

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870010

研究課題名（和文） 胎生期および成体において未分化な神経幹細胞を維持する機構の解明

研究課題名（英文） Regulatory mechanism of neural stem cell maintenance in the embryonic and adult brain

研究代表者

川口 大地 (KAWAGUCHI DAICHI)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：70549518

研究成果の概要（和文）：近年、成体における神経幹細胞の存在が明らかになり再生医療への応用といった点からもその運命制御の研究が活発に行われている。神経幹細胞は成体脳において脳室下帯や海馬歯状回といった限局した領域にのみ存在することから未分化維持ニッチの存在が想定されているがその実体は殆ど不明である。本研究では、Notch リガンド Dll1 発現細胞が成体脳室下帯神経幹細胞を維持するためのニッチ細胞として機能することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In the adult mammalian brain, the subventricular zone (SVZ) is the largest neurogenic niche for neural stem cells (NSCs). It is hypothesized that microenvironment of the SVZ may have specific factors that are permissive for the maintenance and differentiation of NSCs. However, the identity of stem cell niche and the regulatory mechanism of NSC maintenance are still largely unknown. In this study, we found that Notch ligand Dll1-expressing cells function as the niche cells for NSC maintenance in the adult SVZ.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：脳・神経、発生・分化、神経幹細胞、幹細胞ニッチ、Notch

1. 研究開始当初の背景

近年、哺乳類において成体にも神経幹細胞が存在することが明らかとなり再生医療への期待からもその分化運命制御の研究が活発に行われている。成体マウスにおいて神経幹細胞は脳室下帯や海馬歯状回といった限局した領域にのみ存在することが知られており、その未分化性を維持するニッチの存在が想定されているがその実体は殆ど不明である。

これまでの研究から成体神経幹細胞において Notch が活性化していること、そして Notch の活性化は成体神経幹細胞の未分化性維持に非常に重要であることが知られていた。従って、Notch の活性化を担う Notch リガンド発現細胞がニッチ細胞として神経幹細胞維持に必須の機能を果たす可能性が考えられた。しかし、どの Notch リガンドがどの細胞に発現して Notch を活性化しているのかについては未解明な部分が多い。

2. 研究の目的

成体脳室下帯においてどの Notch リガンドがどの細胞に発現して Notch を活性化しているのかについては未解明な部分が多い。先行研究から、生後初期の脳室において Notch リガンドの一つである Jagged1 が Notch による神経幹細胞の未分化維持に寄与していることは報告されているが、成体脳室下帯における機能は未知である。

研究代表者らのこれまでの研究から Notch リガンドの一つである Dll1 が胎生期マウス大脳神経系前駆細胞の Notch 活性化と未分化性維持に非常に重要なリガンドであることを明らかにした。そこで本研究では、Dll1 に注目し、Dll1 が成体脳室下帯においてどの細胞種に発現しているのか、そして Dll1 発現細胞が Notch の活性化を介してニッチ細胞として神経幹細胞維持に貢献しているのかについて調べることを目的とした。

3. 研究の方法

これまでの研究代表者らによる研究から、成体神経幹細胞が存在する領域である脳室下帯において少なくとも Dll1 発現細胞が存在するという結果が得られていた。しかし、Dll1 発現細胞が神経幹細胞なのか神経幹細胞から分化した一過的増殖細胞・ニューロblastなのかあるいは上皮細胞なのかはわかっていない。そこで、Dll1 発現細胞がどの細胞種なのかを調べるために、主に免疫組織染色法を用いて解析した。

上皮細胞であるかという可能性については上皮細胞マーカーである S100beta と Dll1 を免疫組織染色によって共染色するという方法を用いて解析した。

チミジンアナログ (BrdU, CldU, IdU) を 2 時間程度短時間ラベルした後のチミジンアナログラベル陽性細胞は一過的増殖細胞・ニューロblastとされている。そこで、チミジンアナログ短時間ラベル陽性細胞において Dll1 が発現しているかを免疫組織染色により調べることで Dll1 発現細胞が一過的増殖細胞・ニューロblastであるかを検討した。また、一過的増殖細胞は EGFR や Mash1 といったマーカー分子でラベルできる事が知られているため、これらの分子と Dll1 を共染色する方法も用いた。さらに、ニューロblastであるかどうかについてもマーカー分子である betaIII-tubulin と Dll1 の共染色法により調べた。

