

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06696

研究課題名（和文）ショウジョウバエ発生過程における中枢神経系グリア細胞の脱分化を支える分子基盤

研究課題名（英文）Molecular mechanisms underlying the proliferation of differentiated glial cells in *Drosophila melanogaster*

研究代表者

加藤 健太郎 (Kato, Kentaro)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：30733068

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：一般に特殊化して特定の働きを持つ細胞は分裂しないが、場合によってはこのような細胞の分裂が起こり損傷の修復や新たな形態形成につながる。キイロショウジョウバエの幼虫脳で特定の働きを持つグリア細胞は幼虫期が終わると分裂し始める。これをモデルとして再び分裂できる様になる仕組みを解析した。幼虫期以降ではなく、幼虫におけるホルモンの働きによってこの細胞は数回にわたる分裂が可能になることを明らかにした。さらにこの過程で働く遺伝子を新規に同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

すでに特殊化した細胞がどのようにして再び分裂できる様になるのか、また組織や種を超えてその仕組みに共通性があるのか十分に探索されているとは言えない。本研究はその様な仕組みの一端を明らかにした。全体としては種を超えた類似性を見出すことはできなかったが、新たに同定した関連分子は哺乳類においても一部の異常増殖する細胞に発現することが報告されている。以上のことから基盤的知見の集積に貢献し新たな視点を提供できたと言える。

研究成果の概要（英文）：In general, differentiated cells do not proliferate, but in some cases they start to divide and contribute to tissue repair or remodelling. A specific type of differentiated glial cell in the larval brain of fruit flies begins to divide after the end of larval life. Using this as a model system, we investigated the molecular basis that gives differentiated cells the ability to proliferate and that triggers their proliferation. We found that the hormone signal is required during late larval life, but not during prepupal life, for glial cells to gain the ability to divide multiple times after larval life and to initiate cell division. We were also able to identify the genes that act downstream of the hormone signal.

研究分野：発生生物学

キーワード：グリア細胞 可塑性 ショウジョウバエ 中枢神経系 脱分化 増殖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

受精卵はどのような細胞にでもなれる能力を持つ。しかし発生が進むにつれてその能力は限定され胚を構成する個々の細胞は次第に特定の機能を持つ細胞に分化していく。一般に最終分化した細胞は細胞分裂して新たな細胞を生み出すことはなく、また異なる細胞に新たに分化することもない。ところが組織が損傷したときには、分化している細胞が増殖する・形を変える・新たな機能を獲得するといった可塑性を示し、組織の修復に貢献することが知られている。例えば、腸や膵臓でも損傷時に脱分化・増殖・再分化が起きる。また、中枢神経系のグリア細胞も神経系損傷時には増殖する。前駆細胞ばかりでなく、分化した細胞であるアストロサイトやマイクログリアも増殖・形態変化し、組織修復に貢献する。このように細胞の可塑性は組織の修復に貢献するが、細胞の可塑性の分子基盤やその組織・種を超えた共通性は十分に探索されているとは言えない。

