

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19057009

研究課題名（和文） 幹細胞システムにおける非対称分裂による増殖と分化の振り分け機構

研究課題名（英文） Study on the mechanism underlying segregation of proliferative and differentiative activities into daughter cells during stem cell asymmetric divisions.

研究代表者

松崎 文雄 (MATSUZAKI FUMIO)

独立行政法人理化学研究所・非対称細胞分裂研究グループ・グループディレクター

研究者番号：10173824

研究成果の概要（和文）：

ショウジョウバエとマウス発生脳の神経幹細胞の非対称分裂に関して、進化的に保存されたメカニズムと種特異的なメカニズムを解明することを目指した。細胞極性と分裂軸の一致によって非対称分裂するショウジョウバエ神経幹細胞において、その方向性を制御する非自律的な機構を発見した。他方、マウスの神経幹細胞では、ショウジョウバエと異なり、上皮極性と分裂軸の直交により一方の娘細胞が上皮構造を引き継ぎ、自己複製能を獲得することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The mode of asymmetric division of neural stem cells in *Drosophila* and mouse was investigated. In *Drosophila* neural stem cell, cell polarity and division axis is parallel to each other such that cell fate determinants are segregated into one daughter cell to ensure division asymmetry. In contrast, we found that mouse neural stem cells undergo divisions that makes the mitotic axis perpendicular to the long epithelial axis so that one daughter inherits the entire epithelial structure, which is a prerequisite for self-renewability.

交付決定額（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,700,000	0	8,700,000
2008年度	13,000,000	0	13,000,000
2009年度	13,000,000	0	13,000,000
2010年度	12,500,000	0	12,500,000
2011年度	12,500,000	0	12,500,000
総計	5,9700,000	0	5,9700,000

研究分野：神経発生生物学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：非対称分裂、幹細胞、細胞極性、ショウジョウバエ、マウス

1. 研究開始当初の背景

細胞の多様性を生み出すための基本的なメカニズムである非対称細胞分裂の研究は、主に、ショウジョウバエや線虫などの遺伝学的モデル無脊椎動物で進んできた。そこから、細胞の持つ非対称生（細胞極性）あるいは細胞外の非対称環境と分裂軸の一致が運命決定因子の不等分配を引き起こすという基本的なモデルが成立し、分子機構も明らかになってきた。しかし、脊椎動物を含め、このモデルがどの程度一般性を持ち、また、どのようなバリエーションがあるのかに関して、理解は進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエの神経幹細胞、生殖幹細胞、ほ乳類の神経幹細胞などを代表的なモデルシステムとして、それらの非対称ラボ分裂における、幹細胞の自己複製に必要な増殖能と分化能が娘細胞に振り分ける機構に関して、比較検討し、共通に働く分子とメカニズム、およびそれぞれの系に適応した特異的な仕組みを探り、非対称分裂のメカニズムに関する一般性と多様性を明らかにする。

3. 研究の方法

ショウジョウバエを使って、神経幹細胞の非対称分裂に必要なとされる因子を遺伝学的に検索し、同定する。マウスの脳発生において、神経幹細胞の非対称分裂を長期にわたって観察できるスライス培養系を開発する。この系によって、ショウジョウバエで見いだした非対称分裂制御因子のマウスホモログの活性を、ノックアウトやノックダウン、あるいは過剰発現によって人為的にモデュレートすることで、哺乳類脳の発生における神経幹細胞の非対称分裂のメカニズムを分析し、ショウジョウバエとの共通点と相違点を明らかにする。

4. 研究成果

1) ショウジョウバエ神経幹細胞

ショウジョウバエ神経幹細胞の細胞極性を制御する aPKC-PAR 複合体は、Aurora A が PAR6 をリン酸化することで正に制御されることが知られているが、脱リン酸化酵素 PP2A による PAR6 の脱リン酸化により負に制御され、非対称分裂に必須であることを明らかにした (J. Cell Science 2009)。

