

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07053

研究課題名(和文) 神経発達に伴う細胞サイズ制御機構の解明と病態モデルの確立

研究課題名(英文) Mechanisms of cell size control during normal and abnormal neural development

研究代表者

武井 延之(Nobuyuki, Takei)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：70221372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞成長のマスターレギュレーターであるmTORC1の活性は、増殖期のラット及びヒト神経幹細胞で高く、分裂停止後は低下し、その後分化成熟した神経細胞では再び高くなることが明らかになった。神経幹細胞にmTOR活性化型変異遺伝子を導入すると、分化誘導後に細胞の大型化、異形化が観察され、脳形成異常の病態が再現された。mTORC1,2をそれぞれ特異的に阻害する分子デコイを開発し、神経幹細胞に遺伝子導入したところ形態異常が観察された。神経分化における細胞サイズ、形態の制御にmTORが深く関与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経分化に伴う突起伸展などの形態変化に比べ、細胞のサイズ制御機構に関してはこれまでほとんど研究されていなかった。本研究からmTOR(mammalian target of rapamycin)がその制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに2つの機能的に異なるmTORC1,2のシグナルをそれぞれ特異的に阻害するツールを開発した。

疾患モデル細胞を作成したことによって、疾患のメカニズム解明だけでなく、脳形成異常症に対する創薬のためのスクリーニングにも利用可能となった。

研究成果の概要(英文)：The activity of mTORC1, a master regulator of cell growth, was high in proliferating rat and human neural stem cells (NSCs), decreased after mitotic arrest, and increased again in differentiated and matured neurons. Introducing active mutant of mTOR into NSCs results cell enlargement and dysplasia after induction of differentiation. It is considered the cellular base of brain malformation. We developed the molecular decoys that specifically inhibits mTORC1 and 2, respectively. Forced expression of these decoys into NSCs induced morphological abnormalities. These results revealed that mTOR is deeply involved in the regulation of cell size and morphology in neural differentiation.

研究分野：神経科学

キーワード：mTOR 細胞サイズ 神経幹細胞 神経分化 脳形成異常 シグナル伝達 蛋白合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究から、細胞のサイズを制御している主な経路は mTOR シグナル系であることが明らかされつつある(1, 2)。mTOR は免疫抑制剤ラパマイシンの標的分子として同定されたキナーゼであり、翻訳とオートファジーの制御によって細胞の蛋白質総量を調節し、脂質代謝系の酵素の発現を介して脂質量のコントロールを行っている。つまり主要な細胞構成成分である macromolecules の量の調節の統合的な司令塔とも言える。そのため mTOR シグナルの活性化は細胞容量の増大をおこすと考えられるが、この生化学的反応が細胞サイズ増大という生物学的応答にどのようにリンクしているのかは不明である。また同時に、正しい形態形成、複雑性の獲得も正常な発達には必須である。

培養系で明らかのように、neurosphere を構成する神経幹細胞は小さいが、小ささを維持する仕組みは解明されていない。分化に伴い細胞サイズの増大と形態形成がなされてゆく。このときには分化誘導因子の働きによって種々の細胞内シグナル系が駆動されるが、細胞サイズ調節機構も必ず働いているはずである。

神経細胞は同一細胞種の中では大きさに多様性がある。神経幹細胞から神経細胞が分化成熟していく上で、細胞サイズのゲノム情報以降の制御は神経回路形成や脳の構築に欠かせないが、神経細胞の一生を通じて細胞サイズ調節のメカニズムは不明なままである。細胞サイズの調節と突起進展を含めた複雑性の獲得は、共通のシグナルを介しているのか否か？そのトリガーとなる細胞外分子は何か？などが課題である。我々は分化した神経細胞の成熟過程で、mTOR を介した翻訳活性化が細胞サイズの増大に寄与している知見を得ているが、神経発生過程におけるサイズ調節はさらにドラスティックであるにも関わらず知見がない。

神経幹細胞/神経細胞の分化成熟の過程でのこのシグナルの異常は、脳の形成異常を引き起こす。ヒトの疾患で神経細胞の異形化、巨大化を伴うものに限局性皮質形成異常(focal cortical dysplasia; FCD)がある。我々はこの疾患で mTOR の体細胞変異を同定し、変異が活性型変異であることを見いだした(3)。FCD で見られる異常細胞は神経やアストログリアのフェノタイプを示すこと、変異が体細胞変異であることから、神経幹細胞からの分化の過程で mTOR の過活性化が細胞サイズと形態に異常をもたらしている可能性が高い。