神経幹細胞であるかを調べるために、神経幹細胞の増殖速度が非常に遅いことを利用したアッセイ法を用いた。チミジンアナログを数日間ラベルし続けた後に数週間ラベルしない期間をとると増殖の遅い神経幹細胞のみチミジンアナログを保持し続けるこ

とが知られている。そこで、チミジンアナログを長期保持する細胞が Dll1 陽性であるかを免疫組織染色により共染色する方法を用いて調べた。

Notch シグナルは細胞間相互作用によりリガンドからのシグナルを受け取るため、Dll1 発現細胞がニッチ細胞として機能するには、神経幹細胞と Dll1 発現細胞が隣接していることが期待される。前述のように、成体神経幹細胞はチミジンアナログ長期保持細胞として同定できるため、Dll1 陽性細胞とチミジンアナログ長期保持細胞の位置関係を調べることで細胞間相互作用の有無を検討した。

Dll1 の重要性を調べるために研究代表者が所持している Dll1 コンディショナルノックアウトマウス (Dll1 floxed マウス) を用いた解析を行った。研究代表者が所属している研究室はタモキシフェン誘導型かつ神経系特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス (Nestin-CreERT2 マウス) を所持しているため Dll1 を成体において神経系特異的にノックアウトすることが可能である。成体神経系で Dll1 をノックアウトしたマウスの脳室下帯における神経幹細胞の数や一過的増殖細胞の数を調べることで未分化性に対する Dll1 の寄与を検討した。

また、Dll1 が Notch の活性化にどの程度寄与しているのかを明らかにするために、Dll1 コンディショナルノックアウトマウスの脳室下帯における Notch1 の活性化について活性化型 Notch1 を特異的に認識する抗体を用いた免疫組織染色法により調べた。

4. 研究成果

(1) Dll1 は成体脳室下帯において一過的増殖細胞で発現している

Notch リガンドである Dll1 が成体脳室下帯においてどのような発現パターンをするのかを各細胞種マーカーを用いた免疫組織染色法により詳細に解析した。成体脳室下帯には神経幹細胞とその子孫細胞である一過的増殖細胞・ニューロblast、さらには上皮細胞などが存在している。それぞれのマーカーと Dll1 抗体との共染色により Dll1 は一過的増殖細胞に発現していることが明らかとなった。

(2) Dll1 発現細胞は成体神経幹細胞と隣接して存在する

Dll1 発現細胞と成体神経幹細胞との関連について解析を行った。神経幹細胞の適切なマーカーは存在しないが、増殖頻度が非常に遅いという神経幹細胞の性質を利用してチミジンアナログである IdU を長期間保持する細胞を神経幹細胞として解析を行った。その結果、Dll1 発現細胞は IdU 長期保持細胞に隣

