

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20610005

研究課題名(和文) 視覚中枢原基の神経上皮幹細胞は間期に神経前駆細胞に転換する

研究課題名(英文) Neuroepithelial cells are converted into neural progenitors during an elongated interphase in Drosophila larval optic lobe.

研究代表者

中尾 啓子 (NAKAO KEIKO)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：70338185

研究成果の概要(和文): 哺乳類神経上皮幹細胞から前駆細胞への転換に働く分子制御機構を明らかにするモデル系としてショウジョウバエの視覚中枢原基に存在する神経上皮幹細胞を選択した。まず視覚中枢原基においては、神経上皮幹細胞と前駆細胞の境界にある神経上皮細胞が特異的に延長している G1 期の中で神経前駆細胞に転換することを明らかにした。さらに Notch シグナルが神経上皮幹細胞から神経前駆細胞への転換の直前に活性化され、直ちにダウンレギュレートされることを明らかにした。Notch の機能欠失突然変異体のクローン解析から Notch signaling の活性化が転換直前の限定された時期に起こることで神経上皮細胞から神経前駆細胞への転換のタイミングが正しく制御されているのだということが示唆された。

研究成果の概要(英文): The first step in the development of the Drosophila optic medullar primordia is the expansion of symmetrically dividing neuroepithelial cells (NEs); this step is then followed by the appearance of asymmetrically dividing neuroblasts (NBs). Here, we performed detailed analyses demonstrating that individual NEs are converted into NBs. We also showed that this transition occurs during an elongated G1 phase. We also found that Notch signaling pathway was activated just before the transition and was rapidly downregulated. Furthermore, the clonal loss of the Notch wild copy in the NE region near the medial edge caused the ectopic accumulation of Delta, leading to the precocious onset of transition. Taken together, these findings indicate that the activation of Notch signaling during a finite window coordinates the proper timing of the NE-to-NB transition.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：発生遺伝学

科研費の分科・細目：幹細胞医・生物学

キーワード：神経上皮幹細胞、神経前駆細胞、ショウジョウバエ、細胞周期、Notch signaling、bHLH 型転写因子、神経上皮、対称分裂、非対称分裂、adherence junction、上皮間充織転換、細胞極性、細胞分化、神経幹細胞、transition

## 1. 研究開始当初の背景

神経前駆細胞が非対称分裂によって中間前駆細胞(ショウジョウバエでは神経母細胞: GMC)を生じ、それが対称分裂してニューロン又はグリア細胞を作るというプロセスについては、ショウジョウバエ胚のニューロプラスト等をモデルとした研究によって多くの知見が蓄積されてきたが、神経前駆細胞(広義では神経幹細胞とも呼ばれるが、ここでは次にあげる神経幹細胞と区別し、自己複製しつつより分化した中間前駆細胞を同時に生み出す細胞とする)が神経幹細胞(対称分裂によって幹細胞プールを増やしうる細胞)からどうやって生じるかについては不明の点が多い。というのは、ショウジョウバエ胚のニューロプラストは、神経外胚葉にある神経系細胞と表皮細胞のどちらかにも分化し得る細胞集団から、ニューロプラストになるべき細胞として一度選ばれると、対称分裂による増幅段階を経ずにいきなり神経前駆細胞として陥入し、非対称分裂によってニューロン・グリアを生じると言うプロセスをたどるため神経幹細胞の研究のモデルとしては、不適切であったことと、マウス前脳の神経上皮幹細胞が対称分裂を盛んに行って増幅している時期は E9 あたりまでの極めて早い時期で、免疫組織学的解析が容易ではなく、エレクトロポレーションなどの外来遺伝子導入もほぼ不可能であるため解析がほとんど進まず、結果的に、神経前駆細胞が非対称分裂を盛んに行う E14 前後の時期を中心として神経幹細胞・前駆細胞の解析がなされてきたからである。