2. 研究の目的

神経細胞の細胞生物学は、軸索/樹状突起の極性形成や突起伸展の機構に関して知見が積み重ねられてきている一方、**細胞体のサイズ制御**に関してはほとんど研究されていない。細胞サイズの小さい未分化な神経幹細胞そして神経前駆細胞から、分化成熟に伴い神経細胞はサイズの増大と複雑性を示すようになる。またこの機構の破綻は脳形成異常という病態をもたらす。本研究では mTOR(mammalian target of rapamycin)キナーゼに注目して、神経及び神経幹細胞のサイズ制御の機構を明らかにすることを目的とした。さらに脳形成異常の疾患モデルの確立と治療に向けた戦略構築を行った。

具体的には

- (1) 神経幹細胞と神経細胞における mTOR シグナルの違いとそれを誘起する因子の解明
- (2) mTOR シグナルの ON/OFF による神経幹細胞、神経細胞のサイズ制御の可否の検証
- (3) 活性型 mTOR 変異による神経細胞の異形大型化の in vitro, in vivo での再現と機構の解明
- (4) 神経細胞のサイズ制御に蛋白合成、脂質合成が必須であることの検証

を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 神経幹細胞と神経細胞における mTOR シグナルの違いとそれを誘起する因子の解明

ラットおよびヒト(iPS 由来及び胎児脳由来(倫理委員会承認済))神経幹細胞から neurosphere を調整し、維持及び分化誘導を行う。各ステージにおける mTOR シグナル系の変化(mTOR キナーゼ活性、下流因子のリン酸化状態)を調べる。

細胞外因子(神経幹細胞増殖因子、神経分化誘導因子、細胞間・細胞-基質接着因子、栄養素)による mTOR シグナルの変化を調べ、増殖・分化との対応を明らかにする。

(2) mTOR シグナルの ON/OFF による神経幹細胞、神経細胞のサイズ制御の可否の検証

(3) 活性型 mTOR 変異による神経細胞の異形大型化の in vitro, in vivo での再現と機構の解明

我々が脳形成異常で見いだした mTOR の活性化型変異を神経幹細胞に導入し、細胞サイズ、形態の変化を観察する。変異の導入はゲノム編集および過剰発現系とし、in utero electroporation により vivo での変化も観察する。同時に阻害剤やデコイを用いてシグ

ナルを遮断して効果を調べる。

(4) 神経細胞のサイズ制御に蛋白合成、脂質合成が必須であることの検証

神経幹細胞で阻害剤やデコイ、siRNAなどを用い蛋白合成、脂質合成を阻害して細胞サイズ変化と分化誘導への影響を調べる。

4. 研究成果

(1) 神経幹細胞と神経細胞における mTOR シグナルの違いとそれを誘起する因子の解明

ラット、ヒト iPS 由来、ヒト胎児由来の neurosphere を用い、分化誘導前後の mTORC1 活性を知るため、基質である p70S6K のリン酸化を測定した。sphere 形成している増殖期においては mTORC1 活性が亢進しているが、分散し接着して増殖停止した未成熟な神経細胞では低下していた。その後神経分化/成熟と共に再び活性が上昇することがわかった。増殖期では細胞サイズは小さいが細胞周期は回っている。また分化誘導後、成熟して(突起伸展を含め)細胞サイズが増加した神経細胞でも mTOR 活性は高かった。突起進展にも関与していることも明らかになった(4)。mTOR は神経系でも増殖とサイズ制御の双方の key molecule である可能性が高い。

mTOR シグナルを活性化する因子としては、従来明らかにしてきた BDNF をはじめとする成長因子の他、基質接着因子にも活性を認めた。興味深い点としては sphere 時の Hippo 経路は細胞接着因子によって調節されており、細胞間/細胞基質接着因子が増殖/分化と細胞サイズを制御している可能性の手掛かりを得た。Hippo 経路の LATS が raptor をリン酸化して mTORC1 を抑制するという最近の報告と一致する結果である。

(2) mTOR シグナルの ON/OFF による神経幹細胞、神経細胞のサイズ制御の可否の検証

(3) 活性型 mTOR 変異による神経細胞の異形大型化の in vitro, in vivo での再現と機構の

解明

ラット、及びヒト神経幹細胞に mTOR の活性化型変異遺伝子を導入したところ、sphere の状態では光顕レベルで明らかな差異は見られなかったが、分化誘導後に細胞の大型化・異形化が見られた。結節性硬化症、限局性皮質形成異常、片側巨脳症といったいわゆる "mTORopathy" で見られる異常細胞を再現できた。創薬研究などに利用可能な成果である。

