

博士論文概要

論文題目

小脳顆粒細胞前駆体の増殖と分化に関わる
細胞生物学的及び分子生物学的
メカニズムの解析

The cellular and molecular mechanisms of
proliferation and differentiation
of cerebellar granule cell progenitors

申請者

宮下	聡
Satoshi	MIYASHITA

電気・情報生命専攻 光物性工学研究

2018年2月

神経前駆細胞は増殖を繰り返し自身の数を増やす一方で、適切なタイミングで細胞増殖を停止した神経細胞を生み出し、脳神経系の形成に寄与する。この過程がうまくいかないと小頭症や巨脳症などの脳障害を生じることから、神経前駆細胞の増殖および細胞周期離脱の制御機構は、脳形成における極めて重要な発生過程である。しかしながら、神経前駆細胞の細胞分裂時の振る舞いや、その背後にある分子機構については、まだ良くわかっていない。小脳顆粒細胞前駆体(Granule Cell Precursors; GCPs)は、下に記すように、その増殖と神経分化を観察・研究するのに優れた系であることから、本論文において、筆者はGCPsをモデルにして、「中枢神経系における細胞の増殖と分化のタイミングの制御機構」の解明を目指して研究を行った。

GCPsは胎生期に菱脳唇という一次増殖領域から生み出され、その後、外顆粒層(External Granule cell layer; EGL)という二次増殖領域を脳表側に形成する。EGL内でGCPsは増殖しつつ小脳内側へと移動し、適切なタイミングで細胞周期を停止した顆粒細胞(Granule Cells; GCs)を生み出す。こうした分化過程は小脳表層側から内側側へと一方向へと進むため、その細胞の位置からその分化段階が推定できる。また、神経系の大半が胎児期に子宮内で発生するのに対して、GCPsの増殖・分化は生後に進むため、GCPsへの遺伝子導入が簡便である。さらに、小脳スライス培養などでGCPsの細胞分裂や移動などの振る舞いをリアルタイムで観察できる。本研究では、この優れたモデル系を用いることによって、「神経前駆細胞の増殖と分化の制御機構」を明らかにすることを目的とした。

大脳皮質神経前駆細胞では、その分裂方向がランダムではなく規則性を持つことが報告されている。すなわち、脳室帯と呼ばれる細胞増殖層に対して、分裂面が垂直の場合(Vertical Division; VD)には対称分裂(二つの神経前駆細胞や二つの神経細胞が生み出される)が起こり、水平の場合(Horizontal Division; HD)には非対称分裂(一つの神経前駆細胞と一つの神経細胞が生み出される)が起こる。本研究では、(1)GCPsの細胞分裂の方向を調べ、その分裂方向が規則性を持つこと、さらに発生過程を通じてVDやHDの割合がダイナミックに変化すること、を見出した。このことから、GCPsの細胞分裂方向が発生過程で厳密に制御され、適切なタイミングでGCsが産生されることによって、GCsの数が適正に調節されていることが示唆された。(2)また、様々なマーカー探索と細胞周期解析により、GCPsの中に、より未分化な集団(AT⁺GCPs)と少し分化が進んだ集団(ND⁺GCPs)とがあることを見出した。(3)そして、遺伝子導入実験などによって、AT⁺GCPsからND⁺GCPsへ、さらにそこからGCsへと分化するための分子機構の一端を明らかにした。

本論文は全6章で構成され、第1章では研究背景と研究目的を説明している。

第2章では、神経前駆細胞において報告されている分裂面角度と対称分裂・非対称分裂の相関関係を参考に、GCPsにおいて分裂面角度を解析した。まず、細胞分裂について、分裂面が軟膜面に対して垂直な Vertical Division (VD)、軟膜面に対して平行な Horizontal Division (HD)、そして軟膜面に対して斜めの Oblique Division (OD) に分類した。ODは、発生過程を通じてVD、HDに比べて常に低い割合であったことから、GCPsの分裂方向はランダムに選択されるのではなく、VDまたはHDという方向を積極的に選択していると推定された。GCPsの発生初期(胎生後期)ではVDとHDの割合はほぼ同じであるのに対して、GCPsの発生中期においてはHDがVDに対して有意に高くなり、GCPsの発生後期においてはこの傾向が逆転していた。このデータと小脳EGLの形成と消失の時期とを対照することによって、EGLが生後の初期に拡大し生後の後期には消失していく過程を説明するモデルを提唱した。

第3章では、これまでにGCPsの増殖を促進する主要なシグナル経路として報告されていた Sonic hedgehog (SHH) シグナルに着目し、SHHシグナルが分裂面角度に及ぼす影響を調べた。小脳のスライス培養に、SHHシグナルの阻害剤を投与すると、GCPsの分裂面の偏向性が失われ、ランダムになることを見出した。この結果は、SHHシグナルがGCPsの分裂方向の規則性をもたらしていることを示唆している。

