

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07116

研究課題名(和文) 神経幹細胞の可塑性を制御する分子基盤

研究課題名(英文) A genetic approach for the understanding of the brain micro-environment that regulates the plasticity of neural stem cells

研究代表者

菅田 浩司 (KANDA, Hiroshi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：60508597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子やシグナル伝達機構が進化的に保存された優れたモデル生物であるショウジョウバエを用いて、分裂休止期にある神経幹細胞の再活性化を駆動する分子基盤についての解析を行った。本研究において、脂質代謝酵素の機能欠失型変異体では神経幹細胞の再活性化時に特徴的な細胞死が観察されることを見出した。遺伝学、イメージング解析、ex vivo 培養系など、複数の実験系を用いてこの遺伝子の解析を行った結果、神経幹細胞の再活性化には、神経伝達物質であるアセチルコリン量の制御が不可欠であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成体脳で行われるニューロンの新生は記憶の形成、ストレスからの回復、本能行動などに重要であると考えられており、これが抑制されることで抑鬱などの原因となる事が示唆されている。しかし、発生初期のニューロン新生を経て一旦分裂を休止した神経幹細胞が再活性化する分子機構はこれまでほとんど明らかにされていなかった。我々が本研究によって見出した知見は、上記の課題を解き明かす上で前衛的な知見となり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It has long been reported that adult neural stem cells (NSCs) possess significant plasticity. Interestingly, the plasticity of NSCs is also observed in lower organisms such as invertebrates. We have elucidated the molecular basis of how quiescent neural stem cells are reactivated by using powerful *Drosophila* genetics. We found that an evolutionarily conserved metabolic enzyme, whose function is required for the lipid metabolism, is required for the proper reactivation of NSCs. We found that this cell death is induced by cholinergic neuron-dependent manner. In addition, the acetylcholine level was increased in the mutant animals. The inhibition of the degradation of acetylcholine also attenuated the reactivation of wild-type quiescent neural stem cells ex vivo.

研究分野：神経化学

キーワード：ショウジョウバエ 神経幹細胞 Neuroblast 再活性化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

19世紀初頭より、一旦発生期を経過すると中枢神経系は新生も再生もしないとされてきた。しかし、Joseph Altman による成体ラット脳における神経新生の報告をはじめとして、成体における神経新生が複数の研究グループから報告され、1998年には成人脳においても神経が新生していることが示された (Eriksson *et al. Nature Med.* 1998)。さらに近年の研究から、胎児期及び成体脳内における神経新生の分子基盤が徐々に明らかとなり、神経幹細胞が予想をはるかに上回る可塑性を有することがわかってきた。一例として、分裂をほとんど休止していた神経幹細胞が神経新生を再活性化させることが複数の研究グループから報告されている (Fuentelba *et al. Cell* 2015, Furutachi *et al. Nature Neurosci.* 2015)。一方で、分裂を休止していた神経幹細胞が再活性化する生理的な意義や一連の現象を制御している分子機構については今だに明らかでない点が多い。その大きな原因として、加齢と共に神経幹細胞数が顕著に低下する点、ならびに休止期にある神経幹細胞を同定して解析することが極めて困難である点などが挙げられる。近年の研究から、優れたモデル生物であるショウジョウバエにおいても、神経幹細胞 (Neuroblast; NB) が休止期を経て再活性化することが明らかとなった (Homen and Knoblich *Development* 2012)。すなわち、分裂休止、再活性化を伴う神経幹細胞の可塑性制御は種を超えて普遍的に認められる現象であると考えられる。さらに、ショウジョウバエにおいてはほぼ全ての NB が特定の発生ステージで再活性化することから、基本的に再活性化する NB を同定する必要がない。これらの理由から、ショウジョウバエを用いた実験系は神経幹細胞の再活性化を制御する分子機構を解析する上で優れた *in vivo* モデル系であると考えられる。我々は、ショウジョウバエを用いて中枢神経系の発生に不可欠である遺伝子のスクリーニングを行う過程で、脂質代謝酵素の機能欠失型変異体では NB に特徴的な細胞死が観察されることを見出した。この細胞死は、休止期の NB が再活性化する際に特に顕著に認められることから、この脂質代謝酵素の活性は NB の再活性化に不可欠であると考えられた。そこで、変異体ならびに野生型 NB の再活性化機構を解析することで、NB の再活性化を制御する分子機構の解明を試みた。

2. 研究の目的

ショウジョウバエの遺伝学を応用することで、再活性化時の変異体 NB で誘導される細胞死の実行機構を明らかにする。さらに、変異体の解析によって得られる知見をもとに解析を進めることで、野生型休止期 NB の再活性化を駆動する分子基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