mTOR は結合するコンポーネントの違いによって mTORC1/2 の 2 つの異なったシグナルハブとして機能する。従来はラパマイシンが作用するのが mTORC1 で mTORC2 には作用しないとされていたが、高濃度・連続作用ではどちらも阻害することがわかっている。そこで下流の基質と結合するモチーフを用いた molecular decoy を開発した。mTORC1 の基質に共通する TOS モチーフを GFP との融合蛋白として発現させ、基質である 4EBP や p70S6K のリン酸化を抑制することに成功した。mTORC2 に関しては基質認識パートナーである mSin1 の CRIM ドメインをデコイとして、下流の Akt のリン酸化阻害に成功している。デコイは一過性の発現ではシグナルの変化に留まり、細胞形態の変化までは観察できなかったが、腫瘍細胞を用いた恒常発現株では形態変化を示した。現在神経幹細胞を用いて誘導発現株を作成中である。

このように mTOR 活性の強制的な on/off によって細胞サイズと形態が変化することが明らかとなった。また mTOR 活性化に伴う細胞フェノタイプの変化と共に、解糖系へのシフトも見出した。mTOR 活性化によるグルコース取り込みの亢進も明らかにしており、代謝と細胞サイズの関係を考えると興味深い知見と言える。また派生した研究では冬眠脳では mTORC1 の活性が低下し、蛋白合成が抑制されていることも明らかにしており(5)、神経活動が mTORC1 活性に影響している可能性が示唆された。このことは分化に伴い活動性を獲得した神経細胞で mTORC1 活性が再び上昇することと一致している。

(4) 神経細胞のサイズ制御に蛋白合成、脂質合成が必須であることの検証

mTORC1 の活性化によって蛋白合成、脂質合成が促進されるが、活性型変異導入細胞で細胞形態の変化した細胞で蛋白合成を抑制してもフェノタイプが戻ることは無かった。脂質合成も含め細胞のフェノタイプ変化に anabolic な代謝の促進が必要かについてはさらに検討する。おそらくはタイミングの問題で、分化誘導時のどのタイミングで介入するかがポイントとなると思われる。蛋白合成のモニターに関しては、puromycin テクノロジーを用いた SUnSET 法が神経細胞での免疫細胞化学的手法にも応用できることを見出した(6)ので、有用なツールとなった。

文献

- 1) Laplante & Sabatini (2012) *Cell* 149:274-
- 2) Takei & Nawa (2014) *Front Mol Neurosci* 7:28-
- 3) Nakashima et al (2015) *Ann Neurol* 78:375-
- 4) Nakai et al (2020) *Neurochem Int* 134:104645-
- 5) Yamada et al (2019) *Sci Rep* 9:11904-
- 6) Hoshi et al (2018) *Neurochem Res* 43:1242-

