

令和元年5月30日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18381

研究課題名(和文) 高等脳における神経細胞から幹細胞へのフィードバックシグナルの役割

研究課題名(英文) Role of feedback signaling from neurons to neural stem cells in mammalian developing brain.

研究代表者

下向 敦範 (Shitamukai, Atsunori)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・専門職研究員

研究者番号：00442971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の脳神経発生を担う神経幹細胞は自己を維持しながら、分化した神経細胞を生み出し続ける。また、神経幹細胞は組織内を貫通する構造を持ち組織構築の構造体としても機能する。しかし、この構造と自己複製能との関連は不明であった。本研究では、神経側に伸びた突起構造が、神経細胞から分泌される増殖シグナルを受容/伝搬するのに機能していることを見出した。具体的には、神経から分泌されたFGF増殖因子が、神経幹細胞の突起構造によって受け取られ、内部のシグナル伝達分子がモーターで輸送されることが判明した。これらは組織内における空間的な情報交換のメカニズムの一端であり、神経と幹細胞のバランスを調整していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、神経幹細胞を維持するメカニズムは、主に細胞内因子の分配や、脳髄液から供給される増殖因子などが報告されていた。しかしながら、本研究によって、これまでの想定とは反対側の神経層からも幹細胞を維持するシグナルがあることが明らかとなり、その受容には神経細胞が持つ構造的な特徴が重要であることが明らかとなった。これらの発見は生み出された神経細胞によって神経幹細胞がコントロールされる可能性を示唆しており、その作用メカニズムの解明は、これまで、不明だった組織内の細胞間相互作用の理解につながると予想され、組織の再生やより生体に近いオルガノイドの産生に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recently, we revealed that the inheritance of the basal process is important for the neural stem (NS) cell self-renewal. Although it is well known the basal process functions as the scaffold of migrating neurons, the role and mechanism of basal process in the controlling of NS cell self-renewal is largely unknown. Here, we showed that the basal process is critical for the receiving neuron derived FGF signal and transport of FGFR activated ERK MAPK, which promotes NS cell self-renewal. In the basal process, the activated ERK MAPK is localized on the endosomal vesicles and transported by the dynein motor system. From these results, we propose a feedback signaling system from neurons to NS cells mediated by the basal process, in which the fine tuning of proportion of neuron and NS cell number in the developing brain.

研究分野：細胞生物学

キーワード：神経幹細胞 ライブイメージング 細胞内輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞はRadial glia (RG) と呼ばれ、上皮極性にカップルした特徴的な形態をもつ。神経層側には、基底膜と結合しているbasal プロセス、脳室側に先端にアドヘレンスジャンクションを形成するApical プロセスと呼ばれる構造を維持している。上皮構造の受け継ぎは神経幹細胞の自己複製能と密接に相関しており、特にbasal 側の構造を受け継いだ細胞に自己複製能が維持される。また、これとは別に、細胞外部の増殖因子や、細胞内部の中心体などの非対称性と運命の相関がある事が明らかとなってきた。しかしながら、それぞれの運命決定における具体的な役割は未だに不明である。神経幹細胞からは、様々な細胞が経時的に生み出され、主に深層神経、表層神経、グリアという順番で産生される。これらは内在性の遺伝プログラムによる制御と、分化細胞など別の細胞からの外的シグナルによって引き起こされる事が知られている。しかしながら、それぞれの種類の細胞をどれだけ数生み出すか？という、脳の各細胞種のごとのサイズを決める増殖や産出期間の制御機構は、ほとんど明らかにされていない。また、進化の側面からみると、マウスとヒトの脳を比べると一目瞭然で異なるのが大きさであり、ヒトにおいては、特に後期に産生される表層神経の増加が顕著である。発生期では神経産生の領域が脳室の周辺(ventricular zone, VZ) からより内部の領域(outer sub ventricular zone, OSVZ)へ移行する。ヒトにおいてはOSVZ 領域の発達が非常に顕著であり、マウスでは非常に未発達である。一方、神経幹細胞の構造的特徴は種を通じて共通であり上皮極性を持つRG と、OSVZ領域にはbasal プロセスのみをもつbasal radial glia (bRG) の両者がヒトとマウス共に存在する。ただ、マウスにおいてはbRGの数は著しく少ない。また、神経幹細胞を維持する因子や遺伝子発現などは大部分が共通だが、一部、ヒト特異的な増殖因子の経路等が報告されている。このように多くの共通性はみられるが、むしろ、その数や規模に大きな差がみられることから、基本メカニズムは共通だが、進化の過程で、拡張、変化したと考えられる。しかしながら、どのような変化が重要なのかは、ほとんど未解明である。