幹細胞の方向を制御するメカニズムの発

見：幹細胞を自己複製するとともに分化細胞を生じる幹細胞システムでは、しばしば非対称な細胞分裂によって幹細胞と分化細胞を同時に作り出す。このような幹細胞の非対称分裂の方向は、組織の成長方向、ひいては器官の形成にとって重要な役割を果たすと考えられる。ショウジョウバエの神経幹細胞は、この非対称分裂の研究のよいモデルシステムとして研究が進んできた。ショウジョウバエ神経幹細胞は非対称分裂によって、それ自身と、分化した娘細胞 (GMC) を生み出すが、この非対称な細胞分裂は、幹細胞内に自律的に形成される細胞極性、さらに、この極性の軸に細胞の分裂軸の方位が一致することで成立する。ショウジョウバエの中樞神経の発生過程では、この細胞極性が外側の外胚葉に対して一定の方向を保たれることで、常に同じ側に分化細胞を生じ、その結果、神経組織の成長方向が制御されることが知られている。本研究では、ショウジョウバエ神経幹細胞の非対称分裂の相対的な方位が G タンパク結合型膜受容体 *Tre1* によって制御されることを明らかにした。外胚葉から提供される未同定のシグナルによって、神経幹細胞の *Tre1* 受容体が活性化され、細胞極性を形作る分子装置を引き寄せる。その結果、外胚葉側に細胞極性オーガナイザーと神経幹細胞の分裂の一端を引き寄せ、外胚葉に対して垂直に分裂することが判明した。組織空間において、神経幹細胞の自律的な非対称分裂を制御するこの非自律的な機構は、他の組織あるいは動物種でも一般的に働いている可能性があり、脊椎動物の幹細胞への研究の展開が期待される (Developmental Cell 2012)。

2) マウス脳発生

発生脳における幹細胞の分裂様式：自己を複製すると共に分化細胞を生じる幹細胞システムでは、しばしば非対称分裂によってこの二つの細胞種を生み出す。ほ乳類の脳神経発生では apico-basal の極性をもった神経上皮

細胞が幹細胞としての機能を持ち、細胞分裂を行うことによって、自己複製するだけでなく、神経やより分化した前駆細胞といった異なる細胞を生み出す。これまで、ショウジョウバエと同様に、ほ乳動物でも apico-basal の極性に沿って運命決定因子が局在し、その非対称な分配によって娘細胞が異なる運命を獲得すると考えられてきた。しかし、我々の研究から、哺乳類神経幹細胞の分裂は、従来のモデルとは異なり、分裂軸と上皮細胞極性は直交しており、apical 面はどちらの娘細胞にも分配されることが判明した。今年度は、新しい技術の導入により basal process の分配を計測し、basal process はどちらか一方の娘細胞にだけ分配されることが判明した。すなわち、apical 側で分裂する幹細胞から生じる娘細胞対は、apical process と、basal process をともに持つ上皮構造を保持した娘細胞と apical process だけをも細胞のペアがほとんどであることが明らかになった。さらに、引き続き長時間スライス培養を継続し、これらの娘細胞の運命を追跡した結果、apical process だけを引き継いだ娘細胞は、神経分化の決定を受けた細胞となり、自己複製をする幹細胞にはならなかった。他方、完全な上皮構造を受け継いだ娘細胞の半分は再び apical 側で分裂する神経幹細胞となった。これらの結果から、自己複製が可能な神経幹細胞となるには、apical process と basal process の両方を引き継ぐこと、すなわち完全な上皮構造を獲得することが必要条件であることが明らかになった。(Nature Cell Biol. 2008)。

発生脳における幹細胞核の運動：脊椎動物の神経幹細胞は細胞周期に 관련된細胞核のエレベーター運動とアピカル面での細胞分裂を繰り返す。我々は神経幹細胞核のエレベーター運動のなかで、G1 期の細胞核の上昇運動が細胞非自律的であり、G2 期における微小管モーターに依存した細胞核の下降運動による排除効果であることを明らかにし(混雑回避モデル)、核のエレベーター運動が細胞増殖と組織構築の調和をもたらす細胞周期

