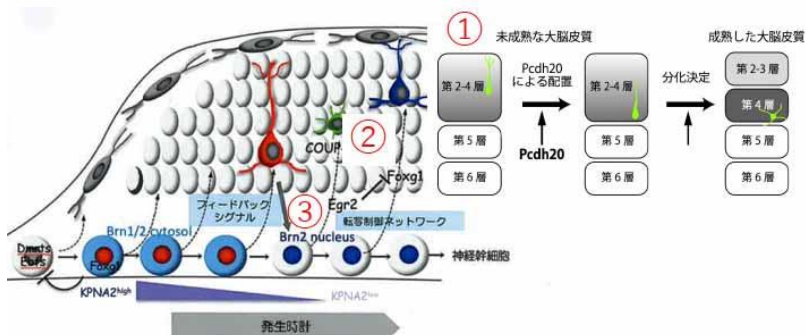


図2：細胞と場の連携による制御。①2/3/4層に分化しうる細胞が移動後の環境に応じて2/3層あるいは4層ニューロンに分化。②ニューロンの遊走。③ニューロンから神経幹細胞へのフィードバックによる分化能転換。

**Reelin** とその下流で制御される **N-cadherin** を中心とした機構を明らかにした。また、神経幹細胞から産生された時点ではニューロンはまだ一定範囲の分化ポテンシャルを持っており、移動を終えた後に場からの細胞外シグナルを受けて層特異的な特徴を持ったニューロンへと分化していく過程を制御する重要な候補分子を見出した (図2①：2/3/4層に分化しうる細胞が移動後の環境に応じて2/3層あるいは4層ニューロンに分化)。また、**A02 見學**はニューロンと脳組織の剛性を計測したところ、核膜分子 **LINC** 複合体の特殊な構成のためニューロン核は非常に柔らかく、組織全体の柔軟性にも寄与して皮質形成期の遊走を可能にすること (図2②)、さらに、伸展中の樹状突起フィロポディアが周辺の形状を読み取り樹状突起の空間分布を決定する機構を明らかにした。

一方、神経幹細胞は深層ニューロン産生後に浅層ニューロンを産生するが、**A02 花嶋**はこの分化能切り替えを推進する環境因子の同定を試みた。その結果、ニューロンから神経幹細胞へのフィードバックによって **POU** 転写因子 **Brn2** は細胞質から核へ移行し、神経幹細胞が上層ニューロン分化を開始することがわかった (図2③)。このように、当初の目標であった、周辺環境 (場) からニューロンや神経幹細胞への入力によって適切な細胞種や層構造が構築されていく制御機構を明らかにできた。

### 研究項目 A03：実験技術開発

研究項目 **A01** や **A02** の研究を推進するため、ES細胞3次元培養の応用、新規プローブ開発、数理モデル構築を行った。**A03 永楽**は、マウスおよびヒトの脳および網膜オルガノイド系を確立し (図3①)、継時的な **RNA-seq** および1細胞 **RNA-seq** を行い発生過程の細胞分化動態を比較解析した。その結果、マウス網膜形成過程特異的に寄与する新規の細胞とその形態形成における役割、ヒト網膜組織の形成過程に特異的に存在する神経前駆細胞種を同定した。**A03 松田**は、本領域の研究の発展に有用な、神経細胞のダイナミックな移動に伴う分子・細胞機能の変化を捉えるライブイメージングプローブ・ツールの開発を行なった。蛍光タンパク質や生物発光タンパク質を利用したイメージング技術班の発想に基づいたツール開発と、主に脳発生研究を専門とする領域の構成員との交流を元に着想を得たツール開発の2方向のアプローチにより、蛍光イメージング、生物発光イメージング、光操作のためのプローブ・ツールを複数開発した (図3②)。開発したプローブ・ツールの内の10種類に関しては、遺伝子をコードするプラスミドDNAが非営利のプラスミドバンク **Addgene** に登録されており、国内外の研究者のリクエストに応じて配布されている。**A03 安達**は、現象の数理モデル化とシミュレーションを駆使し、時間と場に依存した脳発生制御機構を多細胞ダイナミクスに基づいて統合的に理解することを目指した (図3③)。そのため、分子・細胞・組織・器官レベルにおいて得られた個別の知見をコンピュータ内に集約し、それらを統合した脳発生シミュレーション基盤の構築を進めた。以上のように、当初の目標であった各種実験技術開発がなされ、共同研究の発展に貢献した。



