

論文内容の要旨

論文題目 マウス大脳発生における Notch-Delta 経路の機能解析

氏名 川口 大地

序論

脳は神経情報を処理・統合する事により生物の複雑な行動を制御する高度な機能を持つ器官であり、その形成過程は非常に興味深い。脳を含む中枢神経系において、発生初期には比較的均一な性質の神経系前駆細胞が未分化性を維持したままその数を増やす。発生が進むと神経系前駆細胞はニューロンを産生し、さらに発生が進むとグリア（アストロサイト、オリゴデンドロサイト）を産生する。そして、分化したニューロンやグリアが複雑なニューロンネットワークを構築する。神経系前駆細胞は発生が進むと一斉に分化するのではなく、一部の細胞のみが選別されてニューロンに分化する。このとき、ニューロンの選別機構が正常に機能しないと最終的なニューロン数や組織の

形態に大きな影響を与える事が予想される。例えば、神経系前駆細胞からニューロンに選別される割合が高くなると親細胞である神経系前駆細胞の数が減少し、結果としてニューロン数が減少

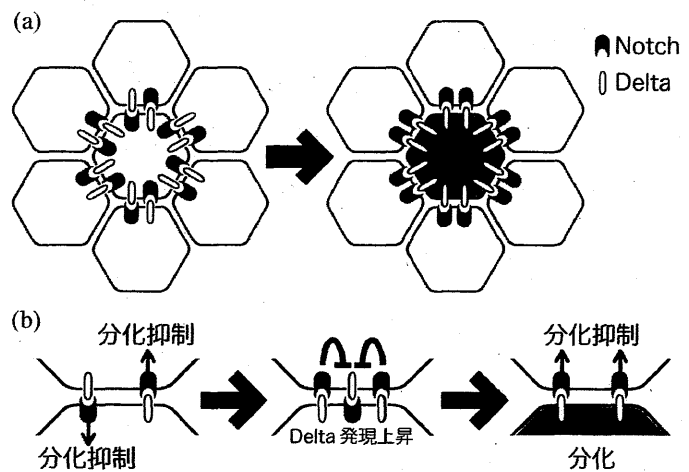


Fig. 1 Notch-Delta経路による側方抑制機構の模式図
(a)均一な細胞集団が、側方抑制機構によりNotchが活性化した細胞（白）とDelta発現細胞（灰色）に選別される。
(b)側方抑制のメカニズム：互いにNotchを活性化する状態から（左）、ある細胞のDeltaの発現量が周囲よりも多くなると、周囲の細胞ではNotchがより活性化されて下流でDeltaの発現が抑制される（中）。その結果、Deltaを多く発現した細胞は周囲からのリガンド刺激が減る事によりNotch活性が减弱し、最終的には分化する（右）。

する事が考えられる。しかし、どのようなメカニズムで一部の細胞のみがニューロンに選別されるのかは十分にはわかっておらず、そのメカニズムの解明は哺乳類の中枢神経系発生を理解する上で重要であるといえる。

ショウジョウバエの神経系などでは、分化抑制機能を持つ膜タンパク質 Notch とそのリガンド Delta のシグナル経路による側方抑制機構が均一な細胞集団から細胞の多様性を生み出すのに重要な役割を果たしている事が知られている。Notch-Delta 経路による側方抑制機構は、活性化した Notch の下流でリガンド Delta の発現が抑制される事に基づいて起こる。均一な細胞集団において Delta の発現量が周囲よりも多くなった細胞が現れると、その周囲の細胞では Notch がより活性化し Delta の発現は抑制される (Fig. 1b 中央)。すると、Delta を多く発現した細胞は周囲からのリガンド刺激が減弱し Notch が活性化しなくなり分化する (Fig. 1b 右)。その結果、Notch が活性化している細胞と Delta を発現している細胞は別の細胞で相互排他的に存在するようになる (Fig. 1a, b)。哺乳類の中枢神経系において、Notch の活性化が神経系前駆細胞を強力に分化抑制する事は知られているが、Notch-Delta 経路による側方抑制機構が機能しているかはわかっていなかった。本研究では、マウス大脳発生において神経系前駆細胞から一部の細胞がニューロンに選別される際に Notch-Delta 経路による側方抑制機構が機能しているのかを検討した。