第4章では、これまで均一な集団であると考えられてきたGCPsの中に、分化度合いに応じた二種類の細胞集団があることを見出した。EGL内のGCPsは、増殖細胞マーカーのKi67によってラベルすることができる。これまで、GCPsはbHLH型の転写因子Atoh1を発現する均一な細胞集団であると考えられてきたが、免疫染色法を用いたAtoh1とKi67の二重染色によって、GCPsの中にAtoh1陽性および陰性の2種類の細胞が存在することが明らかになった。加えて、Atoh1陰性の細胞において、bHLH型の転写因子NeuroDが発現していることも見出し、これらの前駆細胞をそれぞれAT⁺GCPs、ND⁺GCPsと定義した。次に、細胞周期の長さや遺伝子発現を調べ、ND⁺GCPsの方がより分化した性質の前駆細胞であることを明らかにした。これらの結果から、GCPsはEGL内でその外側からAT⁺GCPs→ND⁺GCPs→GCsの順で二段階の細胞増殖プロセスを経て分化していくという新規モデルを提唱した。EGL内に2種類のGCPsが存在するという結果は、GCPsの増殖・分化に関わる分子メカニズムの研究に新しい視点を与えると考えられる。霊長類の大脳皮質では複数段階の神経前駆細胞の増殖過程が観察されている。本研究ではマウスにおいても類似の二段階増殖過程が見つけられたため、GCPs系を用いた研究がより高等な生物の脳形成研究にも示唆を与えることが期待される。

エレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入実験からは、AT⁺GCPsにおいて、Atoh1をノックダウンすると、異所的なNeuroDタンパクの発現が上昇し、AT⁺GCPs

に NeuroD を過剰発現すると、Atoh1 タンパクの発現が減少することを見出した。これらの結果は、Atoh1 と NeuroD が相互に転写抑制を行っていることを示唆している。

第 5 章では、AT⁺GCPs から ND⁺GCPs への分化がどのような分子メカニズムで制御されているかを明らかにすることを試みた。第 4 章において、細胞周期関連タンパク質の 1 つである CyclinD1 が AT⁺GCPs で一様に発現していたことから、筆者はこれに着目した。一般的に、CyclinD1 は細胞周期の G1 期から S 期への遷移を担う分子であり、CyclinD1 タンパクは G1 期において強く発現し、G1 期以外ではタンパク質分解により発現が抑えられているため、増殖細胞群の中で不均一なタンパク質発現を示すはずである。しかし、AT⁺GCPs では、CyclinD1 が全ての AT⁺GCPs において強く発現していた。このことから、CyclinD1 が G1 期から S 期への遷移促進以外の役割があると考え、shRNA ベクターを用いた CyclinD1 のノックダウン実験を行った。その結果、CyclinD1 が AT⁺GCPs の維持に関与していることが示唆された。さらに、CyclinD1 の過剰発現実験や CyclinD1 と Cdk4 を同時に過剰発現させた実験を比較することで、Cdk4 との結合を介した CyclinD1 の機能が重要であることが示唆された。

第 6 章では、本論文で得られた結果をまとめ、増殖停止のタイミングがどのように制御されているのかという課題に対して、分裂面角度の変化という細胞生物学的観点と、Atoh1 と CyclinD1 を中心とした分子生物学的観点の両面から議論した。本論文で得られた結果は、GCPs の発生だけではなく中枢神経系を含む発生生物学の分野に広く応用される発展性をもった新しい視点である。今後は、それぞれの観点に関してさらに深く研究を推進していくとともに、特に Atoh1 や CyclinD1 が分裂面角度の制御にどのように関わるのか、分裂面角度が決定されると Atoh1 や CyclinD1 にどのような影響を与えるのかといった課題に取り組むことが重要である。また、小児期に発症する悪性の神経腫瘍である小脳髄芽腫において、今回解明した分裂面の制御や分子メカニズムがどのように関わるのかを解析することによって、病態の解明や治療法に関する新たな知見が得られると期待される。

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 宮下 聡

印

(2017年 12月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>○題名: Dynamics of the cell division orientation of granule cell precursors during cerebellar development. 発表・発行掲載誌名: Mechanisms of Development, 147:1-7. 発表・発行年月: 2017年4月 連名者: <u>Miyashita S</u>, Adachi T, Yamashita M, Sota T, Hoshino M</p> <p>題名: Origins of oligodendrocytes in the cerebellum, whose development is controlled by the transcription factor, Sox9. 発表・発行掲載誌名: Mechanisms of Development, 140:25-40 発表・発行年月: 2016年5月 連名者: Hashimoto R, Hori K, Owa T, <u>Miyashita S</u>, Dewa K, Masuyama N, Sakai K, Hayase Y, Seto Y, Inoue YU, Inoue T, Ichinohe N, Kawaguchi Y, Akiyama H, Koizumi S, Hoshino M.</p> <p>題名: Temporal identity transition from Purkinje cell progenitors to GABAergic interneuron progenitors in the cerebellum. 発表・発行掲載誌名: Nature Communications, 5:3337 発表・発行年月: 2014年2月 連名者: Seto Y, Nakatani T, Masuyama N, Taya S, Kumai M, Minaki Y, Hamaguchi A, Inoue YU, Inoue T, <u>Miyashita S</u>, Fujiyama T, Yamada M, Chapman H, Campbell K, Magnuson MA, Wright CV, Kawaguchi Y, Ikenaka K, Takebayashi H, Ishiwata S, Ono Y, Hoshino M.</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
学会発表 ポスター	<p>題名：小脳顆粒細胞前駆体の分化制御における Prox1 の役割/Prox1 regulate the transition from proliferative state to mature state of cerebellar granule cell precursors. 発表：Neuro2013 発表年月：2013年6月 連名者：宮下 聡 / Satoshi Miyashita, 瀬戸 祐介 / Yusuke Seto, 川口 義弥 / Yoshiya Kawaguchi, 宗田 孝之 / Takayuki Sota, 星野 幹雄 / Mikio Hoshino</p> <p>題名：Prox1 regulates the last mitosis of granule cell precursors. 発表：包括脳ネットワーク夏のワークショップ 発表年月：2013年6月 連名者：宮下 聡 / Satoshi Miyashita, 瀬戸 祐介 / Yusuke Seto, 川口 義弥 / Yoshiya Kawaguchi, 宗田 孝之 / Takayuki Sota, 星野 幹雄 / Mikio Hoshino</p> <p>題名：小脳顆粒細胞における Prox1 の機能解析 /Prox1 regulates the last mitosis of cerebellar granule cells. 発表：2013年度 分子生物学会年会 発表年月：2013年12月 連名者：宮下 聡 / Satoshi Miyashita, 瀬戸 祐介 / Yusuke Seto, 川口 義弥 / Yoshiya Kawaguchi, 宗田 孝之 / Takayuki Sota, 星野 幹雄 / Mikio Hoshino</p> <p>題名：Prox1 regulates the development of cerebellar granule cell precursors by modulating the cell cycle kinetics. 発表：第38回日本分子生物学会年会 発表年月：2015年12月 連名者：宮下 聡 / Satoshi Miyashita, 瀬戸 祐介 / Yusuke Seto, 曾田 将吾 / Syogo Aida 川口 義弥 / Yoshiya Kawaguchi, 宗田 孝之 / Takayuki Sota, 星野 幹雄 / Mikio Hoshino</p> <p>題名：Prox1 regulates the development of cerebellar granule cell precursors by modulating the cell cycle kinetics. 発表：包括脳ネットワーク冬のシンポジウム 発表年月：2015年12月 連名者：宮下 聡 / Satoshi Miyashita, 瀬戸 祐介 / Yusuke Seto, 曾田 将吾 / Syogo Aida 川口 義弥 / Yoshiya Kawaguchi, 宗田 孝之 / Takayuki Sota, 星野 幹雄 / Mikio Hoshino</p> <p>題名：Prox1 limits the mitotic potential of cerebellar granule cell precursor through mitosis-dependent deacetylation of CyclinD1 promoter. 発表：第10回神経発生討論会 発表年月：2017年3月 連名者：宮下 聡 / Satoshi Miyashita, 瀬戸 祐介 / Yusuke Seto, 曾田 将吾 / Syogo Aida 川口 義弥 / Yoshiya Kawaguchi, 宗田 孝之 / Takayuki Sota, 星野 幹雄 / Mikio Hoshino</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
学会発表 ポスター	<p>題名：小脳顆粒細胞における Prox1 による脱アセチル化を介した増殖停止メカニズムの解析 発表：第40回神経科学大会 発表年月：2017年7月</p> <p>連名者：宮下 聡 / Satoshi Miyashita 瀬戸 裕介 / Yusuke Seto 大輪 智雄 / Tomoo Owa 田谷 真一郎 / Shin' Ichiro Taya 川口 義弥 / Yoshiya Kawaguchi 宗田 孝之 / Takayuki Sota 星野 幹雄 / Mikio Hoshino</p>
学会発表 口頭	<p>題名：Prox1 switches Granule cell precursors from proliferative to differentiative state in cerebellum. 発表：第7回神経発生討論会</p> <p>発表年月：2014年3月 連名者：宮下 聡 / Satoshi Miyashita, 瀬戸 祐介 / Yusuke Seto, 川口 義弥 / Yoshiya Kawaguchi, 宗田 孝之 / Takayuki Sota, 星野 幹雄 / Mikio Hoshino</p> <p>題名：小脳顆粒細胞における Prox1 の機能解析</p> <p>発表：第9回神経発生討論会 発表年月：2016年3月 連名者：宮下 聡 / Satoshi Miyashita, 瀬戸 祐介 / Yusuke Seto, 曾田 将吾 / Syogo Aida 川口 義弥 / Yoshiya Kawaguchi, 宗田 孝之 / Takayuki Sota, 星野 幹雄 / Mikio Hoshino</p> <p>題名：Prox1 regulates the cell cycle exit of cerebellar granule cell precursors through suppression of a cell cycle-related gene. 発表：第39回神経科学大会</p> <p>発表年月：2016年7月 連名者：宮下 聡 / Satoshi Miyashita, 瀬戸 祐介 / Yusuke Seto, 曾田 将吾 / Syogo Aida 川口 義弥 / Yoshiya Kawaguchi, 宗田 孝之 / Takayuki Sota, 星野 幹雄 / Mikio Hoshino</p>