

発生における細胞生死制御機構の解析

細胞工学研究室 17213 大石康二

1. 緒言

「細胞の自殺」=「細胞死」は、生物の発生や恒常性の維持に非常に重要だと考えられている。近年の精力的な研究により、細胞死は細胞内のシグナル伝達によって引き起こされる、プログラムされた細胞の自殺であるという概念が確立された。一般的に細胞の生存は細胞死シグナルの ON/OFF によって制御され、デフォルト（何もしない状態）では生きていると思われがちである。しかしながら、培養細胞の培養液から血清を除去することで細胞死が誘導されることから、細胞は生存シグナルによって能動的に生かされていることがわかる。このように、細胞の生死は生存シグナルと細胞死シグナルのバランスによって、巧妙に制御されていると考えられる。

近年の細胞死シグナルの急速な解明に対して、生存シグナルの実体はその重要性にも関わらず、十分な理解に至っていない。また、このような生存と死のシグナルが、実際に生体の細胞において、どのように細胞の生死を決定しているかについての知見も不十分である。そこで本研究では、2つの系（T細胞（第二章）と神経幹細胞（第三章））を用いて細胞の生存シグナルを分子的に明らかにすることを目的とした。また、神経幹細胞の研究から、細胞の生存促進に重要な分子が、細胞の分化や移動にも関与するという予想外の結果を得たので、第四章で述べる。

2. T細胞における生存促進機構の解析

生存/細胞死シグナルのバランスによって細胞の運命が巧妙に決定されている系に、T細胞クローンの選択が挙げられる。T細胞は遺伝子の再構成により多様なT細胞抗原受容体(TCR)を作り出すが、TCRの反応性の違いにより、生体にとって有用なTCRのみを選択する。すなわち、T細胞はデフォルトで死ぬが、適度なTCRの活性化はT細胞の生存・分化を誘導する(正の選択)。一方、TCRが過剰に活性化されると細胞死が誘導される(負の選択)。近年の研究から、負の選択には転写因子 Nur77 の発現誘導が重要であることが明らかにされている。一方で、正の選択時にはTCR刺激により Nur77 が誘導されるのにもかかわらず、細胞はむしろ生存するという矛盾が生じている。従って、正の選択時には何らかのメカニズムによって Nur77 の細胞死誘導能の抑制が起きている可能性が考えられた。PI3-キナーゼ/Akt 経路は様々な系で細胞の生存に重要であることが示されており、TCRの活性化によっても活性化される。そこで、Nur77 が Akt によって制御される可能性を検討した。

まず、Akt が Nur77 の転写活性を著しく抑制することを見出した。このメカニズムとして、Nur77 が Akt によって直接リン酸化される可能性を検討した。その結果、*in vivo/in vitro* において Akt が Nur77 をリン酸化することが分かった。以上から、Akt が Nur77 を直接リン酸化し、その転写活性を抑制すること

が明らかになった。また、Nur77 の発現によって誘導される細胞死が、活性型 Akt の共発現によって抑制されることを見出した。以上の結果から、Akt は Nur77 の細胞死誘導活性を Nur77 をリン酸化することで抑制することが強く示唆された。

これらの結果は、PI3-キナーゼ/Akt 経路が正の選択において Nur77 の活性を抑制することにより、TCR による生存促進に貢献していることを示唆している。すなわち、TCR が適度に活性化された場合は、Nur77 の発現が誘導されるものの同時に Akt も活性化されるため、Nur77 の転写活性が抑制されて生存が維持される。一方、TCR が過剰に活性化されると、Akt による Nur77 の転写活性の抑制が追いつかず、細胞死が誘導されると考えられる。

3. 神経幹細胞における生存促進機構の解析

哺乳類の中樞神経系はニューロンとグリアから構成されるが、これらは多分化能、自己複製能をもつ神経系前駆細胞から発生する。神経幹細胞は発生過程でプログラム細胞死を起こすことが知られており、この細胞死の人為的抑制は過剰な神経系細胞を産み出し、脳の肥大を伴う個体死を引き起こす。従って、神経幹細胞の生死は厳密に制御されているものと考えられる。しかしながら、その制御機構はこれまでほとんど明らかにされていなかった。本研究では、その分子メカニズムの解明を目的に、胎生マウスの終脳から調製した神経幹細胞を用いて解析を行った。