2. 研究の目的

ヒトの脳はマウスに比べて高次機能を司る大脳新皮質の神経細胞の数が顕著に増大しており、それらは神経幹細胞の分裂パターンと性質の変化の制御によって構築されと考えられている。このようなシステムを制御するメカニズムとして分化細胞から幹細胞への「フィードバックシグナル」が重要である事が分かっているが、そのメカニズムはほとんど明らかとなっていない。これまで研究により、マウスにおいて時期特異的に神経細胞数を調整するフィードバックシグナルが存在し、ヒト脳にも保存されている可能性を見出している。本研究では、マウスを基盤にフィードバックシグナルの分子メカニズムの解明を行い、進化の過程でどのように変化、拡張していったかをフェレットをモデルとして検証し、社会的、医学的に重要なヒト脳の発生の基盤の解明を目指す。

3. 研究の方法

マウスを使って、basal プロセスがシグナルの伝達する分子メカニズムについて解析を行った。神経由来のFGF18のシグナルの授受の動体を可視化するために、ERK MPAKの可視化をFRETプローブによって行なった。活性型ERK MPAKを輸送小胞へ局在化させるのに必要なアダプタータンパク質にフォーカスを当てて、輸送小胞にFRETプローブを局在化させて、その動態を観察した。その後、輸送の障害やアダプタータンパク質コードする遺伝子のノックアウトの表現型について解析を行った。フェレットの解析においては、基本遺伝子の

発現や、ERK MAPKの活性化の状態を免疫染色等で確認して、マウスで関与が示唆された、アダプター遺伝子の機能解析について、CRISPR/Cas9を利用したノックアウトを行いその表現型の解析を行った。

4. 研究成果

(1)細胞内を伝達する分子メカニズム

神経層で発現しているFGF18がどのようにして、数百マイクロメートル離れている細胞体にシグナルを運んでいるのか？この問題は、本研究において大きな主題の一つであった。レーザーによる切断実験により、神経幹細胞から神経層に伸びるbasal プロセスがその受容を担う物理的実態であり、その内部での輸送が重要であると考えられた。次に生体内でFGF18のシグナルを直接観察するため、FGF18/FGFRの下流で活性化されるERK MAPKの活性化をモニターするFRETプローブを利用した。活性化型ERK MAPKの抗体染色によりその細胞内での染色が小さな粒子状に観察され、実際にbasal プロセス内にその染色が観察された。これらの細胞内局在より、ERK MAPKがエンドソーム上に局在し、モーターシステムによって輸送されている仮説を立て、検証をおこなった。神経軸索においては、活性化型ERK MAPKをエンドソームに局在化させるのに必要なアダプターとして、LAMTOR 1/2/3からなるコンプレックスが知られており、それらの局在を調べた。その結果、basal プロセス内の活性化型ERKの染色と共局在することがわかり、次に、これら分子を介して輸送されている可能性を検討した。エンドソーム上のERK MAPKの可視化するために、ERK MAPK FRETプローブとアダプタータンパクのエンドソーム局在化ドメインを融合させて、活性と小胞輸送を同時観察できるアッセイ系を確立した。これらのツールを用いた結果、活性化されたERK MAPKは、細胞内を神経層側、細胞体側の両方向に輸送されており、輸送モーターの一つであるダイニンを阻害することによって、輸送が阻害され、basal プロセス内に一過的に蓄積することがわかった。この事より、細胞内を効率よく伝搬するのに重要であると考えられる。さらに、輸送の阻害が神経分化を促進することを見出し、このシグナルの輸送自体が神経幹細胞の維持に寄与している事を確認した。これらの結果は、神経から分泌された増殖シグナルをbasal プロセスが受容し、細胞内部でのFGF18/FGFR経路によって活性化されたシグナル分子の輸送が神経幹細胞の維持に一定の寄与を示している事が示唆された。アダプタータンパク質の関与についても、CRISPR/Cas9と子宮内エレクトロポレーションを利用して解析を行ったが、神経幹細胞に対する表現型が弱く、神経幹細胞維持に対する寄与が低いのか、複数のアダプター同時にノックアウトする必要がある可能性もあり、引き続き解析が必要と考えられる。

