

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：82601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21913

研究課題名（和文）神経幹細胞の増殖と神経新生を賦活化するNotch-Deltaシグナル刺激法の開発

研究課題名（英文）Controlling bi-directional Notch-Delta signalling in hippocampal neural stem cells to enhance the self-renewal and the neurogenesis

研究代表者

大久保 佑亮（OKUBO, YUSUKE）

国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・主任研究官

研究者番号：80596247

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：海馬における神経新生の賦活化は記憶障害などの治療につながると期待されているが、神経幹細胞の老化や枯渇を引き起こすことが懸念されている。そこで本研究では、まずタンパク質のクラスター化技術を用いたNotchシグナル活性化による神経幹細胞の自己複製の賦活化法を開発する。その後アデノ随伴ウイルスを用いたDeltaシグナルの活性化により神経新生を亢進する2段階の手法を開発する。本研究では、細胞を用いてNotch-Deltaシグナルのそれぞれの活性化法を検証した。また、ラット海馬においてそれらの活性化法及び神経幹細胞の自己複製や神経新生を検出する基盤技術を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの記憶障害やうつ病など社会的に治療の要請が高い疾患と海馬神経新生の低下との関連が指摘されており、神経新生を賦活化することでその治療につながると期待されている。一方で、過剰な神経刺激による神経新生の促進は神経幹細胞を減少させることが報告されており、適切な治療法の開発には安全性も考慮する必要がある。本研究において、副作用を抑えた神経新生の賦活化法を開発するための基盤技術を確立した。今後、これらの技術を用いた治療法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：The activation of neurogenesis in the hippocampus is postulated to provide therapeutic strategies for memory impairments. However, a significant concern is the potential induction of senescence and depletion in neural stem cells associated with such stimulation. In our study, we first use approaches involving multivalent Delta proteins to facilitate the self-renewal of neural stem cells by activating Notch signaling. Subsequently, we enhance neurogenesis via Delta signaling, activated using an adeno-associated virus. In this research, we conducted an examination of Notch- and Delta- signaling activation approaches using cellular models. We also established techniques for detecting these activation approaches, as well as the self-renewal of neural stem cells and neurogenesis in the hippocampus of rats.

研究分野：幹細胞工学

キーワード：Notchシグナル Deltaシグナル 神経幹細胞 神経新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、ヒトの記憶障害やうつ病など社会的に治療の要請が高い疾患と海馬神経新生の低下との関連が指摘されており、神経新生を賦活化することでその治療につながると期待されている。これまでも、神経伝達物質やその受容体に作用する医薬品・化学物質を用いた神経新生の賦活法が精力的に研究されているが、これらの研究では神経新生には注目しているものの、その大本である海馬神経幹細胞(Neural stem cell: NSC)への影響に対しては関心が薄い。過剰な神経刺激による神経新生の促進は NSC を減少させることや、外傷性脳損傷に起因する一過的な神経新生の上昇が後に NSC の正常な神経新生を抑制し神経回路異常を引き起こすこと、加齢やストレスにより NSC の神経新生能が低下することからも、単に神経新生を促進するだけでは NSC の減少を伴い、後に大きな副作用が生じる可能性がある。加えて、非標的細胞への刺激もまた副作用を引き起こす懸念があるため、対象を限定した刺激法により相反する NSC の自己複製と神経新生の両輪を制御する必要がある。

Notch-Delta シグナルは神経幹細胞を含む多くの組織幹細胞の維持・増殖・分化を制御している。海馬では NSC に発現する Notch1 が隣接細胞の Delta like 1(Dll1)からの刺激を受け、NSC の維持・増殖を制御している。これまでの研究では、Notch-Delta が Delta から Notch への一方向性のシグナルであることを前提になされてきたが、研究代表者は隣接細胞の Notch からの刺激により活性化する Delta シグナルが自身の細胞の Notch シグナルを抑制すること、ラット海馬由来 NSC において神経分化を促進することを発見した。海馬 NSC において Wnt や BMP シグナルもまた神経新生を制御することが知られているが、これらの刺激による神経新生の促進は、神経伝達物質を用いた場合と同様に、後に NSC の減少を伴うことが知られている。ただし、永続的な Notch シグナルの ON/OFF は新生神経細胞の樹状突起形成の異常を引き起こすことが報告されており、機能的な神経新生を促進するためには NSC の増殖と神経新生を連続して制御する必要がある。

2. 研究の目的

この課題を解決するために本研究では双方向の Notch-Delta シグナルを利用する。まず Notch シグナル刺激により NSC の自己複製を促進し、次に増殖した NSC において Delta シグナルを活性化させ Notch シグナルを抑制すると共に神経細胞への分化・成熟を促すことで、安全で機能的な医療が早期に実現を目指す。

3. 研究の方法

1) シグナル伝達能を飛躍的に高めるタンパク質のクラスター化技術

栄養因子やモルフォゲンの受容体は通常は細胞膜上に散在しているが、リガンドとの結合を合図に散在する受容体が集合し、局所的なりガンド-受容体の多価結合を形成することでシグナルを増強するものが存在する。このため、これらタンパク質の中には単に培地や組織に加えただけでは十分に活性化できないシグナルが存在し、Notch-Delta シグナルもそうであった。共同研究者であるカリフォルニア大学の David Schaffer 教授はナノスケールでタンパク質をヒアルロン酸にクラスター化させることでリガンド-受容体の多価結合を誘導し、シグナル伝達を飛躍的に上昇させる技術を独自に開発した。この手法を Notch シグナルの活性化に応用し、NSC の細胞増殖及び神経分化の向上を試みた。