## 2. 研究の目的

ショウジョウバエ視覚原基(OPC:Optic Proliferation Center)の神経上皮幹細胞は、胚期の神経芽細胞がいったん休止期に入ったあとで幼虫期に再活性化されて分裂を再開しますが、最初上皮性幹細胞として対称分裂を繰り返しながら増殖し、その後非対称分裂をする非上皮性の神経前駆細胞へと転換して様々な神経細胞を分化していくため、増殖と分化及び上皮非上皮(上皮間充織)の転換のメカニズムを追求するのに、非常に適した系であると考えました。

まず、コンフォーカル顕微鏡を用いて、対称分裂の微細な三次元的生体観察をする方法を確立し、対称分裂から非対称分裂への転換過程の解析を詳細に行いました。体細胞内で染色体組み替えを起こさせることで細胞系譜をラベルする MARCM という方法や種々の抗体を用いた免疫組織学的解析により、対称分裂をしている神経上皮細胞が、非対称分裂をするようになり、神経芽細胞になる過程

を詳細に明らかにした。すなわち、(1) 神経上皮細胞が apical-basal 極性を保ったままシート面に平行に対称分裂することにより細胞数を増加させ領域を拡大し、(2) 対称分裂で生じた片方のシートの端側の細胞のみが Asense という bHLH 型の転写因子を発現して、球状の神経前駆細胞へと細胞形態・極性を変換し、(3) アドヒレンスジャンクション(Adhrens Junction:AJ)の再構築が起こり、細胞極性因子の再分配が起こることにより分裂軸が 90° 回転し、(4) apical-basal の方向に非対称分裂を行うようになりニューロン・グリアが分化する。こうした細胞形態・極性・分裂様式の「転換(conversion)」は、最初から非対称分裂をしてニューロン・グリアを生じるショウジョウバエ胚期の腹部ニューロプラストでは起こらないもので、むしろ哺乳類神経上皮に存在する幹細胞の極性変換・細胞分裂様式に近いことから、この系が哺乳類幹細胞のモデル系として適していると考えられる。神経幹細胞を用いた再生医療を実現するためには、神経幹細胞の増殖・分化のメカニズムが解明され、それに基づいてソースとなる神経幹細胞を充分量増殖させ、かつそれらを目的に合った神経細胞に分化させることが必要である。ここ 10 年の研究によって、神経前駆細胞が非対称分裂を続けることによって多様な神経細胞を生み出すメカニズムについては多くのことがわかってきたが、対称分裂を繰り返して増殖する時期の神経幹細胞の分裂・増殖機構および対称分裂する神経幹細胞から非対称分裂する神経前駆細胞が生じる機構については、ほとんど明らかになっていないためショウジョウバエの視覚神経幹細胞を用いて明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 免疫組織化学

孵化後 96 時間のショウジョウバエ幼虫脳を 4% パラフォルムアルデヒドで固定し、0.5% TritonX-100 を含む PBS で洗浄した後で、以下の 1 次抗体とインキュベートした。

Rat Anti-DEcadD DCAD-2(1:100 DSHB), mouse anti-Notch C17.9 C6 (1:3 DSHB), mouse anti-Delta c594 (1:100 DSHB), mouse anti-PH3 #9706(1:200 Cell Signaling), DSHB), goat anti-Mcm2 sc-9839 (1:30 Santa Cruz), mouse anti-BrdU (1:200; Becton Dickinson), sheep anti-BrdU (1:200; Fitzgerald), rabbit anti-aPK c-20(Santa Cruz sc-216), rat anti-mCD8 RM2200 (1:200 Caltag), rabbit anti-gal (Cappel 1:200), rabbit anti-GFP (1:100 MBL).

次に Alexa 488, 555, 647 標識の二次抗体を反応させ共焦点顕微鏡 Zeiss LSM510 または LSM700 で観察し画像を取得した。

## (2) BrdU ラベル

10mg/ml の BrdU 溶液 0.5ml を餌に均一に混ぜて幼虫に摂取させ孵化後 96 時間で固定し 2N の HCl 処理を行った後で anti-BrdU 抗体と反応させ Alexa 標識の二次抗体検出した。Zeiss LSM700 を用いて画像を取得した。

