

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25891008

研究課題名(和文) 成体神経幹細胞の発生起源とその制御機構

研究課題名(英文) Identification of an embryonic origin of adult neural stem cells

研究代表者

古舘 昌平 (Furutachi, Shohei)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20713192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：私たち哺乳類の脳には、生涯にわたって神経細胞を新生し続ける成体神経幹細胞が存在します。成体神経幹細胞による神経新生は、既存の神経回路を再編成することで学習や記憶、脳の損傷の修復に貢献します。しかし、成体神経幹細胞が発生の過程でどの細胞からどのような仕組みで作りだされるのかはこれまで解明されていませんでした。本研究では、成体神経幹細胞を作り出す特別な幹細胞(以下起源細胞と呼びます)が胎生期の脳に存在することを発見しました。さらに、起源細胞が成体神経幹細胞を作り出す過程で、p57タンパク質が重要な働きを担うことも明らかになりました。

研究成果の概要(英文)：The mechanism by which adult neural stem cells (NSCs) are established during development is unclear. In this study, analysis of cell-cycle progression by H2B-GFP retention analysis reveals that, in a subset of mouse embryonic neural progenitor cells (NPCs), the cell cycle slows down between E13.5-E15.5 while other embryonic NPCs continue to divide rapidly. By allowing H2B-GFP expressed at E9.5 to become diluted in dividing cells until the young adult stage, we show that a majority of NSCs in the young adult subependymal zone (SEZ) originate from these slowly dividing embryonic NPCs. The cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p57 is highly expressed in this embryonic subpopulation and the deletion of p57 impairs the emergence of adult NSCs. Our results suggest that a substantial fraction of adult SEZ-NSCs is derived from a slowly dividing subpopulation of embryonic NPCs and identify p57 as a key factor in generating this embryonic origin of adult SEZ-NSCs.

研究分野：分子生物学

キーワード：神経幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

成体哺乳類の脳には非常に分裂頻度の低い神経幹細胞が存在し、一生の間ニューロンを産み続け、記憶・学習や損傷修復等の重要な機能に貢献している。一方、胎生期に脳を形成する神経系前駆細胞は素早く分裂し、発生段階に従って順序よく様々な種類のニューロンを産み出し、生後にはニューロンを産まなくなり、グリアを産生する前駆細胞になると一般的に考えられている。そこで、(A)成体の神経幹細胞は胎生期に様々な細胞を産み終わった神経系前駆細胞の一部が生後にランダムに選ばれて作られるのか、それとも(B)胎生期の神経系前駆細胞の一部に特別な細胞群が存在し、この細胞群がやがて成体神経幹細胞になるのか大きな疑問となる。

### 2. 研究の目的

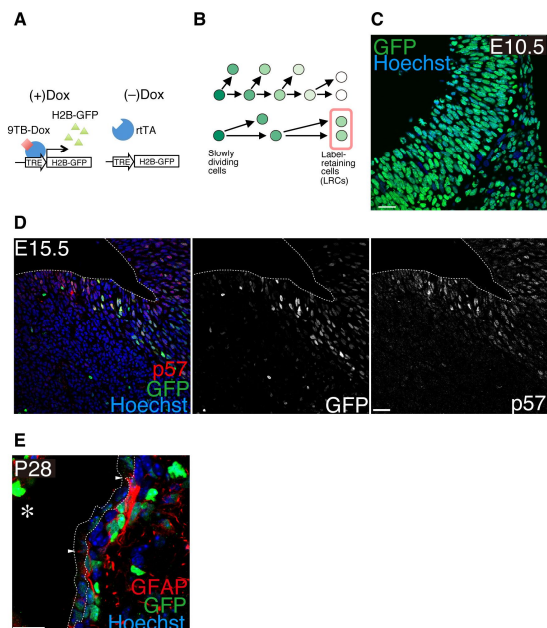
成体の神経幹細胞を始めとする様々な組織幹細胞は、増殖能を保ちつつも稀にしか分裂しない(分裂頻度が低い)ことが知られている。細胞分裂の回数を少なくする事で塩基配列やエピジェネティックな情報の伝達エラーのリスクを減らす事が、幹細胞の自己複製の正確性を保証していると考えられている。実際に我々は神経系においても幹細胞の細胞分裂の頻度を低く保つ事が幹細胞ポテンシャルの長期的な維持に必須である可能性を示してきた。従って、もし胎生期の脳においても「分裂頻度の低い」細胞群が存在するならば、その細胞群は成体神経幹細胞の起源細胞であり幹細胞のポテンシャルを維持し続ける可能性があると考えられる。そこで本研究で、分裂頻度の低い細胞ほどヒストン H2BGFP タンパク質によって強くラベルされる系(図 1A, B)を用いて検討を行なった。その結果、胎生期において既に神経幹細胞の一部に「分裂頻度の低い」細胞集団が存在すること、その細胞群が将来成体神経幹細胞になることを示す結果を得た。そこで次に、「分裂頻度の低い」細胞群、つまり成体神経幹細胞の起源細胞がいかなる分子メカニズムによって神経系前駆細胞の中から作り出されるのかを検討した。