接して存在していることが明らかになった (図1)。

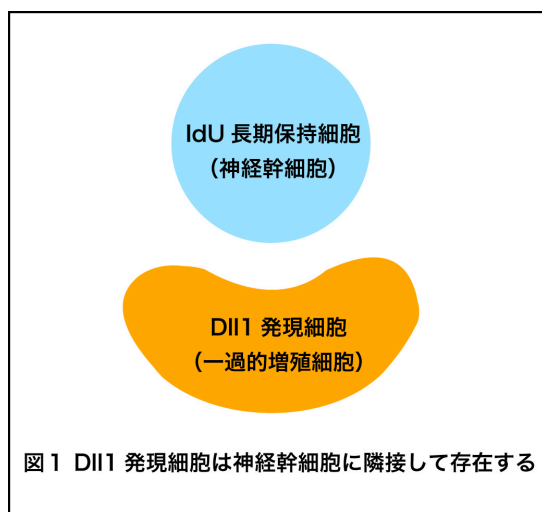


図1 DII1 発現細胞は神経幹細胞に隣接して存在する

(3) 成体脳室下帯における Notch の活性化に DII1 は必要である

DII1 コンディショナルノックアウトマウスとタモキシフェンで Cre リコンビナーゼを誘導できるマウスを用いて成体において DII1 をノックアウトして成体脳室下帯における Notch の活性化を免疫組織染色法により調べた。その結果、DII1 をノックアウトすることで Notch の活性化が著しく減少する事が明らかになった。

(4) 成体神経幹細胞の維持に DII1 は必要である

DII1 コンディショナルノックアウトマウスとタモキシフェンで Cre リコンビナーゼを誘導できるマウスを用いて成体において DII1 をノックアウトして成体神経幹細胞の維持に対する DII1 の寄与を検討した。ノックアウト後における神経幹細胞の数については IdU 長期保持細胞数により評価し、その他の分化細胞の数については短期 ClDU ラベルや各種分化細胞マーカーを用いた免疫染色によりその数を評価した。

その結果、DII1 のノックアウトによって IdU 長期保持細胞数が顕著に減少することが明らかとなった。さらに、チミジンアナログである ClDU を 2 時間程度短時間ラベルした後の ClDU 陽性細胞の数を数えることで一過的増殖細胞・ニューロブラストの数を調べた結果、DII1 のノックアウトにより ClDU 陽性細胞が著しく増加することが分かった。また、ニューロブラストマーカーによる染色によりニューロブラストの数を調べた結果、その数が著しく増加することが明らかになった。

本研究の結果から、DII1 が成体神経幹細胞の Notch 活性化と幹細胞性維持に必須のリガ

ドであることが明らかになった。DII1 陽性の一過的増殖細胞からのフィードバックシグナルにより神経幹細胞の Notch が活性化することで成体神経幹細胞の維持に貢献していることが示唆された (図2)。

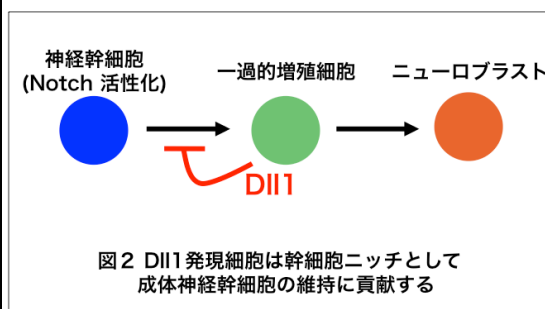


図2 DII1 発現細胞は幹細胞ニッチとして成体神経幹細胞の維持に貢献する

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)

①宮田卓樹、川口大地、川口綾乃、後藤由季子

Mechanisms that regulate the number of neurons during mouse neocortical development

Current Opinion in Neurobiology (査読有り)

20, 2010, 22-28

②川口大地、後藤由季子

神経幹細胞の運命制御に関わるシグナル伝達

最新医学 (査読無し)

64 巻 6 月増刊号, 2009, 1417-1425

[学会発表] (計3件)

①川口大地、後藤由季子

Notch ligand regulation of adult neural stem cells

CDB Symposium 2010

2010 年 3 月 23 日-3 月 25 日、兵庫

②川口大地、後藤由季子

Notch ligand regulation of adult neural stem cells

Global COE International Symposium 2010

2010 年 3 月 5 日、東京

③川口大地、後藤由季子

Notch ligand regulation of adult neural stem cells

Construction and Reconstruction of the Brain

2009 年 10 月 8 日-10 月 10 日、兵庫

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川口 大地 (KAWAGUCHI DAICHI)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号：70549518

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

後藤 由季子 (GOTOH YUKIKO)
東京大学・分子細胞生物学研究所・教授
研究者番号：70252525