

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

2018年4月

宮下 聡

Satoshi MIYASHITA

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

2018年4月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
電気・情報生命専攻 光物性工学研究

宮下 聡

Satoshi MIYASHITA

目次

略語一覧	1
1. 研究背景	2-9
1.1 序論	
1.2 脊椎動物における小脳発生	
1.3 小脳顆粒細胞の発生	
1.4 研究目的	
2. 小脳顆粒細胞における分裂軸の解析	10-18
2.1 序論	
2.2 実験手法	
2.3 結果	
2.4 考察	
3. SHHシグナルが分裂面角度の決定に与える影響の解析	19-22
3.1 序論	
3.2 実験手法	
3.3 結果	
3.4 考察	
4. 転写因子Atoh1とNeuroDが小脳顆粒細胞のサブタイプを決定する	23-42
4.1 序論	
4.2 実験手法	
4.3 結果	
4.4 考察	

5. CyclinD1によるAT ⁺ GCPsの維持機構の解明	43-52
5.1 序論	
5.2 実験手法	
5.3 結果	
5.4 考察	
6. 総括	53-61
参考文献	62-75
謝辞	76
研究業績	77-79

略語一覽

AT⁺GCPs; Atoh1 positive GCPs
EdU; 5-Ethynyl-2-deoxyuridine
EGL; External Granule cell Layer, 外顆粒層
E16.5; Embryonic day 16.5, 胎生 16.5 日齡
GCs; Granule Cells, 小腦顆粒細胞
GCPs; Granule Cell Precursors, 小腦顆粒細胞前驅體
HD; Horizontal Division
iEGL; inner EGL
ISVZ; Inner SVZ
ND⁺GCPs; NeuroD positive GCPs
oEGL; outer EGL
OD; Oblique Division
OSVZ; Outer SVZ
P15; Postnatal day 15, 生後 15 日齡
PH3; Phospho-Histone H3
Ptch; Patched
Rb; Retinoblastoma
RG; Radial Glia
RL; Rhombic Lip, 菱腦唇
SHH; Sonic hedgehog
Smo; Smoothened
T_s; Total S phase length
T_c; Total Cell phase length
SVZ; Sub Ventricular Zone, 腦室下帶
VD; Vertical Division
VZ; Ventricular Zone, 腦室帶

第1章 研究背景

1.1 序論

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増殖を停止した神経細胞を生み出し、中枢神経系の形成に寄与する。このタイミングの制御が損なわれると、小頭症や巨脳症などの脳障害を生じることが報告されている (Ernst, 2016)。例えば、小脳において、抑制性神経細胞の産み出しを制御する *Ptf1a* という遺伝子を欠失した突然変異マウスでは、小脳顆粒細胞前駆体 (Granule Cell Precursors; GCPs) の増殖が著しく阻害され、小脳組織が形成されなくなる (Hoshino et al., 2005)。その結果、このマウスでは、重度の運動失調が観察される。一方、GCPs の増殖が過剰に起こる遺伝子変異マウスでは、小脳組織が肥大化し、小脳髄芽腫という GCPs 由来の神経腫瘍を発症する原因となることが報告されている (Goodrich et al., 1997; Miyazawa et al., 2000)。これらの例からも、中枢神経系において、前駆細胞の増殖が適切に維持され、適切に停止するという過程が、極めて重要な発生過程であるということがわかる。細胞の増殖や増殖の停止に関わる分子機構の解明は長らく発生生物学の中心的な課題であり、これまでに増殖の維持や停止に関わる数多くの分子が同定されてきた (Stein and Lian, 1993; Kenney et al., 2003; Custo Greig et al., 2013)。しかしながら、増殖している細胞が、増殖を停止するタイミングがどのように決まっているのか、その分子機構は何か、という課題に関しては未だに不明な点が多い。この課題は、発生生物学の極めて重要な課題であるだけでなく、再生医療への応用や悪性腫瘍の病態解明などへ広がる可能性のある発展性のある課題である (Vazin and Freed 2010; Feitelson et al., 2015)。

本論文において筆者は、GCPs の発生機構の解明を通じて 「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 の発生がこの課題を解決する上で、非常に有用なモデルであることは以下に挙げる特徴による。

- ① GCPs は、ヒトの全中枢神経細胞のうち 8 割を占める小脳の神経細胞の大部分を構成する細胞であり、その発生過程や遺伝子発現に関しては古くから研究されている一方で、増殖を停止する分子メカニズムに関

