

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15180

研究課題名（和文）成体神経幹細胞の形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Roles of cell cycle inhibition in the genesis of adult neural stem cells

研究代表者

原田 雄仁（Harada, Yujin）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・特任助教

研究者番号：50887825

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：胎生期において、神経幹細胞は盛んに増殖し多くの分化細胞を供給することで脳を構築する。一方で、成体の脳にも神経幹細胞が存在し、新たに分化細胞を産むことで脳の恒常性維持や学習・記憶に貢献する。これまでに我々は、大脳脳室下帯の成体神経幹細胞は、盛んに増殖する神経幹細胞ではなく、胎生早期から分裂を抑制した神経幹細胞に由来することを報告した。本研究では、分裂の抑制が成体神経幹細胞の系譜の形成に貢献する分子メカニズムの解明を目指した。その結果、分裂抑制によりNotch-Hey1シグナルが活性化し、Hey1が安定的な発現様式を示すことで成体神経幹細胞になる細胞系譜の形成・維持に貢献することを見つけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成体哺乳類脳には神経幹細胞が存在し、新たに神経細胞を生み出すことによって脳の恒常性維持や学習・記憶に貢献する。この成体神経幹細胞が発生期幹細胞からどのように作られるかは不明であった。本研究では、成体神経幹細胞が胎生期の分裂を抑制した幹細胞集団に由来し、さらに分裂抑制がNotch-Hey1シグナルによってこれら集団の成体までの長期間の幹細胞維持に貢献することを明らかにした。すなわち本研究は、成体神経幹細胞の形成の最初のステップを分子メカニズムとして解明した研究になると考える。

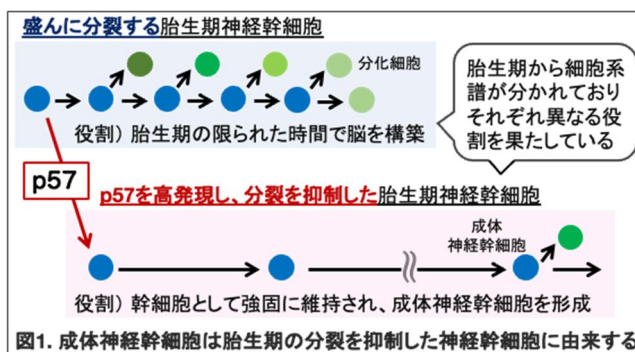
研究成果の概要（英文）：During embryonic development, neural stem cells actively proliferate and provide many differentiated cells to build the brain. On the other hand, adult neural stem cells contribute to brain homeostasis, learning, and memory by producing newly differentiated cells. We have previously reported that adult neural stem cells in the subventricular zone are derived from slowly dividing neural stem cell populations. In this study, we sought to elucidate the molecular mechanisms by which cell cycle inhibition contributes to the formation of adult neural stem cell lineages. We found that cell cycle inhibition activates Notch-Hey1 signaling, which contributes to the formation and maintenance of adult neural stem cell lineages through a stable expression pattern of Hey1.

研究分野：神経発生

キーワード：脳 神経 幹細胞 細胞周期 Notchシグナル

1. 研究開始当初の背景

胎生期において、幹細胞は盛んに分裂し多くの分化細胞を供給することで組織の構築に貢献する。一方で、成体組織に存在する組織幹細胞の多くは、静止状態という分裂を停止した状態を保っており、過剰な増殖を防ぐことで幹細胞の長期維持に貢献する。このように胎生期と成体の組織幹細胞は、その役割の違いから分裂の頻度を大きく異にする。それでは、成体の組織幹細胞は発生の過程でどのように形成されるのだろうか。我々は、大脳脳室下帯に存在する成体神経幹細胞が、盛んに分裂する神経幹細胞ではなく、胎生期から分裂を抑制した神経幹細胞集団に由来することを明らかとした (Furutachi et al., Nature Neuroscience, 2015)。また、CDK (cyclin-dependent kinase) 阻害因子 p57 がこの集団の分裂抑制の責任因子であることを見出し、さらに p57 による分裂の抑制が幹細胞の長期維持を促進し成体神経幹細胞の形成に必須の役割を果たすことを明らかにした (図 1)。次に、分裂の抑制が幹細胞維持に寄与する下流メカニズムを探索し、分裂の抑制が Notch シグナルの下流で Hey1 を選択的に発現誘導し、成体神経幹細胞の形成に貢献することを明らかにした (Harada et al., Nature Communications, 2021, 研究開始時未発表)。しかし、Hey1 がどのように選択的に発現誘導され、どのように幹細胞の維持に寄与するかのメカニズムは不明であった。