予備実験では孵化後 24 時間目の変異体 NB で強い細胞死が確認された (図 1)。また、他の組織幹細胞や組織では顕著な細胞死は観察されなかった。そこでまず、変異体 NB において細胞死が誘導される時期を特定した。この目的のために、胚期、孵化後 0, 12, 24, 48, 72 時間における細胞死の検出を試みた。

次に、変異体における NB 細胞死の誘導に不可欠である責任組織を同定した。この目的のために、変異体において、GAL4/UAS 異所発現システムを用いて組織特異的に原因遺伝子の cDNA を強制発現させ、レスキュー実験を行った。cDNA は全身、NB、ニューロン、グリア、消化管、筋肉、脂肪組織、トラキア に特異的な GAL4 ドライバーによって強制発現させた。さらに、遺伝学的・生化学的な手法によって細胞死を誘導する分子機構の解析を行った。

さらに、変異体で得た表現型が野生型個体を用いた実験でも再現できるかを検証した。NB 再活性化の実行は幼虫体内の栄養環境に依存するため、再活性化の開始時期は食餌量に起因する個体差が大きい。この点を克服するために、孵化後 12 時間の野生型個体から脳を摘出し、*ex vivo* で NB の再活性化を誘導した。NB の再活性化には脂肪組織 (fat body) に由来する因子が不可欠であることが報告されている。そこで *ex vivo* での培養液中に成虫 fat body の抽出液を加えることで NB の再活性化を誘導した。本実験系において、さらに遺伝学的・薬理的な手法を用いて NB を操作することで、再活性化に対する影響を解析した。

4. 研究成果

胚ならびに孵化直後の変異体 NB では細胞死は全く認められないのに対して、孵化後 12 時間では複数の NB で細胞死を認め、24 時間以降では半数以上の NB で細胞死を認めたことから、NB の再活性化と細胞死との相関関係が予想された。そこで、NB の再活性化を抑制することで、NB の細胞死に対する影響を解析した。孵化後の幼虫が食餌を行うことで体循環するアミノ酸濃度が上昇する。アミノ酸はトランスポーターを介して脂肪体 (fat body; FB) に取り込まれて FB を活性化する。これが契機となり、FB 由来の因子が NB のインスリンシグナルを活性化することで再活性化を誘導することが知られている。そこで、まず変異体幼虫にアミノ酸含量が通常の 1/10 である餌を与えることで体循環するアミノ酸濃度の上昇を抑制した。その結果、NB の細胞死ならびに個体の致死性を顕著に抑制することができた。グルコースを 1/10 に減量した餌では

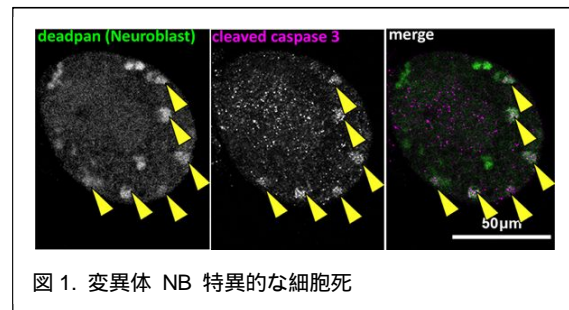


図 1. 変異体 NB 特異的な細胞死

同様の効果は認められなかった。さらに、遺伝学的な手法を用いて変異体 FB のアミノ酸トランスポーターの発現を抑制した際、ならびに NB にインスリン受容体のドミナントネガティブ体を強制的に発現させて NB の再活性化を抑制した際に NB の細胞死が顕著に抑制された。以上の結果から、変異体 NB の細胞死は NB の再活性化に伴って誘導されると考えられる。

次に、細胞死の原因となる組織の特定を試みた。変異体 NB 特異的に目的酵素の cDNA を強制発現しても細胞死は抑制できなかった。一方でニューロン特異的に発現させた際には細胞死をほぼ完全に抑制した。グリア、消化管、筋肉、脂肪組織、トラキア 特異的に発現した際にも細胞死は抑制されなかった。以上の結果から、この酵素のニューロンでの機能が低下すると NB の細胞死が誘導されると考えられる。そこで、同様に神経サブタイプ特異的なレスキュー実験を行った。その結果、コリン作動性神経で発現させた場合にのみ、変異体 NB の細胞死が抑制された。GABA 作動性、ドパミン作動性、グルタミン酸作動性、セロトニン作動性の神経に発現させた際には抑制できなかった。さらに、変異体ではアセチルコリン量が有意に増加していることを見出した。以上の結果から、変異体では何らかの分子機構によってアセチルコリン量が増加し、コリン作動性神経の機能が亢進している可能性が考えられる。