## 4 . 研究成果

これまで我々は、哺乳類神経上皮幹細胞から前駆細胞へと分化する際の分子制御機構を明らかにするモデル系として、ショウジョウバエの視覚中枢原基に存在する神経上皮幹細胞を選び、それらが細胞周期特異的 - 神経上皮幹細胞において特異的に延長している G1 期に - 神経前駆細胞に転換することを明らかにしてきた。そこでこの転換機構を制御している分子メカニズムを明らかにするために、Notch signaling の関与について解析した。Notch signaling が神経上皮幹細胞と神経前駆細胞の増殖を促進し、かつ神経前駆細胞からニューロン・グリアへの分化を抑制することは、これまでの我々の研究で明らかにしているが、神経上皮幹細胞から神経前駆細胞への転換の分子機構に関しては、哺乳類を含めて何も明らかになっていない。実際ショウジョウバエ視覚中枢原基の神経上皮幹細胞においても、その神経前駆細胞への転換プロセス中の細胞は、G1 期であるため BrdU を取り込まない上に、細胞接着装置の、細胞極性の再構築が起こるのだけが指標で bHLH 型転写因子の Asense が転換後半に徐々に発現してくること以外には適当な分子マーカーもなく解析が困難だった。本年度は、MARCM を用いて Notch mutant クローンを作成する際、神経上皮幹細胞の端から前駆細胞に転換するという解剖学的な特性を利用して転換直後の Notch mutant の神経上皮幹細胞に focus してその表現型を解析したところ Notch signaling が一過的に活性化されることが神経上皮幹細胞から神経前駆細胞への転換のタイミングを決定するのに重要であることが明らかになった。

(1) BrdU ラベル実験によって、神経上皮細胞 (NEs) aPKC と DEcad を強く発現していると神経前駆細胞 (NBs) の間には、BrdU をほとんど取り込まない領域があることが明らかになった。その領域の BrdU ネガティブな細胞は Mcm2 を発現していることから G1 期にあると考えられる。これらの細胞は aPKC や DEcad 強く発現する神経上皮細胞の性質は失っているものの神経前駆細胞で発現する Asense を未だ発現していないので神経上皮細胞から神経前駆細胞への移行途上の細胞のようである。

