

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：74415
 研究種目：若手研究 B
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23770262
 研究課題名（和文）ショウジョウバエ神経幹細胞制御の分子基盤
 研究課題名（英文）The molecular mechanism for the regulation of neural stem cell proliferation in *Drosophila*
 研究代表者
 金井 誠 (MAKOTO KANAI)
 公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所・神経細胞生物学部門・研究員
 研究者番号：50598034

研究成果の概要（和文）：

幹細胞性は近傍にある細胞や組織に大きく依存し、その細胞群はニッチと呼ばれる。本研究はショウジョウバエ幼虫期脳の神経幹細胞をモデルに、神経幹細胞の増殖能を制御するグリア細胞ニッチの同定及びその分子メカニズムの解明を目的に行い、神経幹細胞—グリア細胞間相互作用が存在すること、またグリピカンがグリア細胞上に発現し、神経幹細胞で発現する形態形成分子と相互作用することにより神経幹細胞の増殖制御が行われていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Stemness is largely defined by neighboring tissues and cells called niche. To determine the contribution of glial cell niche for the proliferation of neural stem cell, I used *Drosophila* neuroblast as a model and found that glial cells and neuroblasts are in physical contact, on which they interact to regulate neuroblast proliferation with the distinct molecules that are mutually expressed on the each cell surface.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学 発生生物学

キーワード：神経幹細胞 ショウジョウバエ グリア細胞 ニッチ HSPG TGF β

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は、自己複製能、増殖能をもち、特定の細胞を生み出し続ける。その幹細胞性は、近傍にある細胞や組織に大きく依存し、その細胞群はニッチと呼ばれる。ニッチ細胞による幹細胞性維持機構は、神経幹細胞のみならず、すべての幹細胞の共通原理であり、ニッ

チ細胞の理解は、再生医療のみならず、ガン幹細胞に由来するガン化の理解にも繋がる重要問題である。正常な幹細胞の行動は周囲のニッチから出たシグナルが幹細胞の遺伝的プログラムに働きかけることによって厳密に制御されている。がん幹細胞についても、これと同様の局所的な環境シグナルが増殖

を抑制している可能性があり、その幹細胞維持の細胞、分子メカニズムの解明により、がん幹細胞による腫瘍化のメカニズム解明に繋がるのが期待できる。近年、成人脳にも幹細胞が存在し、神経細胞が絶えず産生されていることが明らかになってきた。成熟した脳におけるニューロンの産生には、脳室下帯や海馬などで観察されている。これまでに血管や細胞外マトリクス等の細胞・組織がニッチ機能を有している可能性が示唆されているが、それらは組織学的結果に留まっており、細胞数が多いことに起因する複雑性、細胞破壊や遺伝子破壊の困難さから、その細胞機能や分子基盤については不明な点が多い。

2. 研究の目的

私はショウジョウバエ幼虫期脳の神経幹細胞（ニューロブラスト）をモデルに、神経幹細胞の幹細胞性維持に必要なニッチ細胞及び、その分子メカニズムの研究を行ってきた。具体的には、ショウジョウバエ中枢神経系に存在する様々な種類の細胞群を特異的に細胞操作、遺伝子破壊し、同時に神経幹細胞を単一細胞標識し、その振る舞いを観察することにより、神経幹細胞性の維持に必要な細胞群の同定、解析を行ってきた。その結果、特定のグリア細胞集団が神経幹細胞の幹細胞性に重要な働きをしていることを発見した。さらに、グリア細胞、神経幹細胞、それぞれの細胞膜は直接接触関係にあること、特定グリア細胞で細胞膜エンドサイトーシスを阻害し、その分泌機構を阻害したところ、神経幹細胞の増殖能が減少することを見出した。このことは、特定のグリア細胞がニッチ細胞として、神経幹細胞性の維持に機能していること、さらに、その機能がグリア細胞膜上に提示される分子を介して行われる可能性を示している。本研究では、ショウジョウバエ幼虫期の中枢神経系を用いて、グリア

細胞と神経幹細胞との相互作用に着目し、神経幹細胞の増殖能を制御するニッチ細胞の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

従来、高等動物を用いた神経幹細胞ニッチ研究は、その細胞数の多さ故の複雑性や、それに起因する特異的な細胞、組織操作の困難さから簡便に出来なかった。本研究では外来遺伝子導入による細胞操作が容易なショウジョウバエを用いて、1細胞ラベル法や特定細胞の不活化を行うことや、GFP再構成法を用いることにより、従来免疫染色像等でしか得られなかった静的ニッチをリアルタイムに解析し、そのダイナミクスを明らかにすることで、上記の問題点を克服し、グリア細胞と神経幹細胞との相互作用を解明し、神経幹細胞の増殖能を制御するニッチ細胞の分子メカニズムを明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

ショウジョウバエ幼虫期脳では、グリア細胞に細胞接着分子のドミナントネガティブ体を発現させると神経幹細胞の増殖能が減少すること、また組織学的に神経幹細胞の近傍にグリア細胞が位置していることなどから、神経幹細胞増殖制御はグリア細胞により制御されている可能性があったが、その分子メカニズムは不明であった。

まず初めに、神経幹細胞とグリア細胞との関係をGFP再構成法を用いて明らかにした。GFP再構成法とは2つの発色能をもたないGFP断片をグリア細胞、神経幹細胞にそれぞれに発現させ、両GFP断片が近接することにより、再構成し発色することを利用し、両者の相互作用を可視化する方法である。発色能を持たないそれぞれのGFP断片（spGFP1-10、spGFP11）を神経幹細胞、グリア細胞のそれ

