

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03260

研究課題名(和文) リソソームによる神経幹細胞の微小環境制御と加齢による変化の解析

研究課題名(英文) Microenvironmental regulation of neural stem cells and age-related changes by lysosomes

研究代表者

小林 妙子 (Kobayashi, Taeko)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：40402804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,000,000円

研究成果の概要(和文)：成体脳内の神経幹細胞は、ほとんどが増殖を停止した「休眠状態」にある。我々はその休眠がリソソームによって制御されていることを示してきた。我々は本研究課題で新たな制御機構を二つ明らかにした。まず、幹細胞の微小環境である幹細胞ニッチの制御に着目し、細胞外分泌小胞のエクソソームについて解析した。その結果、休眠神経幹細胞のエクソソームによる翻訳抑制を明らかにした。また、脳内のリソソームの活性を測定する新たなプローブを開発し、様々な年齢や疾患モデルマウスでの解析から、そのタンパク質分解活性が神経幹細胞内でダイナミックに変化していることを見出した。以上の成果から2報の原著論文を作成し、公表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大人の脳内に存在する神経幹細胞は、ほとんどが増殖や分化を停止した「休眠状態」で維持される。休眠は一生に渡って脳内に幹細胞を維持するための必須のメカニズムであるが、加齢に伴って活性化されにくくなるため、脳内での休眠制御の分子機構の解明は、学術的にも非常に重要な課題である。我々は本研究課題によって、2つの新たな神経幹細胞の制御機構を明らかにした。一つは細胞外分泌小胞のエクソソームによる制御であり、もう一つは加齢や疾患に伴う脳内神経幹細胞でのリソソームの機能変化についてである。これらの成果は、神経幹細胞を利用した脳疾患の予防や治療法の開発につながる基礎研究であり、社会的な意義も非常に高い。

研究成果の概要(英文)：Neural stem cells in the adult brain are mainly in a quiescent state in which they have stopped proliferating and differentiating. We have demonstrated that lysosomes regulate neural stem cell quiescence. We have identified two new regulatory mechanisms in this research project. First, we focused on controlling the stem cell niche, the unique microenvironment for stem cells and analyzed the exosomes of extracellular secretory vesicles. As a result, we revealed translational repression by secreting exosomes with ribosomes in quiescent neural stem cells. Second, we have also developed a new monitoring probe to quantify the proteolytic activity of lysosomes in brain neural stem cells. As a result, we found that lysosomal proteolytic activity is dynamically altered in neural stem cells during brain maturation, brain aging, and brain disease using Alzheimer's model mice. Based on these research results, two original papers were published.

研究分野：発生生物学

キーワード：成体神経幹細胞 休眠 エクソソーム リソソーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大人の脳に存在する成体神経幹細胞は、ほとんどが増殖を停止した「休眠状態」で維持されている。休眠状態は一生涯に渡って脳内に幹細胞を維持するために必須のメカニズムである。我々はこれまでの研究から、神経幹細胞の休眠状態がリソソーム活性によって制御されていることを見いだしてきた。しかし、リソソームが脳組織内でどの様に神経幹細胞群を制御しているのかの詳細は不明であった。

成体神経幹細胞は、神経幹細胞ニッチと呼ばれる微小環境によって維持されている。リソソームは、細胞内の最終分解を行う細胞小器官だが、それだけではなく細胞外へのリソソーム成分の分泌等により周辺環境を変化させる機能を持つことが報告されていた。本研究課題では、リソソームによる脳内の成体神経幹細胞の微小環境制御を明らかにすることを目的として研究を開始した。また、マウスを用い加齢変化に着目した。

これらの解析から得られた新たな分子機構は、神経幹細胞の機能低下により発症する認知症などの退行性脳疾患の予防や治療に貢献できると考えられた。

2. 研究の目的

リソソームによる脳内微小環境の新たな制御メカニズムを明らかにすることを目的とし、細胞内の最終分解の場（いわゆるごみ処理場）であると考えられてきたリソソームの新しい機能に着目した。リソソームという新たな視点から、加齢に伴う神経幹細胞の機能変化や微小環境変化を明らかにしようとした。リソソームや細胞外分泌小胞を精製してオミクス解析を行うことで、その分子機構を明らかにしようとした。