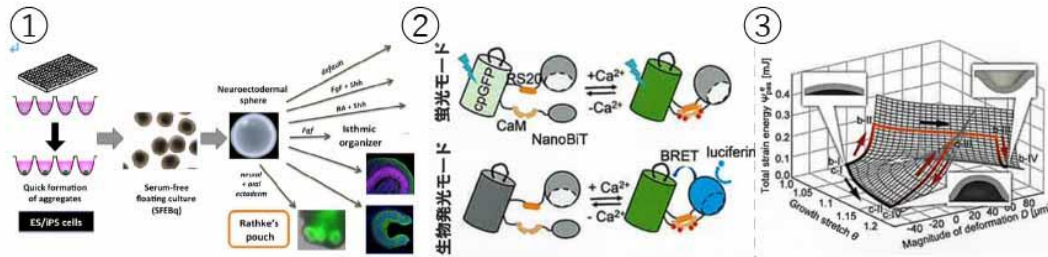


図3：実験技術開発。①オルガノイド系の確立。②新規プローブ開発。③数理モデル構築。

## 5. 主な発表論文等（受賞等を含む）

- \*[Miyoshi G](#), Ueta Y, Natsubori A, Hiraga K, Osaki H, Yagasaki Y, Kishi Y, Yanagawa Y, Fishell G, Machold R, Miyata M. (2021) FoxG1 regulates the formation of cortical GABAergic circuit during an early postnatal critical period for autism spectrum disorder-like phenotypes. **Nat. Commun.** in press.
- Yuizumi N, ... \*[Kawaguchi D](#), \*[Gotoh Y](#). (10/10) (2021) Maintenance of neural stem - progenitor cells by the lysosomal biosynthesis regulators TFEB and TFE3 in the embryonic mouse telencephalon. **Stem Cells** in press.
- Takeda H, [Kameo Y](#), Yamaguchi T, [Nakajima K](#), \*[Adachi T](#), (2021) Cerebellar Foliation via Non-Uniform Cell Accumulation Caused by Fiber-Guided Migration of Granular Cells, **J. Biomech. Sci. Eng.**, 16(1), #20-00516.
- Wang M, Han X, Liu C, Takayama R, Yasugi T, Ei S, Nagayama M, Tanaka Y, \*[Sato M](#). (2021) Intracellular trafficking of Notch orchestrates temporal dynamics of Notch activity in the fly brain. **Nat. Commun.** 12, 2083.
- \*[Uriu K](#), Liao BK, Oates AC, Morelli LG. (2021) From local resynchronization to global pattern recovery in the zebrafish segmentation clock. **Elife** 10, e61358.
- [Mii Y](#), Nakazato K, Pack C-G, Ikeda T, Sako Y, Mochizuki A, Taira M, [Takada S](#). (2021) Quantitative analyses reveal extracellular dynamics of Wnt ligands in *Xenopus* embryos. **Elife** 10:e55108.
- [Matsuda M](#), Hayashi H, Garcia-Ojalvo J, Yoshioka-Kobayashi K, [Kageyama R](#), Yamanaka Y, Ikeya M, Toguchida J, Alev C, \*[Ebisuya M](#). (2020) Species-specific segmentation clock periods are due to differential biochemical reaction speeds. **Science** 369, 1450-1455.
- [Oginuma M](#) (1/8), Harima Y, Tarazona OA, Diaz-Cuadros M, Michaut A, ... \*[Pourquie O](#). (2020) Intracellular pH controls WNT downstream of glycolysis in amniote embryos **Nature** 584, 98– 101.
- Yoshioka-Kobayashi K, Matsumiya M, Niino Y, Isomura A, Kori H, Miyawaki A, \*[Kageyama R](#). (2020) Coupling delay controls synchronized oscillation in the segmentation clock. **Nature** 580, 119-123.
- [Matsuda M](#) (1/22), Yamanaka Y, Uemura M, ... \*[Ebisuya M](#), Toguchida J, \*[Alev C](#). (2020) Recapitulating the human segmentation clock with pluripotent stem cells. **Nature** 580, 124-129.