### 3. 研究の方法

- (1) 本研究において我々はまず、胎生期神経幹細胞を分裂頻度に応じて蛍光標識することで、神経幹細胞の中に際立って分裂頻度の低い細胞が存在するかを検討した。具体的には、Doxycyclin 依存的にヒストン H2BGFP を発現する Tet-on システムをゲノムに持つ Rosa-rtTA, TRE-H2BGFP 遺伝子改変マウスを用いて H2BGFP を一過的に発現させ、その後分裂頻度の低い細胞ほど H2BGFP が希釈されず保持され

る事を利用した(図 1A-C)。その結果、胎生 9.5 日目から H2BGFP の希釈を行なったマウス大脳で、H2BGFP を際立って多量に保持している細胞群が観察された(図 1D)。従って、胎生期大脳に際立って分裂頻度の低い細胞群が存在(出現)する事が示された。また、これと同じ時期に H2BGFP の希釈を開始したマウスの成体大脳を観察したところ、成体神経幹細胞の約 7 割が H2BGFP を保持していた(図 1E)。以上の結果は、成体神経幹細胞は、胎生期において H2BGFP を保持している細胞群に由来することを示唆している。さらに、成体神経幹細胞の分裂を抑制する分子である p57 の免疫染色を行ったところ、胎生期において H2BGFP を保持している細胞群(以下起源細胞と呼ぶ)では p57 タンパク質が高発現していることが示された(図 1D)。

図 1. H2BGFP の希釈に基づいた分裂



頻度の低い細胞の蛍光ラベル (A) Doxycyclin (Dox) 依存的にヒストン H2BGFP を発現する Tet-on システムをゲノムに持つ Rosa-rtTA, TRE-H2BGFP 遺伝子改変マウスを用いて H2BGFP を一過的に発現させた。Dox は胎生 9.5 日目に投与した。(B) 分裂頻度に応じたラベルの原理。分裂頻度の低い細胞ほど H2BGFP で強くラベルされる。(C) H2BGFP 誘導から 1 日後(胎生 10.5 日目)のマウス大脳。ほぼ全ての神経幹細胞で H2BGFP が発現していた。緑, GFP。(D) 胎生 15.5 日目のマウス大脳切片の免疫組織染色像。大脳基底核の脳室帯で H2BGFP 保持細胞が観察された。また H2BGFP 保持細胞では p57 が強く染色された。緑,

GFP;赤, p57; 青, Hoechst. (E) 生後 28 日目のマウス大脳組織切片. 側脳室 脳室下帯で GFAP 陽性の H2BGFP 保持細胞が観察された. 緑, GFP; 赤, GFAP; 青, Hoechst.

- (2) 次に、「分裂頻度の低い」細胞群、つまり成体神経幹細胞の起源細胞がいかなる分子メカニズムによって胎生期の神経幹細胞の中から作り出されるのかを検討した。前述のように起源細胞群では細胞周期の進行を負に制御する p57 が高発現していたので、p57 タンパク質が起源細胞と成体神経幹細胞において果たす機能を検討した。具体的には、脳で p57 タンパク質が作られないマウス(Nestin-Cre, p57 fl/+マウス)を作製し、その脳組織を詳細に観察した。その結果、Nestin-Cre, p57 fl/+マウスでは正常マウス(p57 fl/+)と比較して成体神経幹細胞(GFAP+ Sox2+ S100b-の染色により定義)の数が著しく減少していた(図 2A, B)。従って、p57 タンパク質が起源細胞において単に細胞周期の進行を遅らせているだけではなく、成体神経幹細胞の形成において必須の役割を果たしていることが示唆された。