申請者らは、キロショウジョウバエの幼虫が蛹へと移行するとき、幼虫の被覆グリアが脱分化・増殖し、蛹期の中期に成虫の脳を構成する細胞の一部である被覆グリアとアストロサイト様グリアに再分化することを発見している。幼虫期の被覆グリアは、グルタミン酸トランスポーターなどを発現し、この細胞の機能不全は幼虫の行動に影響を与える。すなわち、この細胞種は幼虫脳の高次機能に関与する分化した細胞である。哺乳類の腸などの損傷時における分化細胞の脱分化、増殖では、TOR シグナルとオートファジーが必要であることが報告されている。これらはキロショウジョウバエの蛹への移行期に盛んに働いていることが知られており、蛹への移行期における被覆グリアの脱分化、増殖への関与の可能性が考えられる。またキロショウジョウバエの蛹への移行にはホルモンであるエクダイソンが様々な面で重要な働きを持つことが古くから知られる。これらのどちらのシグナルも幼虫期の被覆グリアの脱分化、増殖に関わる可能性が考えられるが、その実際については明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では分化した細胞の可塑性の分子基盤を、申請者らが発見したキロショウジョウバエ幼虫期の被覆グリアの脱分化、増殖をモデルとして明らかにする。哺乳類の腸などの分化細胞の脱分化の機構をヒントに TOR シグナルとオートファジーが関与するのかを検討する。さらに一般に幼虫から蛹への移行時に多くの場面で関与しているホルモンにも着目すると同時に、ノンバイアスに関連分子を探索する。以上により、被覆グリアの脱分化と増殖を可能している機構を明らかにし、同時に組織、種を超えた共通性について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 文献や次世代シーケンスによる発現 RNA 解析(下記2)からの候補遺伝子を RNA 干渉によって被覆グリアにて発現低下させ、細胞増殖への影響を細胞の計数によって評価した。これには幼虫期の被覆グリアの系譜解析の実験系と標的遺伝子の発現低下を引き起こすことのできる UAS-RNAi 系統を組み合わせた。脳を解剖、固定、免疫抗体染色し、共焦点顕微鏡にて光学切片像を取得、画像解析によって全脳における細胞数を計数した。

(2) 次世代シーケンスによる発現遺伝子の比較による関連遺伝子の探索。ホルモンの変異受容体を被覆グリアに発現させている脳と野生型の脳の発現 RNA の比較を行った。これにより発現に変化が見られた遺伝子を候補とし、被覆グリア特異的に発現低下させ表現型を示すものの絞り込みを行った。これらについて上記(1)の手法によりさらに詳細に解析した。

(3) 上記に(1)によって関連を同定した遺伝子の相互作用を2つの関連遺伝子の発現低下や強制発現の組み合わせによって解析した。これには被覆グリアに発現を引き起こすことのできる GAL4 系統を用いて、UAS-RNAi, UAS-対象遺伝子を発現させた。時期特異性を与えるため GAL4 の働きを温度依存的に抑制できる GAL80[ts] をチュープリン遺伝子の発現制御領域によって発現させ、被覆グリアは UAS-核移行蛍光タンパク質を発現させて標識した。増殖への影響の評価を(1)と同様に全脳における標識細胞の計数によって行った。また各遺伝子の発現操作のうえ、他の関連遺伝子の発現への影響を抗体染色像やレポーター発現像の画像解析によって評価した。

(4) 同定した関連遺伝子の幼虫期から前蛹期における発現を抗体染色やレポーターの発現によって解析した。また細胞周期の各時期について各種のレポーターの発現、抗体染色、DNA 合成を標識する BrdU を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 哺乳類の腸などの損傷時には TOR シグナルが抑制されることでオートファジーが引き起こされ分化細胞の持つ構造の分解が起きる。これが TOR シグナルの再活性化につながり細胞増殖が引き起こされる。しかしながら被覆グリアにおいてはオートファジーそのものを抑制しても脱分化、増殖に顕著な影響がなかった。TOR シグナルは最初の分裂には影響しないものの、それ以降の細胞分裂に影響を与えた。すなわち被覆グリアの脱分化と分裂開始の仕組みにはこれらのシグナルは直接関与しないことを意味する。この点において種や組織を超えた仕組みの類似性は存在しないことが示唆された。一方で、被覆グリアの増殖の制御は少なくとも第一回目の細胞分裂とそれ以降の細胞分裂に分けられることを明らかにし、脱分化後の盛んな細胞分裂に関わる因子を新たに同定することができたと言える。