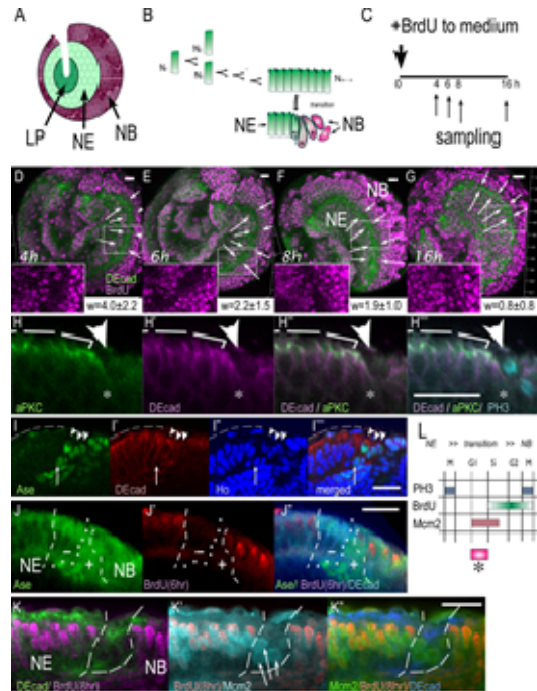


図 1

(2) Notch シグナルが神経上皮細胞から神経前駆細胞への移行を調節している可能性を考え、Notch シグナル関連タンパク質の発現を調べた。

Notch タンパク質は神経上皮細胞から移行期の細胞まで広く発現しているが、リガンドである Delta は移行期の細胞のすぐ直前で発現している

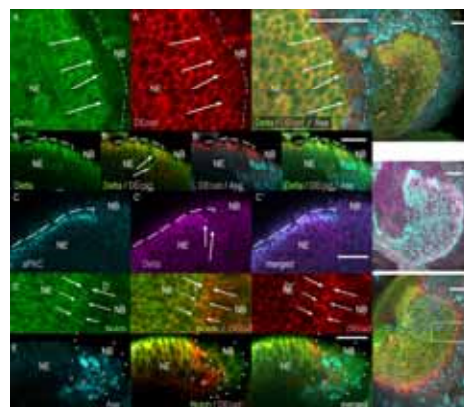


図 2

(3) Notch シグナルの活性を検出するために標的遺伝子の一つである Su(H) 遺伝子のプロモーター依存的に gal 遺伝子を発現するレポーターコンストラクトを導入して神経上皮細胞から神経前駆細胞への移行中の細胞で解析したところ、以降の直前に Notch シグナルが活性化し、以降完了とともにダウンレギュレートされることが明らかになった。

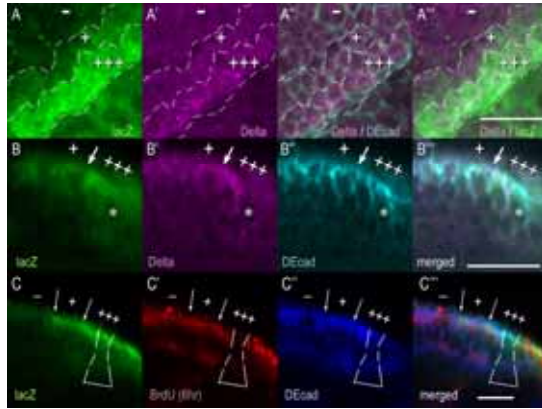


図 3

(4) Notch 遺伝子を欠失するクローンを MARCM 法で作成したところ神経上皮細胞と神経前駆細胞の境界領域では、Notch を欠失した神経上皮細胞が早期に神経前駆細胞へ移行し（図 4）、神経上皮細胞の中央の領域では、頂上部の狭窄が見られるのみで早期の神経前駆細胞への移行が起らなかった（図 5）。