結果

(1) ニューロン分化期の大脳の神経系前駆細胞において Dll1 の発現と Notch1 の活性化は相互排他的である

マウス大脳発生のニューロン分化期においてこれまでの報告では Notch リガンド Dll1 (ショウジョウバエ Delta のホモログ) は神経系前駆細胞では発現せず、ニューロン分化直後に発現が上昇すると考えられてきた。しかし、神経系前駆細胞からニューロン分化細胞が選択される際にも側方抑制機構が機能しているならば、神経系前駆細胞間で Dll1 の発現量に差が生じている事が考えられる。そこで本研究ではまず、ニューロン分化期の大脳において Dll1 の mRNA とタンパク質の発現を調べた。その結果、神経系前駆細胞において Dll1 が発現する事が観察され、さらに神経系前駆細胞において Dll1 の発現に強弱がある事がわかった。側方抑制機構が機能しているならば、Dll1 陽性細胞では Notch 活性が低く、逆に Dll1 陰性細胞では Notch 活性が高い事が予想される。そこで次に、Dll1 発現と Notch 活性の関連について調べた。その結果、大脳の神経系前駆細胞において Dll1 の発現と Notch1 の活性化が同じ細胞では殆ど重ならず、相互排他的に存在する事が明らかとなった (Fig. 2)。これらの結果から、マウス大脳発生において Notch-Delta 経路による側方抑制機構が機能している可能性が示唆された。

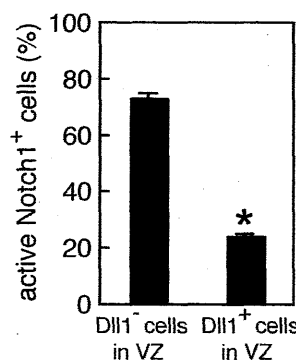


Fig. 2
胎生 13.5 日目のマウス大脳皮質の脳室帯 (VZ) において、Dll1 陽性細胞中、または Dll1 陰性細胞中の活性化型 Notch1 陽性細胞の割合を調べた。
*P<0.0005

(2) in vitro において Dll1 発現細胞は細胞間相互作用を介してニューロンに分化する

もし、側方抑制機構が機能していれば、Delta を周囲よりも多く発現した神経系前駆細胞は、周囲の細胞のニューロン分化を抑制し、続いて周囲の細胞での Delta の発現が抑制されるため、自身は Notch の活性が減弱してニューロン分化する事が予想される。そこで、少数の神経系前駆細胞にのみ Dll1 遺伝子を導入して周囲の細胞との Dll1 の発現量に差をつけ、Dll1 導入細胞のニュー

ロンマーカーTuJ1 陽性細胞の割合を調べた。その結果、DII1 導入細胞はニューロン分化が促進した (Fig. 3a)。この時期の神経系前駆細胞はアストロサイトには殆ど分化しないが、DII1 導入細胞はアストロサイト分化には影響が殆どなかった。また、アストロサイトに主に分化する時期の神経系前駆細胞でもニューロン分化が促進し、アストロサイト分化は抑制された。次に、Fig. 3a で見られた DII1 導入細胞のニューロン分化が側方抑制機構という細胞間相互作用に基づいた分化であるかを調べた。側方抑制機構による分化細胞の決定には、周囲の細胞との DII1 の発現量に差がつく必要がある。そこでまず、周囲の細胞との発現量の差をなくすために殆どすべての神経系前駆細胞に DII1 を遺伝子導入した。その結果、少数の細胞でのみ遺伝子導入した場合に見られた DII1 導入細胞のニューロン分化の促進は見られなくなった (Fig. 3b)。次に、細胞密度を薄くする事で細胞間相互作用を減らすと、DII1 導入細胞のニューロン分化が見られなくなった (Fig. 3c)。さらに、DII1 は細胞内ドメインが切断されて核内移行し細胞自律的に何らかのシグナルを伝えている可能性を示唆する報告があるので、DII1 細胞内ドメインのみを神経系前駆細胞に遺伝子導入したが、ニューロン分化に対する影響はなかった (Fig. 3d)。以上の実験より、Fig. 3a で見られた DII1 発現細胞のニューロン分化促進は細胞間相互作用に基づいた側方抑制機構によるものである事が強く示唆された。