(2)フェレットをモデルとした解析

つぎに、もう一つの主題であるフェレットをヒト脳発生のモデルとした解析である。まず、フェレットで解析を行うためのツールの開発を行った。その結果、長期間外来遺伝子の発現が維持できるPiggyBacトランスポゾンシステムを利用した遺伝子発現システムが非常に有用であることがわかった。このシステムを用いた、神経幹細胞特異的なレポーターや、CRISPR/Cas9による遺伝子ノックアウトなどツールを開発した。フェレット発生脳において、発生中期におけるERK MAPKの活性化は、マウスと同様に神経幹細胞で強く活性化されていた。また、マウスと同様に、basal プロセスでも活性化が確認された。胎児脳スライス培養を用いて、阻害剤をつかって上流の経路を調べたところ、フェレットではFGFシグナ

ルとEGFシグナルの両者がERKの活性化に寄与しており、この状況は、これまでに報告があるマウスにおける発生中後期に近い性質であることが示唆された。アダプタータンパク質の関与についても、CRISPR/Cas9と子宮内エレクトロポレーションを利用して解析を行った。しかしながら、表現型が弱く、神経幹細胞維持に対する寄与が低いか、複数のアダプター同時にノックアウトする必要がある可能性もあり、引き続き解析が必要と考えられる。また、basalプロセスを介したフィードバックシグナルがbasalプロセスだけしか持たない、bRGにより効果的に作用している可能性も考えられたが、弱い表現型は、basalプロセスを持つ神経幹細胞に様に現れていることから、特異的な関与はないと推察される。しかしながら、神経発生全体における寄与を明確にするには、継続的な解析が必要であると考えられる。今回、フェレットをモデルとする場合の問題点として、安定した妊娠フェレット供給が非常に問題となった。安価に安定的な供給を実現するには、自前での交配による妊娠動物の供給および、CRISPR/Cas9をベースとしたツールをテストするための同じ遺伝的バックグランドをもったフェレットの神経幹細胞のライン化など、in vitroの実験系に関するツールを充実する必要があると考えられ、今後の課題と考えられる。

(3)新たな展開:構造を構築する経路の発見

今回、basalプロセスを介したフィードバックシグナルを受ける、受けられないは、上皮構造の有無が一番重要であり、その上皮構築のメカニズムが最も重要であると考えられる。最終年度の解析中にNotch経路とインテグリン、R-Ras small Gタンパク質が、上皮構造の再構築に関与していることを見出し、フィードバックシグナルの授受を決定する重要な因子として解析を行った。その結果、マウスの発生脳においては、上皮構造の再生能が時期に応じて変化し、なんらかのメカニズムによって上記分子の活性を変化させている可能性を見出した。これらの新しい発見は、細胞間の相互作用の土台の構築に関わるシグナル経路の存在を示唆しており、神経幹細胞の維持機構に関与する新しい視点として、今後の詳細な解析が期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

1. Developing a De Novo Targeted Knock-in Method Based on in Utero Electroporation Into the Mammalian Brain. Tsunekawa, Yuji, Raymond Kunikane Terhune, Ikumi Fujita, Atsunori Shitamukai, Taeko Suetsugu, Fumio Matsuzaki. Development 143, 3216-3222, 2016年 (査読有り)

〔学会発表〕(計 4件)

1. Feedback signaling from neuron to neural stem cell. Atsunori Shitamukai, Daijiro Konno, Tomomi Shimogori, Akihiro Goto, Hiroshi Kiyonari, Shinji Takada, Michiyuki Matsuda, and Fumio Matsuzaki. 22nd Biennial Meeting of the International Society of Developmental Neuroscience. 2018年

2. The radial fiber-mediated FGF signal ensures the feedback signaling from neurons to radial glial cells in the developing cerebral cortex. Atsunori Shitamukai, Daijiro Konno, Tomomi Shimogori, Akihiro Goto, Hiroshi Kiyonari, Shinji Takada, Michiyuki Matsuda, and Fumio Matsuzaki. the EMBO Conference Gene Regulatory Mechanisms in Neural Fate Decisions. 2017年

3. Feedback signaling from neurons to neural stem cells. Atsunori Shitamukai, Daijiro Konno, Tomomi Shimogori, Akihiro Goto, Hiroshi Kiyonari, Shinji Takada, Michiyuki Matsuda, and Fumio Matsuzaki. The 4th German-Japanese Retreat on Forebrain Development. 2017年

4. 神経幹細胞の radial fiber は自己複製能維持のためのシグナル伝達分子の輸送の場として機能する。下向 敦範、今野大治郎、下郡智美、後藤明弘、高田慎治、松田道行、松崎文雄、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。