(2) ホルモンであるエクダイソンは幼虫期から蛹期への移行に多くの細胞で働くことが知られている。被覆グリアにおいてもエクダイソンの変異受容体の発現、RNAi による受容体の発現低下は増殖に影響を与えた。実験系によっては第一回目の細胞分裂の開始の遅れが観察された。さらに幼虫期後期にホルモン受容体の発現量が減ると被覆グリアの生存に影響を与えることその他、幼虫期後期に細胞周期に必須である E2F の活性の上昇が観察された。ホルモン受容体は幼虫期には被覆グリアに分布するものの幼虫期以降の前蛹期と蛹期初期にはほぼ観察できなかったうえ、ホルモン受容体の過剰発現は前蛹期の増殖に抑制的であった。以上からホルモン受容体は幼虫期には細胞分裂を抑制すると示唆され、それと同時に幼虫期以降に起こる複数回にわたる分裂に必要な性質を幼虫期後期に被覆グリアに付与することを明らかにできた。被覆グリアでは動的なホルモンシグナルが幼虫期 蛹期の移行に重要な働きをしていることを明らかにできた。

(3) ホルモンシグナルは個体の発生・成長とあわせて分化した被覆グリアの状態を制御する仕組みと言える。ではその下流ではどのような仕組みが働いているのだろうか。ホルモン受容体の下流に働く既知の転写因子である br は幼虫期後期と前蛹期にも発現しているが、幼虫期以降には異なる isoform が発現することがわかった。それぞれの isoform がどのような役割を持つかについては、Isoform 特異的な発現低下が技術的にかなわず明らかにすることができなかった。ホルモン受容体の下流をさらに切り分けるため、被覆グリアにてホルモンの変異受容体を発現させた脳と正常な脳から RNA を精製し発現 RNA の比較を行った。これより関連が考えられた候補について、被覆グリアで発現低下させ増殖への影響を調べた。顕著に増殖に影響した二つの遺伝子(転写因子と転写コファクター)に焦点を当てて解析をすすめた。転写コファクターでは発現抑制するとホルモン受容体の発現抑制にみられたのと同様、幼虫期の被覆グリアの生存にも影響を与えた。転写因子の発現抑制ではホルモン受容体の発現抑制でみられたのと同様、実験系によっては第一回目の細胞分裂の開始の遅れが観察された。

(4) 新規に同定した上記の二つの遺伝子とホルモン受容体はどのような関係にあるのだろうか。遺伝的相互作用を解析した。上記の転写因子とコファクターはホルモン受容体の下流であると考えられるが、その過剰発現はホルモン受容体の発現抑制による表現型を打ち消すことができなかった。このことからホルモン受容体の下流による分裂能の付与には複数分子が関与し、同コファクターはその一端を担うが単独では不十分であると考察された。一方で、転写因子とホルモン受容体の発現の間には負のフィードバック制御があることが示された。同転写因子はホルモンシグナルにより前蛹期から発現し、このタイミングでホルモン受容体の発現低下に関与するとともに、第一回の分裂に必要であることが考えられた。

本研究では分化した被覆グリアが幼虫期の終わったあとに複数回の細胞分裂を行えるようになるには、幼虫期後期のホルモンが要であることを示した。ホルモン受容体の既知の下流遺伝子が分裂に関与することのほか、新規に 2 つの遺伝子がホルモン受容体の下流に働き被覆グリアの分裂できる能力に関与すること、蛹期における分裂に TOR シグナルも関わることを明らかにした。蛹期における分裂には FGF シグナルが関与することをすでに報告しており、これらの結果から複数回分裂できる性質の獲得、最初の分裂、それに続く分裂の 3 つの制御があり、いずれも複数の因子によって複雑に制御されていると考察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤健太郎
2. 発表標題 What triggers dedifferentiation and proliferation of glial cells at the onset of Drosophila metamorphosis
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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
研究分担者	栗崎 健 (Awasaki Takeshi) (60359669)	杏林大学・医学部・教授 (32610)	
研究分担者	平井 和之 (Hirai Kazuyuki) (70597335)	杏林大学・医学部・講師 (32610)	

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