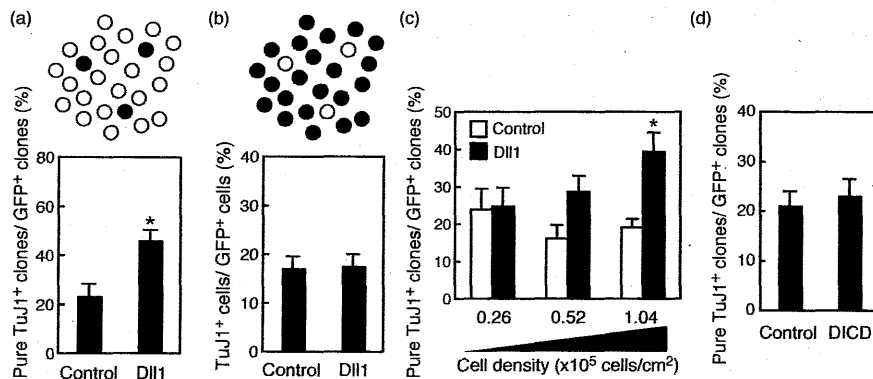


Fig. 3 マウス大脳皮質由来神経系前駆細胞に DII1 または DII1 細胞内ドメイン (DICD) を遺伝子導入し、ニューロンマーカーTuJ1 陽性細胞の割合を調べた。(a,b の模式図の黒丸は遺伝子導入細胞を表す) *P<0.05

(3) *in vivo* において周囲より多く DII1 を発現した神経系前駆細胞はニューロンに分化する

次に、*in vitro* だけでなく *in vivo* においても DII1 を周囲より多く発現した細胞がニューロン分化促進するか検討するため、マウス子宮内において胎児大脳の神経系前駆細胞に遺伝子導入する手法を用いた。胎生 12.5 日目の胎児大脳において少数の神経系前駆細胞にのみ DII1 を過剰発現し、2 日間母胎内で発生を進めた後の遺伝子導入細胞の大脳皮質における位置と、分化状態を調べた。神経系前駆細胞は分化すると脳室帯 (VZ) を離れて脳室下帯 (SVZ) → 中間帯 (IZ) → 皮質板 (CP) へと移動していくが、DII1 導入細胞はコントロールに比べて皮質板へと移動している細胞の割合が高くニューロン分化が促進している事が考えられた (Fig. 4a)。また、DII1 導入細胞における TuJ1 陽性細胞の割合がコントロールに比べて上昇している事がわかり (Fig. 4b)、*in vivo* においても DII1 を周囲の細胞よりも多く発現した細胞はニューロン分化が促進する事がわかった。

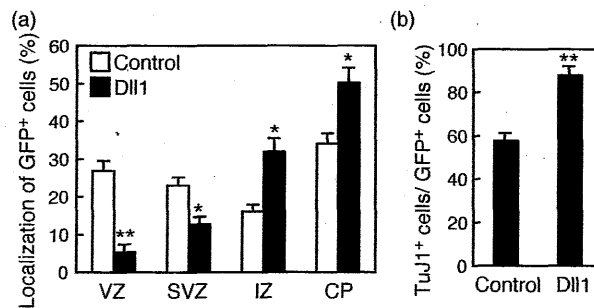


Fig. 4 胎生 12.5 日目のマウス大脳皮質において一部の神経系前駆細胞にのみ DII1 を遺伝子導入し、発生を 2 日進めた後、遺伝子導入細胞の位置 (a) とニューロンマーカーTuJ1 陽性細胞の割合 (b) を調べた。*P<0.01, **P<0.001

(4) *in vivo*においてDll1が周囲の細胞より少ない神経系前駆細胞は未分化性が維持される

さらに、Dll1のニューロン分化細胞選択における必要性を検討するため、Dll1のコンディショナルノックアウト(cKO)マウスを用いた解析を行った。そもそも大脳発生においてどのNotchリガンドがNotchの活性化に重要なのかは分かっていない。そこでまず、Dll1がNotch活性化とニューロン分化抑制においてどれほど重要なのかを検討した。神経系前駆細胞マーカーNestinのpromoter/enhancerの下流でCreリコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスとDll1 locusの一部をloxP配列で挟んだマウス(Dll1 flox/floxマウス)を掛け合わせるにより神経系前駆細胞でDll1をKOした。その結果、胎生11.5日目には大脳におけるNotch1の活性化は殆どみられなくなり、また、ニューロン分化が促進している事がわかった。胎生16.5日目には神経系前駆細胞が枯渇し殆どすべてがニューロンに分化した。このことから、Dll1は大脳発生において神経系前駆細胞の未分化性維持に必須のNotchリガンドである事がわかった。次に、Dll1が側方抑制機構を介したニューロン分化細胞の選択に必要なかを検討するため、*in vivo*において少数の神経系前駆細胞のみDll1をKOする実験を行った。これにより、Dll1 KO細胞は周囲の神経系前駆細胞のNotchを活性化できなくなるので、周囲の細胞はDll1の発現が上昇する。その結果Dll1 KO細胞はNotchが活性化するので未分化性が維持される事が考えられる。そこで、Dll1 flox/floxマウスの胎生12.5日目の胎児大脳において少数の神経系前駆細胞にのみCreリコンビナーゼを遺伝子導入し、3日間母胎内で発生を進めた後の遺伝子導入細胞(Dll1 KO細胞)の位置と、分化状態を調べた。その結果、Dll1 KO細胞はコントロールに比べて神経系前駆細胞が存在する脳室帯により多く残り、未分化性が維持されている事が示唆された(Fig. 5a)。また、Dll1 KO細胞における神経系前駆細胞マーカーPax6陽性細胞の割合もコントロールに比べて増加する事が明らかとなった(Fig. 5b)。殆ど

すべての神経系前駆細胞でDll1をKOするとすべての細胞がニューロンに分化するという結果と合わせると、周囲の細胞との

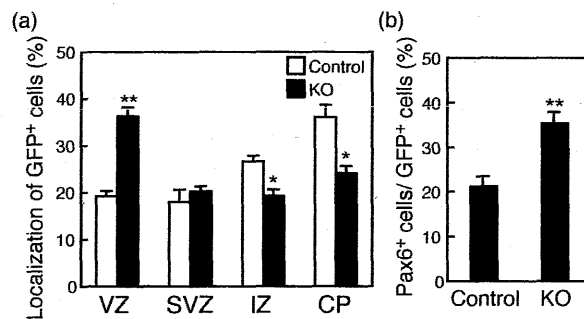


Fig. 5

胎生12.5日目のDll1 flox/floxマウス大脳皮質において一部の神経系前駆細胞にのみCreリコンビナーゼを遺伝子導入してDll1をノックアウト(KO)し、発生を3日進めた後、遺伝子導入細胞の位置(a)と神経系前駆細胞マーカーPax6陽性細胞の割合(b)を調べた。

*P<0.005, **P<0.0005

Dll1の量の違いを介した相互作用がニューロンに分化するか未分化性を維持するかを決めるのに重要である事を示唆しており、すなわちそれは側方抑制機構がニューロン分化細胞選択に必須である事を示唆している。

結論

これまでに、大脳発生において神経系前駆細胞がどのようなメカニズムで一部のニューロン分化細胞を選択しているのかは十分にはわかっていなかった。これまでの報告から、そのメカニズムとしては神経系前駆細胞が分裂する際に分化決定因子を非対称に分配することで分化細胞を決定するという非対称分裂が考えられていた。しかしながら、非対称に分配される分化決定因子の存在は未だ明らかにはなっておらず、その重要性は未解明である。本研究によって、神経系前駆細胞間のDll1の発現量の違いがニューロン分化細胞の選択に重要である事を示した。このことから、細胞分裂時の非対称分配だけでなく細胞間の相互作用を介したNotch-Delta経路による側方抑制機構がニューロン分化細胞選択に寄与している事が示唆された。