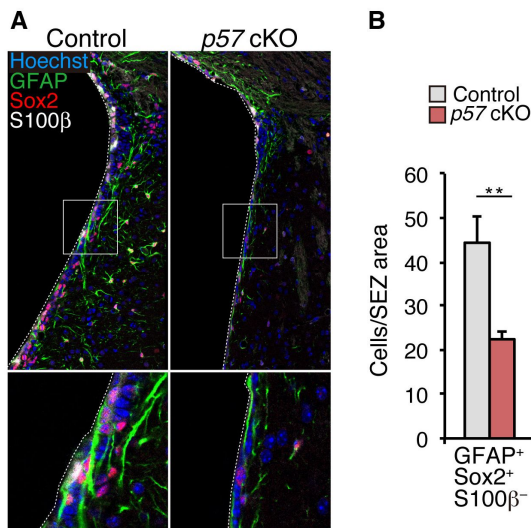


図 2. 中枢神経系特異的 p57 ノックアウトによる成体神経幹細胞の減少 (A) Nestin-Cre, p57 fl/+ (p57 cKO)マウスと p57 fl/+(control)マウスの大脳切片の免疫組織染色像. 緑, GFP; 赤, GFAP; 青, Hoechst. p57 cKO マウスでは control と比較して成体神経幹細胞(GFAP+ Sox2+ S100b-)の数が減少した. (B) A の定量. Bars: mean ± sem. \*\* < 0.01.

- (3) 最後に p57 タンパク質が成体神経幹細胞を作り出す過程で単に必須なだけなのか、それとも高発現することで積極的に成体神経幹細胞を作り出す役割を

果たすのかを検討した。具体的には p57 タンパク質を GFP とともに発現する Virus と RFP のみを発現する Virus を作成し、それらを一定の割合で混合した後に胎生期 13.5 日目の神経幹細胞に感染させた。その後、胎生 16.5 日目、胎生 18.5 日目、生後 30 日目において RFP 陽性の神経幹細胞に対する GFP 陽性(p57 高発現)の神経幹細胞の比率を求めた。その結果、RFP 陽性の神経幹細胞に対する GFP 陽性神経幹細胞の比率が徐々に高まることが分かった。従って、p57 の高発現は神経幹細胞を未分化な状態に保ち成体神経幹細胞の形成に貢献することが示唆された。

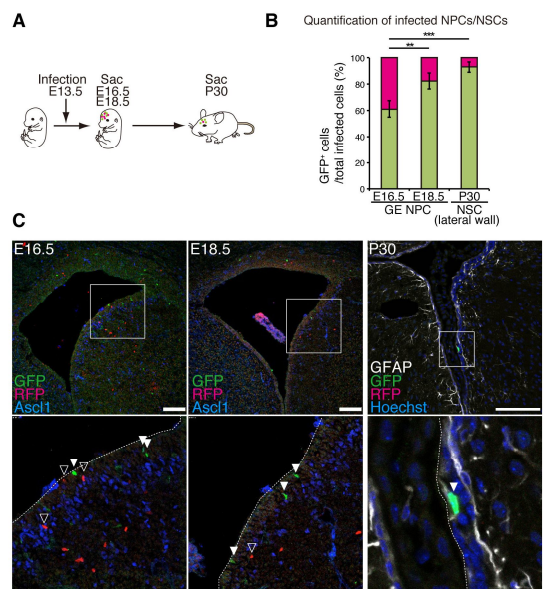


図 3. p57 の過剰発現による成体神経幹細胞の形成の促進

(A) p57 タンパク質を GFP とともに発現する Virus と RFP のみを発現する Virus を作成しそれらを一定の割合で混合した後に胎生期 13.5 日目(E13.5)の神経幹細胞に感染させた。その後、胎生 16.5 日目 (E16.5)、胎生 18.5 日目 (E18.5)、生後 30 日目 (P30)にマウスを解剖して大脳切片を作成した。(B) 各時期での RFP 陽性の神経幹細胞に対する GFP 陽性(p57 高発現)の神経幹細胞の比率. RFP 陽性の神経幹細胞に対する GFP 陽性神経幹細胞の比率は徐々に上昇した. Bars: mean ± sd. \*\* < 0.01; \*\*\* < 0.001. (C) 各時期の大脳切片の免疫組織染色像. 緑, GFP; 赤, RFP; 青, Ascl1 (E16.5, E18.5). 緑, GFP; 赤, RFP; 青, Hoechst; 白, GFAP (P30).