3. 研究の方法

(1) 神経幹細胞由来の細胞外小胞（エクソソーム）の精製およびプロテオミクス解析

「増殖神経幹細胞」、休眠を誘導した「休眠神経幹細胞」、休眠から再活性化を誘導した「再活性化神経幹細胞」の三つの神経幹細胞から細胞外分泌小胞を精製し、プロテオミクス解析によってタンパク質成分を同定した。培養神経幹細胞を用い、休眠化には **BMP** を添加して3日培養を行い、再活性化には休眠神経幹細胞の培地から **BMP** を除き、**EGF** を添加して2日培養を行った。

エクソソームは培養上清から超遠心による濃縮によって精製した。精製エクソソームは、**Nanosight** を用いた粒径分布解析、電子顕微鏡を用いた形態解析、マーカートンパク質のウェスタンブロッティングによって確認を行ったのち、京都大学薬学部、石濱泰先生、今見考志先生との共同研究により質量分析によるタンパク質成分の分析を行った。その結果、休眠神経幹細胞由来のエクソソームに特異的にリボソーム成分が多く含まれることがわかった。

一般に休眠(静止)状態にある細胞はタンパク質の翻訳が低下していることが報告されている。神経幹細胞においても休眠を誘導するとタンパク質の翻訳が低下するが、そのメカニズムは明らかになっていなかった。

エクソソームによるリボソームタンパク質の放出による翻訳抑制の可能性を考え、エクソソーム阻害剤(**GW4869**)を用い、タンパク質の翻訳をピューロマイシニンアナログである **OP-puro** を用いて測定した。その結果、エクソソーム分泌阻害によって休眠状態の神経幹細胞のタンパク質翻訳が明らかに上昇することがわかった。また、増殖マーカーである **Ki-67** や **MCM2** の発現を調べると、エクソソーム阻害剤の添加により、神経幹細胞の休眠化が遅延すること、休眠からの再活性化が誘導されることが示された。

(2) 脳内神経幹細胞のリソソーム活性の定量

脳内の神経幹細胞における「リソソームのタンパク質分解の活性」について解析を行った。千葉大学の板倉英祐先生が開発したプローブを用いた。このプローブはリソソーム局在タンパク質に **mCherry** と **sfGFP** をタンデムに繋いだものであり、**GFP** はリソソームにて分解されるが

mCherry は安定であるため、mCherry と GFP の免疫染色の強度比をとることでリソソーム活性を定量し数値化できる。

このリソソーム活性をモニターするプローブ(Lysosomal activity monitoring probe: LysoMonitor (LyMo))をマウス脳の神経幹細胞に発現させ、海馬神経幹細胞について解析を行った。その結果、脳内の神経幹細胞におけるリソソーム活性は、成熟に伴って上昇すること、成体ではその状態で維持されているが、加齢によって低下すること、その低下のタイミングは脳疾患モデルマウスではより早期の段階で起こることが示された。

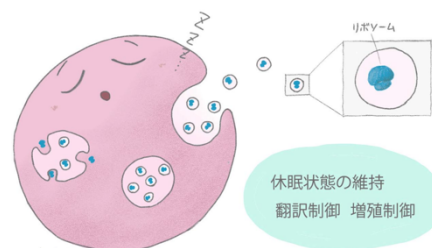
(3) 神経幹細胞のリソソーム成分の同定

「増殖神経幹細胞」、「休眠神経幹細胞」、「再活性化神経幹細胞」の三つの状態の神経幹細胞から密度勾配遠心法を用いてリソソームを精製し、石浜先生と今見先生との共同研究により、プロテオミクス解析を行ってタンパク質成分を同定した。三つの状態によって異なるタンパク質が同定されており、これらの因子については、現在解析を進めているところである。