2. 研究の目的

本研究では、神経幹細胞において分裂の抑制が幹細胞の維持に寄与するメカニズムを探索し、成体神経幹細胞の系譜の形成機構を明らかにすることを目的とした。特に、(1) Hey1 の発現誘導の上流制御機構 (2) Hey1 の発現ダイナミクス に着目して研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 神経幹細胞において、Notch シグナルの下流では主に、Hey1 の他に Hes1/Hes5 が発現誘導される。この下流因子の使い分けとして、Notch 受容体の違いが示唆されていた。そこで、神経幹細胞で発現が見られる、Notch1, Notch2, Notch3 の活性型タンパク質を、培養系神経幹細胞にそれぞれ発現し、Hes1, Hes5, Hey1 の発現量を調べることで、Notch 受容体の違いによる寄与を検討した。

(2) 神経幹細胞において、Hes1/Hes5 は振動発現を示すことで幹細胞の増殖・分化に寄与する。Hey1 の発現動態を Hes1/Hes5 と比較するため、以下の二つを行った。

培養系神経幹細胞において、Hes5 プロモーターおよび Hey1 プロモーターの活性を測定するレポータープラスミドを導入し、ライブイメージングを行った。

内在性 Hey1 タンパク質の発現動態を調べるために、Hey1 タンパク質の N 末端に蛍光タンパク質 Achilles を融合させた Hey1-Achilles を発現するノックインマウスを作成し、Hey1 の発現をモニターできるか検討を行った。

4. 研究成果

(1) 培養系神経幹細胞において、Notch 受容体核内ドメイン (NICD) を Notch1, Notch2, Notch3 それぞれ発現し、定量 PCR により Hes1, Hes5, Hey1 の発現量を調べた。その結果、Notch1 ICD, Notch2 ICD, Notch3 ICD により Hes5, Hey1 の発現誘導が顕著に見られた。しかしながら、Notch 受容体の違いによる下流の誘導効果の違いは見られなかった (図 2)。この結果は、Notch 受容体の過剰発現であることや、培養系を用いた実験であることから、Notch 受容体による下流の使い分けを否定するものではないと考える。今後それぞれの Notch 受容体を生体内でノックダウンし、Hes1, Hes5, Hey1 の発現量の変化を見ることで、仮説を検討できると考える。また、Hey1 の選択的発現制御のその他の上流候補因子として、Bmp シグナルを考えている。これについても培養系、生体マウス両方から検討する予定である。

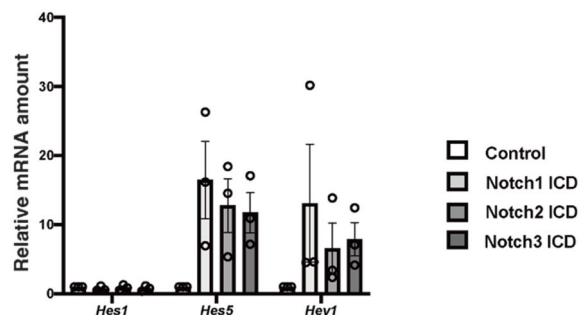


図 2. Notch ICD による Hes1, Hes5, Hey1 の発現変化

(2) 培養系神経幹細胞において、Hey1 プロモーター下流で Luc2 を発現するプラスミドを導入し、Hes5 と比較してプロモーター活性のライブイメージングを行った。その結果、先行研究通り、Hes5 プロモーターの活性は約 90 分周期の振動発現を示した。一方で、Hey1 プロモーターの活性は周期的な変動を見せず、比較的安定した様式を示した(図 3)。発現のピークの数等を定量したところ、Hes5 プロモーターと比べ Hey1 プロモーターの活性のピークは少なかった。これは、Hey1 が Hes5 とは異なり安定した発現を示唆する初めての結果である。これまで、Hes ファミリーと Hey ファミリーの違いを検討した報告は多くなく、非常に新しい知見であると考えられる。