依存性メカニズムであることを提唱している (EMBO J. 2011)。

マウス脳室外神経幹細胞の同定：神経幹細胞の分裂方向を発生脳中でランダム化することにより、apical process あるいは basal process だけを受け継いだ娘細胞を作りだし、それらの構造と自己複製能との関係を、神経幹細胞の basal process の分配をモニターできる slice culture 系を用いて解析した。その結果、分裂によって誕生した二つの娘細胞がそれぞれ、apical および basal process を受け継いだ場合、両細胞ともに増殖層(脳室帯)を脱出すること、さらに、basal process を受け継いだ娘細胞だけが自己複製すると同時に神経細胞を生じる非対称分裂を行うことを発見した。またこのような非対称分裂を2回以上繰り返すものも一定の割合で生じた。これらの脳室帯外神経幹細胞は、正常な神経幹細胞と同様、自己複製能の維持に Notch シグナルの活性化を必要とすることを確かめた。興味深いことに、Notch の基質 Delta は脳室帯外にはほとんどないとされているが、このような脳室帯外幹細胞が生じる際は、同時に移動する自身の姉妹細胞から供給されることが判明した。さらに、正常なマウス胚の脳にも、このような脳室帯外で自己複製能を持つもの神経幹細胞が少数ながら存在し、発生が進むにつれて徐々に増加する傾向にあることを見いだした。霊長類などの脳回を有する哺乳類の発生中の脳では、脳室帯外神経幹細胞が主要な神経幹細胞として神経産生を担うことが知られており、分裂様式や形態的にも酷似していることが判明した。これらの知見は、霊長類等の脳室帯外神経幹細胞が分裂軸の揺らぎにより、apical process を失うことで生じる可能性を示唆している (J.Neurosci. 2011)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[専門誌] (計 17 件)

1. Shitamukai A, and Matsuzaki F.

- Control of asymmetric cell division of mammalian neural progenitors.
Dev Growth Differ. 2012
 Apr;54(3):277-86. (2012) 査読有
2. Yoshiura S, Ohta N, and Matsuzaki F.
 Trel GPCR signaling orients stem cell divisions in the *Drosophila* central nervous system. *Dev. Cell* 22, 79-91 (2012) 査読有
 3. Kelava I, Reillo I, Murayama AY, Kalinka AT, Stenzel D, Tomancak P, Matsuzaki F, Lebrand C, Sasaki E, Schwamborn JC, Okano H, Huttner WB, and Borrell V.
 Abundant Occurrence of Basal Radial Glia in the Subventricular Zone of Embryonic Neocortex of a Lissencephalic Primate, the Common Marmoset *Callithrix jacchus*.
Cereb Cortex. 2011 Nov 23
 [Epub ahead of print] (2011) 査読有
 4. Wang C, Li S, Januschke J, Rossi F, Izumi Y, Garcia-Alvarez G, Gwee SS, Soon SB, Sidhu HK, Yu F, Matsuzaki F, Gonzalez C, and Wang H.
 An Ana2/Ctp/Mud Complex Regulates Spindle Orientation in *Drosophila* Neuroblasts. *Dev Cell* 21, 520-533 (2011) 査読有
 5. Kosodo Y, Suetsugu T, Suda M, Mimori-Kiyosue Y, Toida K, Baba SA, Kimura A, and Matsuzaki F. Regulation of Interkinetic Nuclear Migration by Cell Cycle-Coupled Active and Passive Mechanisms in the Developing Brain. *EMBO J.* 30, 1690-1704 (2011) 査読有
 6. Shitamukai A, Konno D, and Matsuzaki F.
 Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer-subventricular zone progenitors. *J Neurosci.* 31, 3683-3695 (2011) 査読有
 7. Ishikawa T, Gotoh N, Murayama C, Abe T, Iwashita M, Matsuzaki F, Suzuki T, and Yamamoto T.
 IgSF molecule MDGA1 is involved in radial migration and positioning of a subset of cortical upper-layer neurons. *Dev Dyn.* 240, 96-107 (2011) 査読有
 8. Kitajima A, Fuse N, Isshiki T, and Matsuzaki F.
 Progenitor properties of symmetrically dividing *Drosophila* neuroblasts during embryonic and larval development. *Dev. Biol.* 347, 9-23 (2010) 査読有
 9. Kato T, Kawaguchi A, Kosodo Y, Niwa H, and Matsuzaki F.
 Lunatic fringe potentiates Notch signaling in the developing brain. *Mol Cell Neurosci* 45, 12-25 (2010) 査読有
 10. Ogawa H, Ohta N, Moon WJ, and Matsuzaki F.
 Protein phosphatase 2A negatively regulates aPKC signaling by modulating phosphorylation of Par-6 in *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *J. Cell Science,* 122, 3242-3249 (2009) 査読有
 11. Shioi G, Konno D, Shitamukai A, and Matsuzaki F.
 Structural Basis for Self-Renewal of Neural Progenitors in Cortical Neurogenesis. *Cereb Cortex* 19(suppl_1), i55-i61
 Epub 2009 Apr 10 (2009) 査読有
 12. Kawaguchi A, Ikawa T, Kasukawa T, Ueda HR, Kurimoto K, Saitou M, and Matsuzaki F.