変異体で得た知見をさらに検証する目的で、野生型個体の NB において、アセチルコリン及びコリン作動性神経の機能を亢進させる実験を行った。この目的のために孵化後 12 時間目の幼虫から脳を摘出し、*ex vivo* で培養を行った。培養液中に FB の抽出液を添加することで NB の DNA 合成ならびに細胞分裂が有意に増加することから、*ex vivo* で NB の再活性化を誘導できていると考えられる。この条件下で培養液中にコリンエステラーゼの阻害剤であるドネペジルを添加すると、NB の DNA 合成ならびに細胞分裂は顕著に抑制された (図 2)。アセチルコリンエステラーゼの阻害剤であるリバスタチグミン添加時にも同様の効果が得られた。一方で、NB が再活性化した後の孵化後 60 時間目の幼虫から摘出した脳の *ex vivo* 培養系に上記の薬剤を添加しても、NB の増殖は抑制されなかった。これらの結果から、過剰なアセチルコリンは NB の再活性化時特異的に阻害作用を発揮していると考えられる。

今後はアセチルコリンならびにコリン作動性神経の内因性の NB の再活性化における意義を明らかにする。この目的のために、アセチルコリン受容体の機能欠失型変異体を用いた解析を行う予定である。

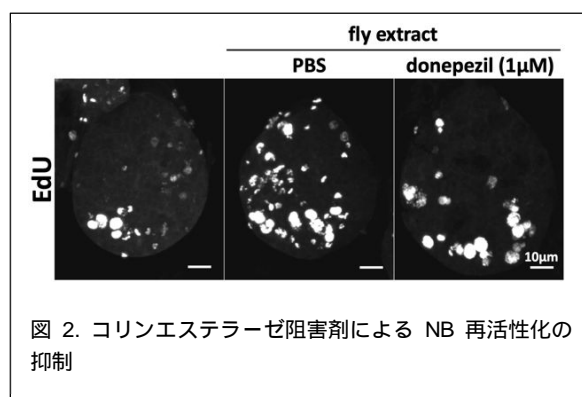


図 2. コリンエステラーゼ阻害剤による NB 再活性化の抑制

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanda H, Shimamura R, Koizumi-Kitajima M, Okano H.	4. 巻 16
2. 論文標題 Degradation of Extracellular Matrix by Matrix Metalloproteinase 2 Is Essential for the Establishment of the Blood-Brain Barrier in Drosophila	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 218-229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2019.05.027.	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hiroshi Kanda, Rieko Shimamura, Michiko Koizumi-Kitajima, Hideyuki Okano
2. 発表標題 Evolutionarily conserved molecules regulate the integrity of Blood-Brain Barrier in Drosophila
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅田浩司
2. 発表標題 血液脳関門の普遍原理の解析
3. 学会等名 第2回淡路ショウジョウバエ研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kanda H, Yamaguchi T, Shimamura R, Sugiura Y, Honda K, Suematsu M, Yoshinari Y, Niwa R, and Okano H.
2. 発表標題 A genetic approach for the understanding of the brain micro-environment that regulates the plasticity of neural stem cells.
3. 学会等名 59th Annual Drosophila Research Conference（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菅田浩司
2. 発表標題 脳内微小環境による神経幹細胞の可塑性制御
3. 学会等名 京都大学大学院生命科学研究科 生命科学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菅田浩司
2. 発表標題 神経幹細胞の可塑性を制御する脳内微小環境の解析
3. 学会等名 第1回淡路ショウジョウバエ研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroshi Kanda, Taro Yamaguchi, Rieko Shimamura, Yuki Sugiura, Makoto Suematsu, Hideyuki Okano
2. 発表標題 A genetic approach for the understanding of the brain micro-environment that regulates the plasticity of neural stem cells
3. 学会等名 25th European Drosophila Research Conference（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 菅田浩司, 島村理恵子, 山口太朗, 北島美智子, 杉浦悠毅, 末松誠, 岡野栄之
2. 発表標題 Brain microenvironment regulates the plasticity of neural stem cells
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 菅田浩司	4. 発行年 2020年
2. 出版社 クバプロ	5. 総ページ数 346
3. 書名 ブレインサイエンス・レビュー2020	

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://www.okano-lab.com

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
---------------------------	-----------------------	----