4. 研究成果

(1) Zhang, J., Uchiyama, J., Imami, K., Ishihama, Y., Kageyama, R. and ***Kobayashi, T.**
Novel roles of small extracellular vesicles in regulating the quiescence and proliferation of neural stem cells. *Front. Cell. Dev. Biol.* 9, 762293 (2021)

細胞外分泌小胞であるエクソソームは、タンパク質や RNA などを含み様々な機能をもつことが示されている。しかし、神経幹細胞の休眠制御における役割は不明であった。我々は、増殖・休眠・再活性化の三つの状態の神経幹細胞から分泌されるエクソソームを精製し、その成分分析を行った。タンパク質成分に着目し定量プロテオミクス解析を行った結果、休眠状態特異的にリボソーム成分が多く含まれていることを見いだした。エクソソーム阻害剤処理は、休眠神経幹細胞の翻訳を促進し、再活性化して再び増殖を始める細胞を誘導した。休眠状態ではタンパク質の新規合成は抑制されていることから、休眠神経幹細胞はリボソームをエクソソームを使って細胞外に排出することにより、翻訳を低く制御していると考えられる。この結果から、リボソームの細胞外分泌によるタンパク質翻訳抑制という神経幹細胞の「休眠」を制御する新しいメカニズムを明らかにした。



(2) Zhang, H., Ishii, K., Shibata, T., Ishii, S., Hirao, M., Lu, Z., Takamura, R., Kitano, S., Miyachi, H., Kageyama, R., Itakura, E. and ***Kobayashi, T.**
Fluctuation of lysosomal protein degradation in neural stem cells of postnatal mouse brain. *BioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2023.05.12.540513> (2023, preprint)

リソソームは、様々な経路から送られてくる多様な高分子を細胞内で最終分解する細胞内小器官である。近年、リソソームが神経幹細胞の制御に重要であることが示されているが、これらの脳組織内の神経幹細胞におけるリソソームの活性の変化については明らかになっていなかった。我々は、脳組織におけるリソソームタンパク質の分解を免疫染色で定量し数値化する新しいプローブを開発した。このプローブ(Lysosomal activity monitoring probe: LysoMonitor (LyMo))を発現するマウス脳の解析より、神経幹細胞におけるリソソームのタンパク質分解の活性が、年齢や脳疾患によって変動することを明確に示した。まず、若齢期での海馬歯状回の成熟過程において神経幹細胞のリソソーム活性は上昇すること、一方、加齢により活性が低下すること、アルツハイマー病モデルマウスにおいてはその活性低下のタイミングがより早くなることがわかった。また、滑車による運動は神経幹細胞やアストロサイトのリソソーム活性を全体的に上昇させた。これらの結果から、我々は、LyMo マウスを用いて、リソソーム活性の3つの異なる段階、すなわち、発生時での増加、成人時での安定した状態、加齢や疾患による減少を定量解析により明確に示すことに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Zhang He, Ishii Karan, Shibata Tatsuya, Ishii Shunsuke, Hirao Marika, Lu Zhou, Takamura Risa, Kitano Satsuki, Miyachi Hitoshi, Kageyama Ryoichiro, Itakura Eisuke, Kobayashi Taeko	4. 巻 preprint
2. 論文標題 Fluctuation of lysosomal protein degradation in neural stem cells of postnatal mouse brain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 preprint
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.05.12.540513	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Park Gwanghyun, Shin Minkyung, Lee Wonyoung, Hotta Akitsu, Kobayashi Taeko, Kosodo Yoichi	4. 巻 17
2. 論文標題 Direct visualization of the transition status during neural differentiation by dual-fluorescent reporter human pluripotent stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1903 ~ 1913
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2022.07.001	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
1. 著者名 Kaise Takashi, Fukui Masahiro, Sueda Risa, Piao Wenhui, Yamada Mayumi, Kobayashi Taeko, Imayoshi Itaru, Kageyama Ryoichiro	4. 巻 36
2. 論文標題 Functional rejuvenation of aged neural stem cells by Plagl2 and anti-Dyrk1a activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 23 ~ 37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/gad.349000.121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zhang Jingtian, Uchiyama Junki, Imami Koshi, Ishihama Yasushi, Kageyama Ryoichiro, Kobayashi Taeko	4. 巻 9
2. 論文標題 Novel roles of small extracellular vesicles in regulating the quiescence and proliferation of neural stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 762293
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.08.20.456431	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 -