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Nakai H, Tsumagari R, Nakashima A, Kikkawa U, Ueda S, Yamanoue M, Saito N, Takei N, Shirai Y	4. 巻 134
2. 論文標題 mTORC1 is involved in DGKb-induced neurite outgrowth and spinogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochem. Int.	6. 最初と最後の頁 104645-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2019.104645	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamada S, Kamata T, Nawa H, Sekijima T and Takei N	4. 巻 9
2. 論文標題 AMPK activation, eEF2 inactivation, and reduced protein synthesis in the cerebral cortex of hibernating chipmunks	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci.Rep.	6. 最初と最後の頁 11904-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48172-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Y, Iwakura Y, Sotoyama H, Kitayama E, Takei N, Someya T, Nawa H	4. 巻 9
2. 論文標題 Clozapine-dependent ErbB kinase inhibition; implication for its unique antipsychotic profile	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transl. Psych.	6. 最初と最後の頁 181-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1038/s41398-019-0519-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Miki Daisuke, Kobayashi Yuki, Okada Tomoya, Miyamoto Tatuso, Takei Nobuyuki, Sekino Yuko, Koganezawa Noriko, Shirao Tomoaki, Saito Yumiko	4. 巻 44
2. 論文標題 Characterization of Functional Primary Cilia in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochem. Res.	6. 最初と最後の頁 1739-1844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-019-02806-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yukawa, Iwakura, Takei, Saito, Watanabe, Toyooka, Igarashi, Niizato, Oshima, Kunii, Yabe, Matsumoto, Wada, Hino, Iritanii, Niwa, Takeuchi, Takahashi, Kakita, Someya, Nawa	4. 巻 270
2. 論文標題 Pathological alterations of chondroitin sulfate moiety in postmortem hippocampus of patients with schizophrenia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Psych. Res.	6. 最初と最後の頁 940 ~ 946
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.psychres.2018.10.062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hoshi Osamu, Sugizaki Ayana, Cho Yuichiro, Takei Nobuyuki	4. 巻 43
2. 論文標題 BDNF Reduces eEF2 Phosphorylation and Enhances Novel Protein Synthesis in the Growth Cones of Dorsal Root Ganglia Neurons	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochem. Res.	6. 最初と最後の頁 1242 ~ 1249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-018-2541-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sotoyama H, Iwakura Y, Oda K, Sasaoka T, Takei N, Kakita A, Enomoto H, Parsadaniyan A, Nawa H	4. 巻 654
2. 論文標題 Striatal hypodopamine phenotypes found in transgenic mice that overexpress glial cell line-derived neurotrophic factor.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurosci. Lett.	6. 最初と最後の頁 99-106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2017.06.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Namba H, Nagano T, Jodo E, Eifuku S, Horie M, Takebayashi H, Iwakura Y, Sotoyama H, Takei N, Nawa H	4. 巻 142
2. 論文標題 Epidermal growth factor signals attenuate phenotypic and functional development of neocortical GABAergic neurons.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Neurochem.	6. 最初と最後の頁 886-900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14097.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwakura Y, Wang R, Inamura N, Araki K, Higashiyama S, Takei N, Nawa N	4. 巻 12
2. 論文標題 Glutamate-Dependent Ectodomain Shedding of Neuregulin-1 Type II Precursors in Rat Forebrain Neurons.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0174780	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Furukawa K, Fuse I, Iwakura Y, Sotoyama H, Hanyu O, Nawa H, Sone H, Takei N	4. 巻 16
2. 論文標題 Advanced glycation end products induce brain-derived neurotrophic factor release from human platelets through the src-family kinase activation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cardiovasc. Diabetol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s 12933- 017-0505-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 三木大輔, 小林勇喜, 河渕省吾, 宮本達雄, 小金澤紀子, 武井延之, 関野祐子, 白尾智明, 斎藤祐見子
2. 発表標題 神経細胞一次繊毛局在型GPCRを介するシグナルは繊毛の長さを調節する
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 雄太郎, 横幕 大作, 岩倉 百合子, 北山 栄子, 那波 宏之, 武井 延之
2. 発表標題 EGFによる神経の軸索伸長とEphシグナルへの干渉
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星 治 武井延之
2. 発表標題 細胞膜剥離法によるラット脊髄後根神経節細胞の成長円錐の形態解析
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武井 延之、金村 米博、那波 宏之
2. 発表標題 神経栄養因子による神経細胞成熟制御
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会 / 第61回日本神経化学会合同大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三木 大輔、小林 勇喜、宮本 達雄、小金澤紀子、武井 延之、関野 祐子、白尾 智明、斎藤祐見子
2. 発表標題 ヒトiPSC細胞由来神経細胞における非シナプスマーカー一次繊毛の検出
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会 / 第61回日本神経化学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関口知央, 武井延之, 二井信行
2. 発表標題 低温オンチップインキュベーションシステムの開発
3. 学会等名 生体医工学会シンポジウム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中田光、山本陽香、伊藤祐子、北村信隆、武井延之
2. 発表標題 シロリムス口内炎の発生機序に関する研究
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川瀬彩奈、那波宏之、武井延之
2. 発表標題 レスベラトロールによるAMPK-mTORシグナルを介した抑制による脳腫瘍細胞増殖制御
3. 学会等名 第60回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takei N, Yokomaku D, Ushiki D and Nawa H
2. 発表標題 Epidermal growth factor downregulates presynaptic maturation and suppresses synapse formation in vitro and in vivo.
3. 学会等名 7th ISN Special Conference, Synaptic function and dysfunction in brain diseases (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山田新太郎、関島恒夫、那波宏之、武井延之
2. 発表標題 冬眠期のシマリス神経細胞におけるAMPKを上流とした翻訳制御
3. 学会等名 第59回日本神経化学学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yutaro Kobayashi, Kohtaro Irie, Ayana Kawase, Nobuyuki Takei, Hiroyuki Nawa
2. 発表標題 Anticancer activity of antipsychotics on brain tumors
3. 学会等名 7th International Society of Radiation Neurobiology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	浜之上 誠 (Makoto Hamanoue) (00312025)	東邦大学・医学部・講師 (32661)	
連携研究者	渡辺 啓介 (Keisuke Watanabe) (20446264)	新潟大学・歯学総合研究科・講師 (13101)	
連携研究者	難波 寿明 (Hisaaki Namba) (90332650)	新潟大学・脳研究所・講師 (13101)	