- Kumar D, ... [Sawamoto K](#) (20/26), ... \*[Sakaguchi M](#). (2020) Sparse Activity of Hippocampal Adult-Born Neurons during REM Sleep Is Necessary for Memory Consolidation. **Neuron** 107: 552-565.e10.
- Yoong LF, Lim HK, Tran H, Lackner S, Zheng Z, Hong P, \*[Moore AW](#) (2020) Atypical myosin tunes dendrite arbor subdivision. **Neuron** 106, 452-467.
- [Fujita I](#)†, [Shitamukai A](#)†, Kusumoto F†, Mase S, Suetsugu T, Kato K, Abe T, Shioi G, Konno D, \*[Matsuzaki F](#). †equal contribution. (2020) Structural plasticity of neural stem cells in mammalian brain development. **Nat. Cell Biol.** 22(1):26-37.
- Eto H, \*[Kishi Y](#), Yakushiji-Kaminatsu N, Sugishita H, Utsunomiya S, Koseki H, \*[Gotoh Y](#). (2020) The Polycomb group protein Ring1 regulates dorsoventral patterning of the mouse telencephalon. **Nat. Commun.** 11, 5709.
- Liu C, Trush O, Han X, Wang M, Takayama R, Yasugi T, Hayashi T, \*[Sato M](#). (2020) Dscam1 establishes the columnar units through lineage-dependent repulsion between sister neurons in the fly brain. **Nat. Commun.** 11, 4067.
- \*[Hattori Y](#), [Kawaguchi A](#) (7/8), et al. (2020) Transient microglial absence assists postmigratory cortical neurons in proper differentiation. **Nat. Commun.** 11, 1631.
- Han X, Wang M, Liu C, Trush O, Takayama R, Akiyama T, Naito T, Tomomizu T, Imamura K, \*[Sato M](#). (2020) DWnt4 and DWnt10 regulate morphogenesis and arrangement of the columnar structures through Fz2/PCP signaling in the *Drosophila* medulla. **Cell Rep.** 33, 108305.
- Ueda Y, Kimura-Yoshida C, Mochida K, Tsume M, [Kameo Y](#), [Adachi T](#), Lefebvre O, Hiramatsu R, \*[Matsuo I](#). (2020) Intrauterine Pressures Adjusted by Reichert's Membrane Are Crucial for Early Mouse Morphogenesis. **Cell Rep.** 31(7), #107637.
- Nomura T, [Ohtaka-Maruyama C](#), Kiyonari H, Gotoh H, Ono K. (2020) Changes in Wnt-dependent neuronal morphology underlie the anatomical diversification of neocortical homologs in amniotes. **Cell Rep.** 31, 107592.
- \*[Fujita Y](#), Nakanishi T, Ueno M, Itohara S, \*[Yamashita T](#). (2020) Netrin-G1 Regulates Microglial Accumulation along Axons and Supports the Survival of Layer V Neurons in the Postnatal Mouse