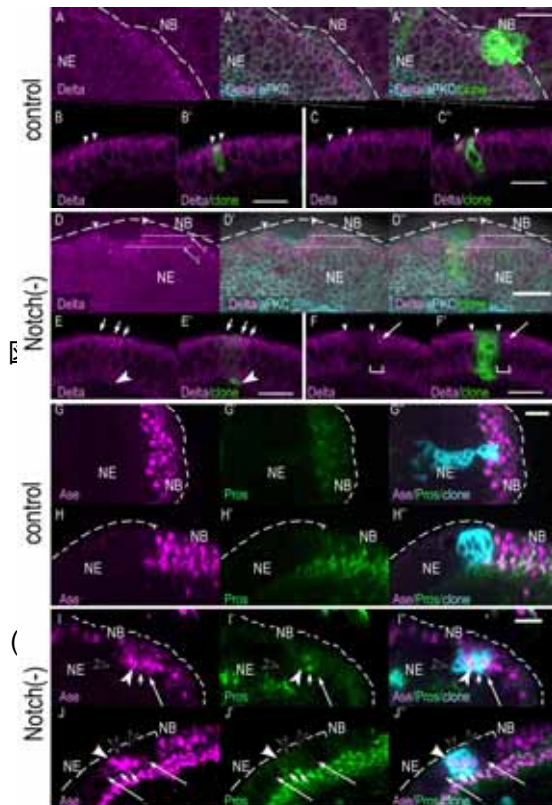


図 4

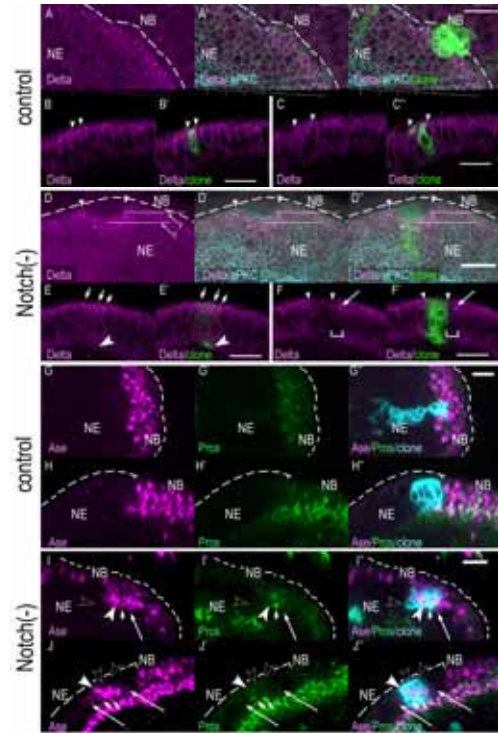
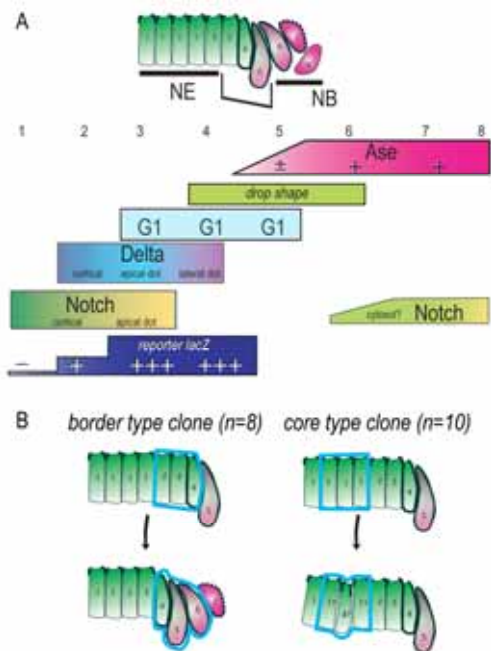


図 5

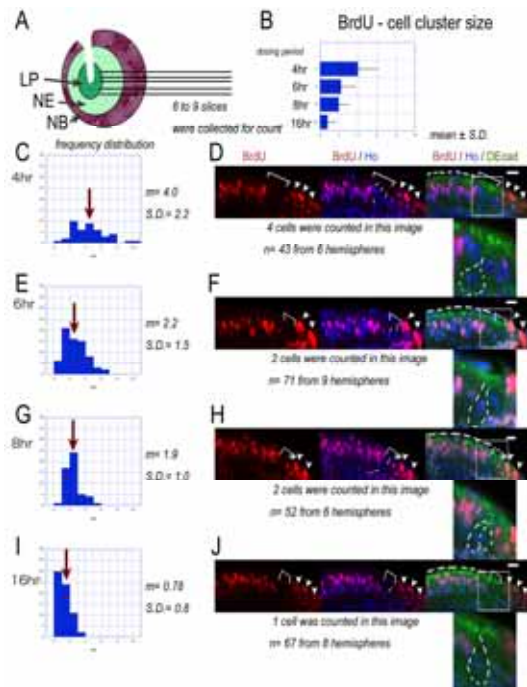
(5) 図 1~5 までの結果をまとめて以下の模式図に表す。

A 神経上皮幹細胞から神経前駆細胞への転換に際して、aPKC と DE-cad を強発現する円柱状の上皮細胞は、G1 期に drop-shaped の細胞へと形態変化を起こしやがて Asense を発現する前駆細胞になる。この移行を調節しているのは移行直前で一過性に活性化されすぐにダウンレギュレートされる Notch シグナルである。

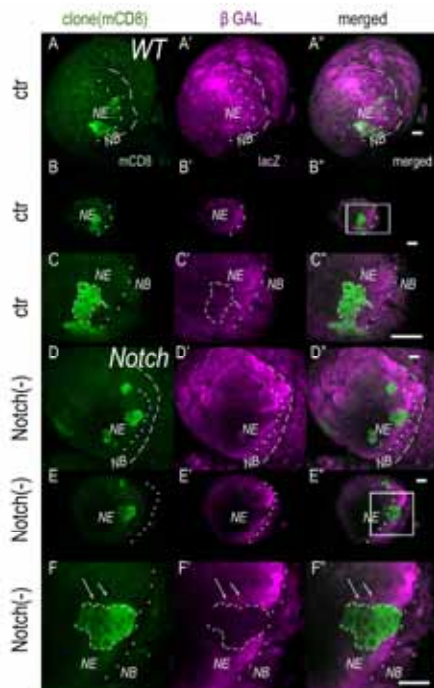


(補追データ)