神経幹細胞の培養には、bFGF や EGF といった増殖因子の添加が必須であり、これらを含む栄養因子を培地中から除去すると細胞死が誘導される。まず、この細胞死が高密度培養によって抑制されること、その作用には細胞間相互作用（細胞間の接着）が重要であるという結果を得た。膜貫通型受容体 Notch は、細胞間相互作用によって活性化され、神経幹細胞のニューロン分化を抑制することが明らかになっている。そこで、高密度による生存促進効果に Notch シグナルが関与するか検討したところ、高密度による神経幹細胞の生存促進に、Notch シグナルが必須であることが分かった。また、神経幹細胞に活性型 Notch を導入したところ、著しく細胞死が抑制された。一方、Notch の下流シグナル分子である Hes1/5 についても同様に解析を行った結果、これらの分子を発現させても細胞死は抑制されなかった。これらのことから、Notch シグナルが Hes 以外の経路を介して、神経幹細胞の生存を促進することが明らかになった。また、活性型 Notch によって生存促進型 Bcl-2 ファミリーの Bcl-2 と Mcl-1 の発現量が上昇していることを見出した。従って、Notch はこれらの分子の発現上昇を介して神経幹細胞の生存を促進している可能性が示唆された。

これらの結果から、Notch シグナルは神経幹細胞のニューロン分化を抑制すると共に、生存を促進することによって未分化な神経幹細胞のプールを維持するのに貢献するものと考えられる。

4. 神経幹細胞における PI3-キナーゼ/Akt 経路の解析

第二章で扱った PI3-キナーゼ/Akt 経路は、様々な系で細胞の生存に重要であることが明らかになって

いる。そこで、神経幹細胞の生存についても検討を行ったところ、活性型 Akt の発現によって神経幹細胞の生存が促進された。この時、活性型 Akt を発現させた際の細胞の分化状態について調べたところ、ニューロンへの分化が著しく促進されるという意外な結果に気づいた。IGF-I などの増殖因子は、ニューロンへの分化を促進することが報告されていたため、PI3 キナーゼ-Akt 経路はそのような因子の下流シグナルに重要である可能性が考えられた。そこで本研究では、PI3 キナーゼ-Akt 経路によるニューロン分化促進機構について解析を行うこととした(4-1)。

Akt 経路は、哺乳動物の細胞移動にも関与することが当研究室によって明らかにされている。そこで、PI3 キナーゼ-Akt 経路のニューロン移動への関与についても調べた(4-2)。

4-1. PI3 キナーゼ-Akt 経路のニューロン分化促進機構の解析

まず、*in vitro* 培養系で PI3 キナーゼ-Akt 経路のニューロン分化への関与について検討した。その結果、IGF-I によるニューロン分化促進に PI3 キナーゼ経路が必要であること、活性型 Akt がニューロン分化を促進することを見出した。神経幹細胞からニューロンへの分化には Mash1 などの proneural bHLH 型転写因子が重要であることが知られている。そこで、Akt がこれらの転写活性を促進する可能性について検討したところ、活性型 Akt によって Mash1 の転写活性が顕著に上昇した。従って、Akt は Mash1 といった転写因子を活性化することによって、ニューロン分化を促進する可能性が示唆された。

次に、*in vivo* (実際の生体内)においても、PI3 キナーゼ-Akt 経路が重要であるか検討を行った。PI3 キナーゼ-Akt 経路を遮断するために、Akt を活性化するキナーゼである PDK1 の遺伝子破壊マウスを用いた。大脳におけるニューロン分化を検討したところ、野生型と比較して PDK1^{-/-}ではニューロンマーカー陽性領域が減少することが観察された。従って、PDK1 遺伝子の破壊によってニューロン分化が抑制されたものと考えられ、*in vivo* におけるニューロン分化に PI3 キナーゼ-Akt 経路が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

4-2. PDK1 遺伝子破壊マウスにおけるニューロン移動の解析

Akt 経路は、哺乳動物の細胞移動にも関与することが知られている。中枢神経系では、大脳皮質ニューロンの脳室帯から皮質層への垂直移動がよく知られている。そこで、この細胞移動に PDK1 が関与するか PDK1^{-/-}マウスを用いて検討した。その結果、PDK1^{-/-}マウスでは、異常な位置にニューロンが留まることが観察され、ニューロンが皮質層に正しく移動することができないことが分かった。この時期の大脳の新生ニューロンは、垂直方向に突起を伸ばした放射状グリアに沿って移動することが知られている。野生型と比較して、PDK1^{-/-}マウスでは放射状グリアの突起の配向が顕著に乱れていることが明らかになった。従って、PDK1^{-/-}マウスにおけるニューロンの移動の異常は、それをサポートする放射状グリアの突起の不完全な形成に起因する可能性が示唆された。

5. 結言

本研究から、T細胞におけるPI3キナーゼ-Akt経路、神経幹細胞におけるNotchシグナルが生存に重要であることが明らかになった。また、神経幹細胞においてPI3キナーゼ-Akt経路は生存のみならず、ニューロン分化や細胞移動にも関与することが分かった。一方、神経幹細胞においてNotchシグナルはニューロン分化の抑制に働いている。このように、発生過程において生存シグナルは同時に分化などのシグナルと共役することで、必要な細胞のみを生存させる役割を担っている可能性が考えられ、今後の解析が興味深い。