ぞれに相互排他的に発現させたところ、幼虫脳内に GFP シグナルが観察された。2つの GFP 断片のそれぞれは発色能を持たないがお互いが 100nm ほどに近接した時に、機能的な GFP が再構成され GFP シグナルを発色させる。幼虫脳において GFP 発色が観察されたということは、神経幹細胞とグリア細胞が近接しており、直接的な接触関係があることを示しており、このことはこの接触関係が神経幹細胞の増殖制御を担っていることを示唆させる結果である。

次にグリア細胞がいかに神経幹細胞増殖能を制御しているのかを明らかにするために、グリア細胞特異的に、エンドサイトーシスを阻害することにより、グリア細胞を機能的に細胞破壊した。具体的にはグリア細胞特異的にダイナミン温度感受性変異体を発現させ、許容温度下、非許容温度下のそれぞれにおける神経幹細胞増殖能を BrdU 取り込みを指標に評価した。その結果、非許容温度下においては、正常型に比べて約 50% BrdU 取り込み率が減少していた。次に、このダイナミン温度感受性変異体における神経幹細胞増殖能の減少が、グリア細胞、神経幹細胞間の膜接触が失われた結果だと仮説を立て、同変異体非許容温度下におけるグリア細胞膜、また GFP 再構成を観察した。グリア細胞に膜移行型 GFP を発現させその状態を、同変異体、許容温度下、非許容温度下で比べると、許容温度下に於いては脳全体に膜移行型 GFP は局在し、グリア細胞膜が大きく広がっているのに対し、非許容温度下においては、そのシグナルは小さく細胞が縮んだように観察された。また同変異体許容温度下、非許容温度下における、GFP 再構成を観察したところ、非許容温度下においては、ところどころシグナルの欠失している様子が観察された。ダイナミン温度感受性変異体においては、

エンドサイトーシスが阻害されることにより、それに付随する分泌、物質輸送なども阻害される。そこでゴルジマーカを同変異体許容温度下、非許容温度下において観察したが、その両者に明確な違いはなかった。このことは分泌、物質輸送は同変異体非許容温度下において影響を受けていないことを示し、以上の結果から、ダイナミン温度感受性変異体非許容温度下で観察された神経幹細胞増殖能の減少は、グリア細胞、神経幹細胞間の接触が失われた結果として現れた現象であることを示している。また、このことは、グリア細胞、神経幹細胞の両者の細胞膜上に相互のコミュニケーションに必要な分子が存在し、神経幹細胞の増殖に関与している可能性を示唆している。

ショウジョウバエ生殖系細胞において、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) が重要な機能をしていることが報告されている。またヘパラン硫酸基の欠失変異体がグリア細胞特異的にダイナミン機能欠失変異体を発現させた個体と同じように脳が小さくなる表現形を示すこと、そして、HSPG のうちグリピカンである Dally-like (Dlp) がグリア細胞上で発現していることから、神経幹細胞との相互作用に必要なグリア細胞因子は Dlp だと仮説のもと実験を行った。Dlp 機能欠失変異体の神経幹細胞増殖能を BrdU 取り込みにより観察したところ、正常型に比べて約 70% に増殖能が減少していた。またダイナミン温度感受性変異体非許容温度下において、Dlp の発現は許容温度下に比べて減少しているように見られたが、これは非許容温度下におけるグリア細胞膜減少に付随して見られる現象だと考えられる。以上の結果から Dlp はグリア細胞において神経幹細胞増殖能の制御を担う因子のうちの一つである可能性がある。ショウジョウバエにおいては

複数の形態形成因子や成長因子が HSPG と相互作用し、機能していることが報告されているが、その変異体解析や発現パターンなどから既存の因子が、幼虫脳で機能している可能性は少ない。そこで生殖系幹細胞で機能している TGF β 因子の一つに注目し、その神経幹細胞増殖能を評価した。今回新たに TGF β 因子のレポーターを作成し、その発現を観察したところ、神経幹細胞に発現していたが、グリア細胞には発現していないことが明らかとなった。その機能欠失変異体の神経幹細胞増殖能を BrdU 取り込みを用いて評価したところ、正常型に比べて約 10% ほどしか増殖能を持たないことが明らかになった。このことはこの TGF β 因子が神経幹細胞で発現しその増殖能を制御している候補遺伝子であることを示している。またこの TGF β 因子の下流で働く因子の発現やその因子の機能阻害実験を行った結果、この下流因子が神経幹細胞で発現していること、またその機能阻害を行うことにより、神経幹細胞増殖能が減少していることが明らかとなった。前述のグリア細胞因子 D1p と神経幹細胞因子 TGF β 因子との間の遺伝関係を示すために、D1p 変異体の背景で TGF β 因子を 1 コピー減少させることにより、神経幹細胞増殖能が D1p 変異体のそれよりも減少していた。このことは両者が遺伝的に関連していることを示している。以上のことから、グリア細胞では D1p が、神経幹細胞においては TGF β 因子がそれぞれの膜上に提示され、それらが相互作用することで神経幹細胞の増殖が制御されていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Katsufumi Dejima, Makoto I. Kanai, Takuya Akiyama, Daniel C. Levings, and Hiroshi Nakato Novel contact-dependent bone morphogenetic protein (BMP) signaling mediated by heparan sulfate proteoglycans. Journal of Biological Chemistry 査読有
286 2011 17103-11
doi: 10.1074/jbc.M110.208082.

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井 誠 (MAKOTO KANAI)
公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所・神経細胞生物学部門・研究員
研究者番号: 50598034

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: