

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07409

研究課題名(和文) 成体神経幹細胞の休眠状態を制御する細胞内分解機構の解明

研究課題名(英文) Intracellular degradation mechanism controlling quiescence of adult neural stem cells

研究代表者

小林 妙子 (Taeko, Kobayashi)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：40402804

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)：大人の神経幹細胞は脳内の海馬や側脳室周辺領域にわずかに存在し、ほとんどが増殖や分化を停止した休眠状態にある。休眠状態では細胞内のタンパク恒常性を制御する特別な機構が想定された。我々は、増殖神経幹細胞が休眠状態に入る際に、細胞内の分解を担う細胞小器官であるリソソームが増加して、増殖に関わる膜タンパク質シグナル受容体をより速やかに分解すること、また、リソソーム機能を阻害すると神経幹細胞は休眠状態を脱するが、逆にリソソーム活性を人工的に上昇させると増殖をやめて休眠状態に入ることを見いだした。この成果により、成体脳神経幹細胞において、リソソーム活性が休眠状態の重要な制御因子であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では、細胞内の不要物の分解を制御しているリソソームの神経幹細胞における新たな機能を見いだした。大人の脳内には神経幹細胞が一生に渡って維持されていることから、その機能操作による脳疾患への治療法が着目されている。神経幹細胞におけるリソソーム機能を人為的に操作することができれば、将来、神経幹細胞の状態を脳内で制御する手法の開発が期待できる。退行性の脳疾患等へのあらたな治療法へつながる成果である。

研究成果の概要(英文)：Quiescence is important for sustaining neural stem cells (NSCs) in the adult brain over the lifespan. Lysosomes are digestive organelles that degrade membrane receptors after they undergo endolysosomal membrane trafficking. Enlarged lysosomes are present in quiescent NSCs (qNSCs) in the subventricular zone of the mouse brain, but it remains largely unknown how lysosomal function is involved in the quiescence. Here we show that qNSCs exhibit higher lysosomal activity and degrade activated EGF receptor by endolysosomal degradation more rapidly than proliferating NSCs. Chemical inhibition of lysosomal degradation in qNSCs prevents degradation of signaling receptors resulting in exit from quiescence. Furthermore, conditional knockout of TFEB, a lysosomal master regulator, delays NSCs quiescence in vitro and increases NSC proliferation in the dentate gyrus of mice. Taken together, our results demonstrate that enhanced lysosomal degradation is an important regulator of qNSC maintenance.

研究分野：発生生物学

キーワード：成体神経幹細胞 リソソーム 休眠状態 TFEB

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大人の神経幹細胞は脳内の海馬や側脳室周辺領域にわずかに存在するが、そのほとんどが増殖や分化を停止した休眠状態にある。「休眠状態」は、一生涯という長い間、幹細胞を良い状態で体の中にストックしておくために必須のメカニズムである。休眠神経幹細胞は、適切なシグナルを受け取り活性化されて再び増殖を始めた状態である「活性化状態」になると、分化して成熟ニューロンを作り出すことができる。既に様々なシグナル伝達経路が神経幹細胞の休眠・活性化を制御することが報告されていた。しかし、休眠・活性化による細胞内のタンパク質恒常性の変化についてはほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

我々は、神経幹細胞内のタンパク質恒常性に着目し、休眠状態で細胞内のタンパク質の分解を制御している新たなメカニズムを想定して解析を行った。細胞内のタンパク質分解は主にユビキチン・プロテアソーム経路とリソソーム経路によって行われる。遺伝子発現解析より休眠状態の神経幹細胞では膜受容体が豊富に発現していることが報告されており、特に制御されたタンパク質分解システムが存在するのではないかと考えられた。既に胚性幹(ES)細胞では、細胞分化でプロテアソーム活性が変化して細胞内のタンパク質恒常性を制御することが報告されていたが、神経幹細胞における制御については全く明らかになっていなかった。

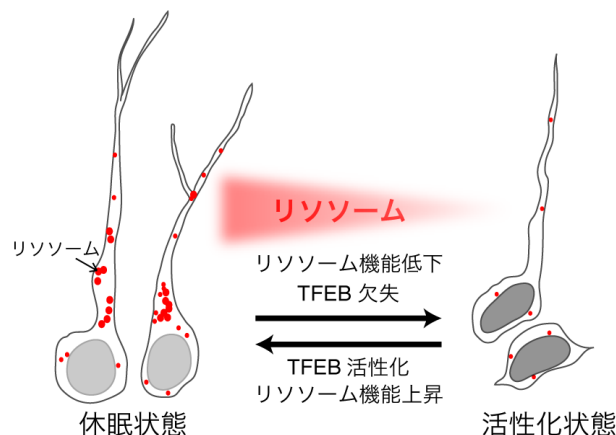
3. 研究の方法

- (1) 増殖神経幹細胞と休眠神経幹細胞でのプロテアソーム活性を比較した。プロテアソームは三種類のペプチダーゼ活性(トリプシン様、キモトリプシン様、カススペース様)があり、三種類の基質ペプチドを用いて測定を行った。プロテアソームに特異的な阻害剤や、リソソーム酵素であるカテプシンに特異的な阻害剤を用いて検証を行った。
- (2) 培養神経幹細胞を用いて休眠状態への誘導過程を詳細に調べた。免疫染色やリソソーム基質を用いて細胞内のリソソーム活性を測定した。また、成体脳組織を用いた免疫染色を行うて検証した。
- (3) 休眠状態の神経幹細胞にリソソーム機能を特異的に阻害する薬剤を処理して変化を解析した。また、膜受容体の分解速度を比較した。脳組織スライスへの薬剤処理も行った。
- (4) リソソーム関連遺伝子の発現を正にかつ統括的に制御するマスター転写因子である TFEB の解析を行った。培養神経幹細胞における TFEB ノックアウト、並びに、培養神経幹細胞・脳組織内幹細胞へのレンチウイルスを用いた遺伝子導入、薬剤依存的に TFEB の発現を誘導できる tet-system 等を活用して解析を行った。また、成体の神経幹細胞特異的かつ時期特異的にノックアウトを誘導することができるコンディショナルノックアウトマウスを用いて TFEB のノックアウトを誘導し、解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 増殖神経幹細胞と休眠神経幹細胞でのプロテアソーム活性の測定の結果から、トリプシン様活性が休眠状態で顕著に上昇しており、この上昇は予想に反してプロテアソームではなく、リソソーム酵素であるカテプシンの活性に依存していることがわかった。つまり、休眠状態でリソソームの活性が著しく上昇しているということがわかった。プロテアソーム活性は、休眠状態で低下していることもわかった。
- (2) BMP を用いた休眠誘導により、細胞増殖因子や細胞増殖に関わるシグナル膜受容体タンパク質が減少する一方で、リソソーム構成因子や、リソソーム機能を上昇させる転写因子 TFEB の発現が上昇している事が分かった。また免疫染色により、培養神経幹細胞や組織内の神経幹細胞において、休眠状態でリソソームの強い染色シグナルと活性の上昇が検出された。
- (3) 薬剤によりリソソーム活性を阻害すると、細胞増殖に関わるシグナル膜受容体が蓄積し、その後、細胞増殖が誘発されることがわかった。細胞増殖に関わる膜受容体の EGF レセプターは、活性化されるとエンドサイトーシス経路でリソソームにより分解されることが知られている。神経幹細胞での活性化型 EGF レセプターの分解速度を調べると、休眠状態でより速やかに分解されていることがわかった。これらの結果から、休眠状態で神経幹細胞は、リソソーム活性を上昇させ、活性化された膜受容体を速やかに分解して外部シグナルを弱めることにより、積極的に休眠状態を維持しているということが分かった。
- (4) 休眠状態では、リソソーム関連遺伝子の発現を制御するマスター因子である転写因子 TFEB が活性化されていたため、この TFEB に着目し、TFEB のノックアウトによるリソソーム機能の低下と、TFEB 活性化型の過剰発現によるリソソーム機能上昇を誘導してその影響を調べた。培養神経幹細胞、および脳内の神経幹細胞にのみ時期特異的にノックアウトできるマウスを用いて解析を行った。過剰発現にはレンチウイルスベクターを用いた発現誘導を行った。その結果、TFEB のノックアウトによりリソソーム機能を低下させると、培養神経幹細胞は休眠状態に入りやすく、また、成体マウスの脳内では、海馬歯状回に増殖神経幹細胞が増加することを見いだした。逆に活性化型 TFEB の過剰発現によりリソソーム機能を上昇させると、増殖神経幹細胞が休眠状態へ誘導されることを培養神経幹細胞と、成体マウス脳内の海馬歯状回の神経幹細胞で見いだした。