Single-cell gene profiling defines differential progenitor subclasses in mammalian neurogenesis. *Development* 135, 3113-3124 (2008)
査読有

13. Arakawa T, Iwashita M, Matsuzaki F, Suzuki T and Yamamoto T. Paths, elongation, and projections of ascending chick embryonic spinal commissural neurons after crossing the floor plate. *Brain Res.* 1223, 25-33 (2008) Epub 2008 Jun 3. 査読有
14. Konno D, Shioi G, Shitamukai A, Mori A, Kiyonari H, Miyata T, and Matsuzaki F. Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat Cell Biol.* 100, 93-101 (2008) published online: 16 December 2007; doi:10.1038/ncb1673 査読有
15. Yamamoto Y, Izumi Y and Matsuzaki F. The GC kinase Fray and Mo25 regulate Drosophila asymmetric divisions. *Biochem Biophys Res Commun.* 366, 212-218 (2008) published online: 3 December 2007; [Epub ahead of print] PMID: 18054329 査読有
16. Shirai T, Yorimitsu T, Kiritooshi N, Matsuzaki F and Nakagoshi H. Notch signaling relieves the joint-suppressive activity of Defective proventriculus in the Drosophila leg. *Dev Biol.* 312, 147-156 (2007) . 査読有
17. Matsuzaki F, and Sampath K. Wiring the nervous system: from form to function. *Development* 134, 1819-1822. (2007). 査読有

[図書] (計 2 件)

1. 下向 敦範、松崎 文雄
神経幹細胞の自己複製能を維持するための構造的基盤 細胞周期フロンティア 共立出版 (2010.11)

2. 今野大治郎、松崎文雄
“哺乳類神経前駆細胞の自己複製および分化における分裂軸制御の役割”
細胞工学 Vol.28 No.1 秀潤社 (2009.1)

3. 今野大治郎、松崎文雄
“第4章 非対称分裂による神経細胞の誕生” シリーズ脳科学第4巻「脳の発生と発達」岡本仁編集、東京大学出版会 (2008.9)

[その他]

ホームページ等

<http://www.cdb.riken.jp/cas/index.html>

<http://www.cdb.riken.jp/jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 文雄 (MATSUZAKI FUMIO)

独立行政法人理化学研究所・非対称細胞分裂
研究グループ・グループディレクター

研究者番号：10173824

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし