

Title	Mapping spatio-temporal activation of Notch signaling during neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse brain
Author(s)	徳永, 暁憲
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/45470
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 **徳 永 暁 憲**

博士の専攻分野の名称 **博 士 (医 学)**

学 位 記 番 号 **第 1 8 9 0 7 号**

学 位 授 与 年 月 日 **平 成 1 6 年 4 月 1 5 日**

学 位 授 与 の 要 件 **学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当**

医学系研究科情報伝達医学専攻

学 位 論 文 名 **Mapping spatio-temporal activation of Notch signaling during neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse brain (マウス発生期脳でのニューロン、グリア分化における Notch シグナル活性化の時間-空間的解析)**

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 内 山 安 男

(副査)

教 授 近 藤 寿 人 教 授 濱 田 博 司

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

哺乳類中枢神経系はニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトからなる多様な細胞群より構成されているが、これらは神経幹細胞と呼ばれる多分化能を保持した細胞から産生される。近年、この多様性の獲得過程において細胞間相互作用に依存した機構が働いていることが明らかにされつつある。この過程において重要な役割を担う因子として Notch シグナルが知られている。Notch は膜貫通型の蛋白をコードしており近隣の細胞に発現する膜結合型リガンド Delta/Jagged に刺激されると、presenilin 等の因子による γ -secretase 活性によりその細胞内領域が切断される。その結果、Notch の細胞内領域が核へと移行し、発現抑制性 bHLH 型転写因子 Hes1 の発現を誘導する。さらに Hes1 が神経分化誘導性の bHLH 型転写因子 Mash1、Neurogenin (Ngn) の発現を抑制することにより近隣の細胞の異なる運命決定や未分化状態の維持に働いている。このように Notch の機能発現には細胞内ドメインの切断が重要である事が明らかとなっている。これまで Notch の遺伝子導入及び遺伝子欠損動物を用いた解析から、神経系において Notch シグナルは未分化状態の維持及び、胎生期初期においてニューロン分化の抑制、後期においてはグリア分化の促進に関与する事が示唆されているが、生体内でいつ、どのような細胞で Notch が活性化しているかはこれまで明らかとされていなかった。そこで、私は Notch1 の活性化に必須と考えられる細胞内ドメインの切断を指標に、生体内での Notch1 の活性化状態を可視化することを目的に研究を行った。

[方法ならびに成績]

私は細胞内ドメインが切断された状態の Notch1 (活性化 Notch1) を特異的に認識する抗体を用いて、マウス発生期脳における Notch1 の活性化パターンの解析を免疫組織化学的手法を用いて行った。Notch1 は脳室周囲に存在する Nestin 陽性の放射状グリア (Radial glia) に一様に発現していることが知られている。それに対して、活性化 Notch1 特異的抗体を用いて観察すると、Notch1 の活性化は Radial glia の一部においてのみ認められた。また、このシグナルはニューロン前駆細胞のマーカーである Mash1 及び Ngn2 陽性の細胞や成熟したニューロンにおいては認められなかった。更に、この抗体により認識される細胞の大半が増殖能を有する細胞である事が BrdU ラベルを用いた解析

により明らかとなった。このことより、未分化な増殖能を有する細胞においてのみ Notch1 が活性化していることが強く示唆された。そこで、更に詳細に細胞周期と Notch1 の活性化との解析を行った結果、その活性化が分裂期 (M 期) の細胞では観察されず、主に DNA 合成期 (S 期) の細胞において引き起こされることが明らかとなり、Notch1 の活性化が細胞周期選択的に起きている事が明らかとなった。

次に、アストログリア分化と Notch1 の活性化との相関を胎生期後期及び生後のマウス脳において検討した。発生期後期においても Notch1 は Radial glia 様の細胞に強く発現していた。また、活性化 Notch1 はその一部でのみ認められた。発生後期において、アストロサイトの分化段階と Notch1 の活性化の関連性を解析するために複数のマーカーの発現を検討した。その結果、Notch1 の活性化が Glutamine synthetase 陽性/GFAP 陰性の幼若なアストロサイトにおいて認められ、アストロサイトへの分化過程で活性化している事が示された。しかしながら GFAP 陽性となった成熟したアストロサイトにおいてはその活性化は殆ど認められないことから、アストログリア分化においては Notch1 の活性化は一過性に働いており、成熟過程においては Notch1 の活性化が惹起されていないことが示された。

[総 括]

本研究は、活性化 Notch1 に対する抗体を使用する事で、これまで不明であった生体内での Notch シグナルの時間-空間的な活性化状態を明らかとした。発生初期において未分化な細胞集団を含む Nestin 陽性細胞群には、活性化 Notch1 陽性の細胞と Mash1/Ngn2 陽性のニューロン前駆細胞とが混在して存在している事が示された。同時に、Nestin 陽性かつ活性化 Notch1 陽性細胞が未分化な神経幹細胞である可能性が示唆された。また発生後期においては未成熟なアストロサイトに Notch1 の活性化が観察され、成熟過程では認められなかった。

本研究において明らかとなった Notch1 の活性化を指標とした未分化細胞の性状解析は、今後、生体内の神経幹細胞の更なる理解に貢献するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

哺乳類中枢神経系の発生過程において、自己複製能と多分化能を有する神経幹細胞からニューロン、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトが産生されるが、それを制御するシグナル経路については不明な点が多く残されている。Notch シグナルは、これまでの遺伝子導入及び遺伝子欠損動物を用いた研究の結果から、神経幹細胞の未分化状態の維持、ニューロン分化の抑制、及びグリア分化の促進などに関与する事が示唆されていた。しかしながら、生体内において、いつどのような細胞で Notch シグナルが活性化しているかを明らかにした研究はなかった。申請者は、Notch1 蛋白質の活性化に必要な細胞内ドメインの切断を指標として、生体内における Notch1 の活性化状態の可視化を試みた。

細胞内ドメインが切断された Notch1 蛋白質 (活性化 Notch1) を特異的に認識する抗体を用いた免疫組織化学によりマウス胎生初期の脳における Notch1 の活性化パターンを解析したところ、Notch1 の活性化は、脳室周囲に存在する Nestin 陽性の放射状グリアの一部においてのみ認められ、Mash1 及び Ngn2 陽性のニューロン前駆細胞や成熟したニューロンには検出されなかった。BrdU 標識実験により、活性化 Notch1 が検出される細胞の大半が増殖能を有することが明らかとなった。更に、Notch1 の活性化と細胞周期との関係を詳細に解析したところ、Notch1 は主に DNA 合成期 (S 期) において活性化し分裂期 (M 期) には不活性化されていることが明らかになり、細胞周期に依存して調節されている可能性が示唆された。これらの結果より、Notch1 は、神経幹細胞を含む増殖性の未分化な細胞集団において活性化することが明らかとなった。

次に、胎生期後期及び生後のマウス脳における Notch1 の活性化パターンを検討した。胎生後期においても Notch1 は放射状グリア様の細胞に強く発現していた。Notch1 の活性化は、Glutamine synthetase 陽性/GFAP 陰性の幼若なアストロサイトにおいても認められたが、GFAP 陽性の成熟アストロサイトにおいては殆ど検出されなかった。これらの結果は、Notch1 がアストロサイト分化の初期過程において一過性に活性化し何らかの機能を果たしていることを示唆するものである。

本研究は、新たに開発された活性化 Notch1 を特異的に認識する抗体を使用して、従来不明であった生体内における Notch シグナルの時間-空間的な活性化状態を明らかにしたものであり、独創的・先進的な研究であると評価できる。本研究によって初めて明らかとなった神経発生過程における Notch1 の活性化状態に関する情報およびその解析法は、今後の神経幹細胞の分化機構とそれを制御する分子メカニズムの解明、さらにはそれらに基づく中枢神経系疾患の診断と治療法の開発に貢献することが期待されることから、博士（医学）の授与に値するものと判定された。