- Brain. **Cell Rep.** 31,107580.
- Yang J., Takahashi, Y., et al. (EMT International Association) (38/48) (2020) Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 21(6):341-352.
- Kitadate Y, et al., Matsuo I. (17/23), et al., \*Yoshida S. (2019) Competition for mitogens regulates spermatogenic stem cell homeostasis in an open niche. **Cell Stem Cell** 24, 79-92.
- Hou PS, Miyoshi G., \*Hanashima C. (2019) Sensory Cortes wiring requires preselection of short-and long-range projection neurons through an Eg-Foxg1-COUP-TFI network. **Nat. Commun.**10(1), 3581.
- \*Kobayashi T, Piao W, ... Ballabio A, \*Kageyama R. (12/12) (2019) Enhanced lysosomal degradation maintains the quiescent state of neural stem cells. **Nat. Commun.** 10, 5446.
- Mori S, Sakakura E, Tsunekawa Y, Hagiwara M, Suzuki T. Eiraku M. (2019) Self-organized formation of developing appendages from murine pluripotent stem cells. **Nat. Commun.** 10, 3802.
- Kawaue T, ... Matsuzaki F. (10/11), \*Kawaguchi A. (11/11) (2019) Lzts1 controls both neuronal delamination and outer radial glial-like cell generation during mammalian cerebral development. **Nat. Commun.** 10. 2780.
- Sueda R, \*Imayoshi I, Harima Y, \*Kageyama R. (2019) High Hes1 expression and resultant Ascl1 suppression regulate quiescent versus active neural stem cells in the adult mouse brain. **Genes Dev.** 33, 511-523.
- Watanabe K, Kanaoka Y, Mizutani S, Uchiyama H, Yajima S, Watada M, \*Uemura T. & \*Hattori Y. (2019) Interspecies comparative analyses reveal distinct carbohydrate-responsive systems among *Drosophila* species. **Cell Rep.** 28, 2594-2607.e7.
- Shinoda H, Lu K, Nakashima R, Wazawa T, Noguchi K, Matsuda T. \*Nagai T. (2019) Acid-Tolerant Reversibly Switchable Green Fluorescent Protein for Super-resolution Imaging under Acidic Conditions. **Cell Chem. Biol.** 26(10).
- Tsuboi M, \*Kishi Y, Kyozuka W, Koseki H, Hirabayashi Y, \*Gotoh Y. (2018) Ubiquitination-independent repression of PRC1 targets during neuronal fate restriction in the developing mouse neocortex. **Dev. Cell** 47, 758-772.
- \*Kimura-Yoshida C, Mochida K, Nakaya M, Mizutani M, \*Matsuo I. (2018) Cytoplasmic localization of GRHL3 upon epidermal differentiation triggers cell shape change for epithelial morphogenesis. **Nat. Commun.** 9(1), 4059.
- Lanjakornsiripan D, Pior BJ, Kawaguchi D, \*Furutachi S, Tahara T, Katsuyama Y, Suzuki Y, Fukazawa F, \*Gotoh Y. (2018) Layer-specific heterogeneity of astrocytes and its dependence on neuronal layers. **Nat. Commun.** 9,1623.
- Kawabata-Galbraith K, Fujishima K, Mizuno H, Lee SJ, Uemura T, Sakimura K, Mishina M, Watanabe N, Kengaku, M.\* (2018) MTSS1 regulation of actin-nucleating formin DAAM1 in dendritic filopodia determines final dendritic configuration of purkinje cells. **Cell Rep.** 24(1),95-106.e9.
- Shinoda H, Ma Y, Nakashima R, Sakurai K, Matsuda T. \*Nagai T. (2018) Acid-Tolerant Monomeric GFP from *Olinidias formosa*", **Cell Chem Biol.** 25(3), 330-338.
- \*Isomura A, Ogushi F, Kori H, \*Kageyama R. (2017) Optogenetic perturbation and bioluminescence imaging to analyze cell-to-cell transfer of oscillatory information. **Genes Dev.** 31, 524-535.
- Matsunaga, Y., Noda, M., Murakawa, H., Hayashi, K., Nagasaka, A., Inoue, S., Miyata, T., Miura, T., Kubo, K. & \*Nakajima, K., (2017) Reelin transiently promotes N-cadherin-dependent neuronal adhesion during mouse cortical development. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 114(8), 2048-2053.
- Takata N, Abbey D, Fiore L, Acosta S, Feng R, Gil HJ, Lavado A, Geng X, Interiano A, Neale G, Eiraku M. Sasai Y. Oliver G. (2017) An Eye Organoid Approach Identifies Six3 Suppression of R-spondin 2 as a Critical Step in Mouse Neuroretina Differentiation. **Cell Rep.** 21, 1534-1549.
- Takata N, Sakakura E, Eiraku M. Kasukawa T, Sasai Y. (2017) Self-patterning of rostral-caudal neuroectoderm requires dual role of Fgf signaling for localized Wnt antagonism. **Nat. Commun.** 8, 1339.
- Matsubara Y, Hirasawa T, Egawa S, Hattori A, Suganuma T, Kohara Y, Nagai T, Tamura K, Kuratani S, \*Kuroiwa A, \*Suzuki T. (2017) Anatomical integration of the sacral-hindlimb unit coordinated by GDF11 underlies variation in hindlimb positioning in tetrapods. **Nat. Ecol. Evol.** 9, 1392-1399.
- \*Itoh Y, Higuchi M, Oishi K, Kishi Y, Okazaki T, Sakai H, Miyata T, Nakajima K, Gotoh Y. (2016) The PDK1-Akt Pathway Regulates Radial Neuronal Migration and Microtubules in the Developing Mouse Neocortex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 113, E2955-64.

受賞等

2020年11月 紫綬褒章 A01 後藤

2018年11月 紫綬褒章 A01 影山

ホームページ等

(和文) 脳構築における発生時計と場の連携 <http://www.time.icems.kyoto-u.ac.jp>

(英文) Interplay of developmental clock and extracellular environment in brain formation  
<<http://www.time.icems.kyoto-u.ac.jp/en/index.html>>