1. 著者名 Kobayashi Taeko, Kageyama Ryoichiro	4. 巻 288
2. 論文標題 Lysosomes and signaling pathways for maintenance of quiescence in adult neural stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 3082 ~ 3093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15555	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 -

1. 著者名 小林妙子	4. 巻 73
2. 論文標題 成体神経幹細胞の休眠を制御しているリソソーム	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 196-201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小林妙子	4. 巻 73
2. 論文標題 特集「リソソーム研究の新展開」「特集によせて」	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件(うち招待講演 17件/うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Taeko Kobayashi
2. 発表標題 Monitoring lysosomal protein degradation in neural stem cells of the brain
3. 学会等名 International symposium on neural development and disease (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 成体神経幹細胞の休眠におけるプロテオスタシス制御
3. 学会等名 九州大学生体防御医学研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 神経幹細胞の休眠におけるタンパク質分解制御
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会ワークショップ「タンパク質寿命制御によるプロテオームリモデリングと生体制御」（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 Proteostatic Regulation of Quiescence in Adult Neural Stem Cells
3. 学会等名 ユビキチンニューフロンティア国際会議（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 神経幹細胞の休眠におけるリソソーム機能
3. 学会等名 第95回日本生化学会シンポジウム「オートファジー・リソソーム研究の新展開」（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 神経幹細胞の休眠制御におけるリゾソームの役割
3. 学会等名 第41回日本認知症学会学術集会/第37回日本老年精神医学会シンポジウム「オルガネラ動態が果たす細胞機能と脳神経疾患」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 Proteostatic regulation of quiescence in adult neural stem cells
3. 学会等名 国立遺伝学研究所シンポジウム「New Frontiers in Genetics」(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 神経幹細胞の休眠におけるプロテオスタシス制御
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会(2022年)シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 Proteostatic Regulation of Quiescence in Adult Neural Stem Cells
3. 学会等名 理研BDRセミナー(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 リソソームによる成体神経幹細胞の休眠制御
3. 学会等名 生化学会第63回日本生化学会中国四国支部例会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 休眠神経幹細胞のプロテオスタシス制御
3. 学会等名 京都大学、大阪大学、東北大学 生命科学系 3 研究科合同セミナー (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 成体神経幹細胞のプロテオスタシス制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 リソソームによる神経幹細胞の休眠制御
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2021年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 リソソームによる成体神経幹細胞の休眠制御
3. 学会等名 山梨大学 発生工学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 リソソームによる神経幹細胞の休眠制御
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2021年度大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 成体神経幹細胞のリソソームによる休眠制御/Lysosomal regulation of quiescence in adult neural stem cells
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 / CJK第1回国際会議（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 成体神経幹細胞のプロテオスタシス制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 脳の形成と修復における細胞外環境の機械的性質
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Zhang Jingtian, Ryoichiro Kageyama, Taeko Kobayashi
2. 発表標題 Novel role of exosome in Neural stem cell quiescence/ proliferation regulation
3. 学会等名 第8回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taeko Kobayashi
2. 発表標題 Lysosomal regulation of quiescence in neural stem cells
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>小林グループホームページ https://takobayas.wixsite.com/homepage 老化神経幹細胞の若返りによるニューロン産生の復活と認知機能の改善（京都大学） https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2021-12-17 老化神経幹細胞の若返りによるニューロン産生の復活と認知機能の改善（AMED） https://www.amed.go.jp/news/seika/kenkyu/20220127-02.html</p>
--

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1件

国際研究集会 第44回日本分子生物学会年会ワークショップ「脳の形成と修復における細胞外環境の機械的性質: Mechanical properties of the extracellular environment for brain development and repair」	開催年 2021年～2021年
--	--------------------

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		
韓国	韓国脳研究院 (Korea Brain Research Institute)		