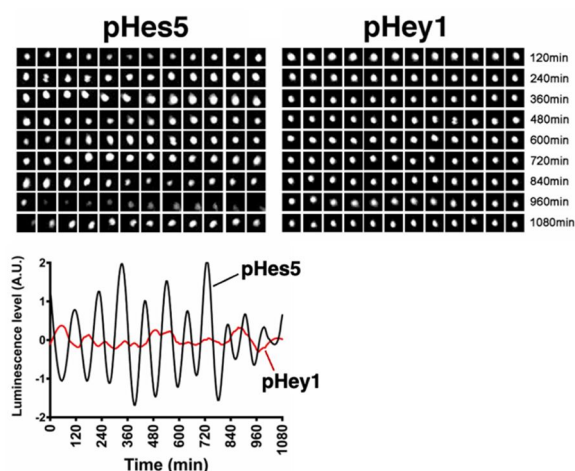


図3. Hes5プロモーターとHey1プロモーターの発現動態の違い

(2) Hey1 タンパク質の N 末端に蛍光タンパク質 Achilles を融合させた Hey1-Achilles を発現するノックインマウスを作成した。Hey1-Achilles マウスから神経幹細胞を単離培養し、Notch 受容体活性阻害剤である Dapt を添加することで、Achilles 蛍光タンパク質の発現量を検討した。その結果、Dapt の添加により Hey1-Achilles の発現量が減少した。また、同様の系で Notch1 ICD を発現したところ、Notch1 ICD により Hey1-Achilles の発現量が増加した。以上から、Hey1-Achilles レポーターは Notch シグナルに応答することが示唆された。さらに Hey1-Achilles マウスの胎生期脳切片を作成し、生体内において Hey1-Achilles 蛍光タンパク質が神経幹細胞に発現している様子を観察した。これにより、今後生体内での内在 Hey1 タンパク質の発現動態を世界で初めて検討できると考える。

< 引用文献 >

1. Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. Shohei Furutachi, Hiroaki Miya, Tomoyuki Watanabe, Hiroki Kawai, Norihiko Yamasaki, Yujin Harada, Itaru Imayoshi, Mark Nelson, Keiichi I Nakayama, Yusuke Hirabayashi, and Yukiko Gotoh, Nature Neuroscience 18, 657-665, 2015
2. Cell cycle arrest determines adult neural stem cell ontogeny by an embryonic Notch-nonoscillatory Hey1 module. Yujin Harada, Mayumi Yamada, Itaru Imayoshi, Ryoichiro Kageyama, Yutaka Suzuki, Takaaki Kuniya, Shohei Furutachi, Daichi Kawaguchi & Yukiko Gotoh, Nature Communications 1-16, 2021

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Harada Yujin, Yamada Mayumi, Imayoshi Itaru, Kageyama Ryoichiro, Suzuki Yutaka, Kuniya Takaaki, Furutachi Shohei, Kawaguchi Daichi, Gotoh Yukiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Cell cycle arrest determines adult neural stem cell ontogeny by an embryonic Notch-nonoscillatory Hey1 module	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-26605-0	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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Harada Yujin, Yamada Mayumi, Imayoshi Itaru, Kageyama Ryoichiro, Kawaguchi Daichi, Gotoh Yukiko
2. 発表標題 Roles of cell cycle inhibition in the genesis of adult neural stem cells
3. 学会等名 ISSCR 2021（国際学会）
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------