#### 4. 研究成果

以上のように、胎生期の神経幹細胞の



一部に分裂頻度を低く保った特別な神経幹細胞(起源細胞)群が存在し、その細胞群が成体神経幹細胞になることが本研究より明らかになった。この発見は、成体神経幹細胞が発生の過程でいかにして作りだされるかという大きな疑問に対して全く新しい回答を与えるものである。さらに、胎生期の脳の中で素早く分裂を重ねる神経幹細胞と分裂頻度の低い起源細胞が共存し、それぞれ「短期間での脳の発生」と「長期間の幹細胞維持」という二つの役割を別々に担当しているという、非常に合理的なシステムが採用されていること示している。また、細胞周期制御因子 p57 をノックアウトすると成体神経幹細胞が減少する事、p57 の過剰発現によって成体神経幹細胞の形成が促進される事が明らかになった。つまり、胎生期の幹細胞から成体神経幹細胞への転換の引き金となりうる「鍵となる分子」を同定したことになる。さらに、これまで組織幹細胞の分裂頻度が低いことの意義は長期間に渡る幹細胞プールの維持であると考えられて来たが、組織発生において多くの前駆細胞が活発に分裂し分化して行く中で、一部の前駆細胞が「分裂頻度を低くする」ことにより未分化性を強固に維持し神経幹細胞の形成に貢献するという可能性が考えられる。これは幹細胞における細胞周期制御の意義として非常に新規性の高い概念である。

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3件)

Kawaguchi, D., Furutachi, S., Kawai, H., Hozumi, K. & Gotoh, Y. Dll1 maintains quiescence of adult neural stem cells and segregates asymmetrically during mitosis. *Nat Commun* **4**, 1880 (2013). doi:10.1038/ncomms2895 査読あり

Furutachi, S., Matsumoto, A., Nakayama, K.I. & Gotoh, Y. p57 controls adult neural stem cell quiescence and modulates the pace of lifelong neurogenesis. *EMBO J* **32**, 970-981 (2013). DOI: 10.1038/emboj.2013.50 査読あり

Furutachi, S., Imayoshi I., Nakayama, K.I. & Gotoh, Y., et al. Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nat Neurosci* **18**, 657-665 (2015). doi:10.1038/nn.3989 査読あり

[学会発表](計4件)

“Slow and steady wins the race”

Shohei Furutachi and Yukiko Gotoh  
3rd German-Japanese Bilateral Event on Neural Stem Cells and Mammalian Neurogenesis

"Laforet Zao Resort & Spa"

口頭発表、2013年10月13-16日

Emergence of a slowly dividing origin of adult neural stem cells during embryogenesis

Shohei Furutachi and Yukiko Gotoh

Abcam Meeting; Neurogenesis 2013 in Matsushima

Hotel Matsushima Taikanso(松島), 2013年10月16-18日

Emergence of a slowly dividing origin of adult neural stem cells during embryogenesis

Shohei Furutachi, Taruho Endoh and Yukiko Gotoh

第36回日本分子生物学会 神戸ポートアイランド(神戸)

2013年12月3-6日

『An Embryonic Origin of Adult Neural Stem Cells』

Shohei Furutachi and Yukiko Gotoh

Gordon Research Semminer: "Neural Development"

2014年7月 Newport, USA

[図書]なし

[産業財産権]なし

[その他]

東京大学 プレスリリース

[http://www.u-tokyo.ac.jp/public/public01\\_270331\\_04\\_j.html](http://www.u-tokyo.ac.jp/public/public01_270331_04_j.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古舘昌平 (FURUTACHI, Shohei)  
東京大学大学院薬学系研究科 助教  
研究者番号：20713192

### (2) 研究分担者

#### (3) 連携研究者

後藤由季子 (GOTOH Yukiko)  
東京大学大学院薬学系研究科 教授  
研究者番号：70252525

中山敬一 (NAKAYAMA I. Keiichi)  
九州大学生体防御医学研究所 教授  
研究者番号：80291508

今吉格 (IMAYOSHI Itaru)  
京都大学ウイルス研究所  
白眉プロジェクト 特定准教授  
研究者番号：60543296