2) NSC 特異的な感染能を上昇させた AAV r3.45

我々はこれまでにアデノ随伴ウイルス(Adeno-associated virus :AAV)のカプシドを改変しラット、ヒトの NSC への感染性を飛躍的に高めた AAVr3.45 を独自に開発した。AAVr3.45 はラット海馬においてアストロサイトやニューロンへの感染が抑制され NSC 特異的に感染することも明らかにしており、本研究では NSC 特異的な Delta シグナルの活性化に用いる。

4 . 研究成果

タンパク質のクラスター化技術を用いて Notch シグナルを活性化するために、DII1 タンパク質の Expi293 発現システムを用いた大量作製法を開発した。ラット神経前駆細胞(rat Neural precursor cells: rNPCs)において、クラスター化 DII1 の Notch シグナル活性化能を下流の Hes1 の遺伝子発現の向上により確認した。一方でクラスター化 DII1 は rNPCs の細胞増殖を活性化しなかった。そのため、rNPCs での条件検討ではなく、直接ラットの海馬での細胞増殖能作用の検討を試みた。埼玉大学理工学の古館宏之助教からインジェクション法を習い、手技を取得した。

Delta シグナルの活性化に関しては、ミニマム CAG プロモーター下で DII1 細胞内ドメイン(DII1 intracellular domain: D11CD)及び GFP を発現する AAVr3.45 を作製し、ヘパリンカラムを用いて精製した。ステレオタキシックを用い、F344 雌ラットの海馬に AAVr3.45 をインジェクションし細胞に感染させた。感染細胞は GFP 発現によって確認した(Figure 1)。

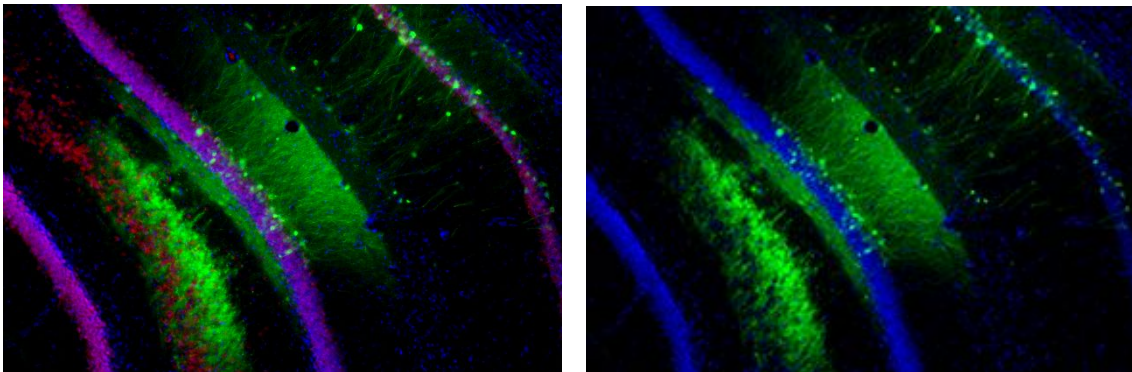


Figure 1: AAVr3.45 を用いたラット海馬における Delta シグナルの活性化。細胞核：DAPI (青色)、AAVr3.45 感染細胞：GFP (緑色)、神経細胞：NeuN (赤色)

Notch シグナルの賦活化による NSC の細胞増殖や Delta シグナルの賦活化による神経新生は、BrdU/EdU 標識及び各種の分化細胞マーカーとの多重免疫染色により評価する予定であった(Figure 2)。しかしながら、多重染色を可能とする条件検討に時間がかかった。具体的には 105 での熱処理が必要な抗 cleaved Notch1 抗体や塩酸処理が必要な抗 BrdU 抗体を同時に使用するために、65 での 2 時間の賦活化処理が最適な条件であることを見つけた。

以上、本研究課題においてはラット海馬において双方向の Notch-Delta シグナルの活性化による、NSC の細胞増殖および神経新生の賦活化を検討する基盤技術を確立した。今後の研究において、それらを明らかにしていく予定である。

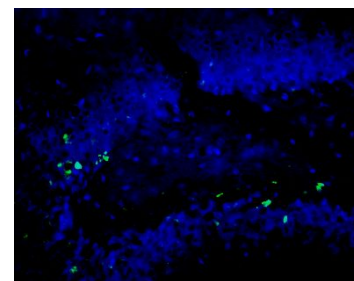


Figure 2: AAVr3.45 を用いたラット海馬における BrdU 標識細胞の検出。細胞核：DAPI(青色)、BrdU 標識細胞：GFP (緑色)

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 Okubo Yusuke, Ohtake Fumiaki, Igarashi Katsuhide, Yasuhiko Yukuto, Hirabayashi Yoko, Saga Yumiko, Kanno Jun	4. 巻 148
2. 論文標題 Cleaved Delta like 1 intracellular domain regulates neural development via Notch signal-dependent and -independent pathways	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.193664	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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