(6) 神経上皮幹細胞から神経前駆細胞への移行期の細胞は 16 時間の BrdU ラベルの後でも 1 層の細胞がラベルされないまま残る。



(7) Notch 欠失突然変異クローン内では、Su(H)プロポーター依存的 gal の発現は消失する。



## 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)

[雑誌論文](計2件)

Orihara-Ono M, Toriya M, Nakao K\*, Okano H (K.Nakao is a corresponding author)

Downregulation of Notch mediates the seamless transition of individual *Drosophila* neuroepithelial progenitors into optic medullar neuroblasts during prolonged G1. *Developmental Biology* 351:163-175 (2011) 査読有

Ozawa Y, Nakao K, Kurihara T, Shimazaki T, Shimmura S, Ishida S, Yoshimura A, Tsubota K, Okano H.

Roles of STAT3/SOCS3 pathway in regulating the visual function and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of rhodopsin during retinal inflammation.

*J Biological Chemistry* 283:24561-24670 (2008) 査読有

[学会発表](計9件)

中尾啓子

子宮内電気穿孔法により遺伝子導入された大脳皮質体性感覚野抑制性神経細胞の電気生理学的・神経化学的解析法の開発 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同大会. 2010.12. 神戸ポートアイランド

M.Orihara-Ono

Conversion of *Drosophila* neuroepithelial stem cells into neuroblasts occurs during prolonged G1 phase, whose timing is regulated by Notch signaling. The 16th

International Conference of the International Society of Differentiation: From Stem Cells to Organisms.

November 15-18, 2010 NARA-KEN New Public Hall, Nara JAPAN

M.Orihara-Ono

*Drosophila* optic medulla progenitors turn their epithelial structure into neuroblastic one along with the cell cycle progression and Notch down-regulation. 第32回日本分子生物学会年会 Dec.9-12,2009 パシフィコ横浜

M.Orihara-Ono  
Drosophila Optic Neuron Progenitors  
Turn their Epithelial Structure into  
Spherical one along with the  
Progression of Cell Dividing Cycle.  
The 9th Japanese Drosophila Research  
YAMAHA Resort TSUMAGOI Conference  
July 6-8,2009

M.Orihara-Ono  
Drosophila optic neuron progenitors  
turn their epithelial structure into  
spherical one along with the  
progression of cell dividing cycle.  
The 7th Stem Cell Research Symposium.  
May 15-16,2009 Izumi Garden Gallery

Ozawa Y  
Roles of STAT3/SOCS3 Pathway in  
Regulating the Visual Function and  
Ubiquitin-Proteasome-dependent  
Degradation of Rhodopsin during  
Retinal Inflammation(網膜炎による  
視機能障害に対する SOCS3 の神経保護効  
果の解析)  
第 31 回日本分子生物学会年会・ 神戸,  
第 81 回日本生化学会大会 合同大会  
2008/12/9-12

織原 - 小野美奈子  
ショウジョウバエ視覚野前駆体におけ  
る神経幹細胞から前駆細胞への転換  
第 31 回日本分子生物学会年会・ 神戸,  
第 81 回日本生化学会大会 合同大会  
2008/12/9-12

小沢洋子  
網膜炎における視覚機能障害に対す  
る SOCS3 による神経保護効果の解析  
第 31 回日本神経科学大会, 東京,  
2008/7/11

織原 - 小野美奈子  
神経幹細胞から前駆細胞への転換  
第 31 回日本神経科学会大会  
(Neuroscience 2008) 2008 年 7 月 9~  
11 日 東京国際フォーラム

〔産業財産権〕

取得状況(計 1 件)

名称: Notch シグナル伝達系活性化検知方法  
発明者: 岡野栄之、徳永暁憲、神山淳、**中尾  
啓子**

権利者: 学校法人 慶應義塾

種類: 特許

番号: 第 4599610 号

取得年月日: 2010 年 10 月 8 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 啓子 (NAKAO KEIKO)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号: 70338185