これらの結果から、成体脳の神経幹細胞でリソソーム機能が上昇すると休眠状態となり、リソソーム機能が低下すると増殖が起こること、すなわちリソソーム機能変化が神経幹細胞の増殖・休眠を制御しているという新たなメカニズムを明らかにすることが出来た（下図）。この成果は Nature communications 紙に掲載された。



研究成果のモデル図

<用語解説>

神経幹細胞：大人の体の中にも存在する組織幹細胞の一つであり、自己複製能と神経系の細胞（ニューロン（神経細胞）、グリア細胞）を作り出す多分化能を持つ未分化な細胞。

タンパク質恒常性：細胞内のタンパク質組成をある一定の状態に維持しようとする機構。

ユビキチン・プロテアソーム経路：選択的にユビキチンを付加されたタンパク質がプロテアソームによって分解される経路。

リソソーム経路：エンドサイトーシスやオートファジーによって運ばれた物質をリソソーム内の酵素群によって分解する経路。

膜受容体：細胞膜に存在して細胞外からのシグナル等を受け取って細胞内に伝えるタンパク質。

カテプシン：リソソームに局在するプロテアーゼ群。

転写因子 TFEB：リソソーム関連因子の発現を上昇させる転写因子。リン酸化によって不活性化される。

EGF レセプター：上皮成長因子(EGF)と結合して活性化される膜レセプター。

TFEB 活性化型：リン酸化によって不活性化される部分を無くして常に活性を持つ状態にした変異体。

レンチウイルスベクター：非分裂細胞にも効率よく遺伝子導入をおこなうことができるウイルスベクター。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hideyuki Komori, Krista L. Golden, Taeko Kobayashi, Ryoichiro Kageyama, Cheng-Yu Lee	4. 巻 32
2. 論文標題 Multilayered gene control drives timely exit from the stem cell state in uncommitted progenitors during <i>Drosophila</i> asymmetric neural stem cell division.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 GENES & DEVELOPMENT	6. 最初と最後の頁 1, 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.320333.118 .	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 該当する

1. 著者名 Kobayashi, T., Piao, W., Takamura, T., Kori, H., Miyachi, H., Kitano, S., Iwamoto, Y., Yamada, M., Imayoshi, I., Shioda, S., Ballabio, A., and Kageyama, R.	4. 巻 10
2. 論文標題 Enhanced lysosomal degradation maintains the quiescent state of neural stem cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13203-4.	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9件（うち招待講演 4件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 T. Kobayashi, W. Piao, I. Imayoshi, R. Kageyama
2. 発表標題 Enhanced lysosomal degradation in the quiescent state of neural stem cells
3. 学会等名 22nd Biennial Meeting of the International Society of Developmental Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 休眠神経幹細胞におけるリソソーム機能
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林妙子、影山龍一郎
2. 発表標題 休眠神経幹細胞におけるリソソーム機能
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム2018 合同若手シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 神経幹細胞の休眠状態を制御する分解機構
3. 学会等名 「次世代脳」プロジェクト 冬のシンポジウム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 神経幹細胞の休眠状態を制御する分解機構
3. 学会等名 「脳構築の時計と場」「スクラップビルド」合同若手シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 The role of enhanced lysosomal degradation in quiescent neural stem cells
3. 学会等名 International Young Scientists Workshop on Neural Development and Stem Cells (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 Lysosomal regulation of quiescence and proliferation in neural stem cells.
3. 学会等名 German-Japanese Developmental Neuroscience Meeting 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 Lysosomal regulation of proliferation and quiescence in neural stem cells
3. 学会等名 第16回 成体脳ニューロン新生懇談会・「個性」創発脳共催研究会 in 仙台2020 (Adult Neurogenesis Meeting in Sendai 2020) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林妙子
2. 発表標題 Lysosomal regulation of proliferation and quiescence in neural stem cells
3. 学会等名 Cell Biology, Developmental Biology and Systems Biology Course, and Faculty of Biostudy Annual Retreat. (招待講演)
4. 発表年 2020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