しては未だ完全には解明されていない(Ramon y Cajal, 1911; Ramon He et al., 1989; Azevedo et al., 2009; Behesti and Marino, 2009)。

- ② 他の多くの神経細胞が胎生期に発生が完了する一方で、生後に発生が起こるため、遺伝子改変マウスを用いた実験やマウスへの遺伝子導入などの遺伝子工学的・分子生物学的な解析が行いやすい(Chedotal, 2010; Holubowska et al., 2014)。
- ③ GCPs の増殖の維持や停止には、他の組織においても機能が報告されている分子が多く関わるため、GCPs での結果を他の組織に応用可能である(Harrison and Montgomery, 2017)。

1.2 脊椎動物における小脳発生

マウスの胎生 8 日目から 10 日目にかけて、大まかに領域化がなされた Neural plate から、より厳密に領域化された Neural tube が形成される。この Neural tube における菱脳から、小脳が発生する。小脳の形成には、菱脳と中脳の境界に存在する峡部からの FGF シグナルが重要であることが知られており、このシグナルによって、小脳が形成される(Butts et al., 2014)。胎生 10 日目から 16 日頃にかけて、小脳神経細胞を産み出す全ての神経幹細胞は、第 4 脳室に接する脳室帯 (Ventricular Zone; VZ) とそれに隣り合う菱脳唇 (Rhombic lip; RL) に存在する (図 1.1) (Leto et al., 2016)。生体の小脳はおおよそ 10 種類の神経細胞から構成され、VZ からは小脳を構成する全ての抑制性神経細胞が、RL からは全ての興奮性神経細胞が産み出されることが古くから知られていたが、近年の遺伝学的な実験手法の進歩によって、興奮性の神経細胞と抑制性の神経細胞の産み出しに関わる遺伝子が明らかになった。1995 年、Akazawa らの研究グループによって、RL に bHLH 型の転写因子である *Atoh1* が発現していることが初めて報告された(Akazawa et al., 1995)。1998 年には、*Atoh1* 遺伝子の欠損マウス(KO マウス)において、興奮性の神経細胞が欠失することが報告され、*Atoh1* が興奮性の神経細胞の産み出しに必要な遺伝子であることが示された(Ben-Arie et al., 1997)。その後、*Atoh1* 遺伝子座に、Tamoxifen 誘導的に Cre の活性を持つ CreER を挿入した *Atoh1*-CreER マウスを用いて、時空間特異的に神経細胞を標識する遺伝学的手法を用いた解析が行われ、RL に発現する *Atoh1* 陽性細胞から、E10.5~11.5 には深部小脳核の興奮性

神経細胞が、E12.5～E15.5には小脳顆粒細胞(GCs; Granule Cells)および小脳双極性細胞が産み出されることが明らかになった(Machold and Fishell, 2005; Wang et al., 2005)。これらの一連の研究によって小脳を構成する興奮性神経細胞はAtoh1を発現する細胞から産み出され、その運命決定にはAtoh1遺伝子の発現が必要であることが示された。このように興奮性の神経細胞の起源や運命決定に関わる分子の解明が進んでいた一方で、抑制性の神経細胞の運命決定分子に関しての解析はほとんど明らかになっていなかった。しかし、2005年にHoshinoらのグループが小脳組織を欠失した突然変異マウスであるCerebelessの原因遺伝子が、bHLH型の転写因子Ptflaであることを示し、VZから産み出される抑制性の神経細胞の運命決定にはPtflaが必要であることが明らかになった(Hoshino et al., 2005)。さらに、Hoshinoらは、Ptfla-CreERマウスを用いた解析によって、小脳組織に存在する全ての抑制性神経細胞の起源がPtflaを発現する神経幹細胞であることを示した。このように遺伝学的手法の技術的な進歩を背景に、小脳神経細胞の起源や運命決定に関わる分子の解析は目を見張る発展を見せた一方で、小脳に存在する神経幹細胞・前駆細胞の増殖と分化を制御する分子機構に関しては未だ不明な点が多く残されている。この制御機構を解明することは、基礎的な神経科学の発展という観点からだけでなく、後述する小脳における悪性腫瘍である小脳髄芽腫の分子病態の解明といった応用的な分野の観点からも重要な課題である(Manoranjan et al., 2012)。

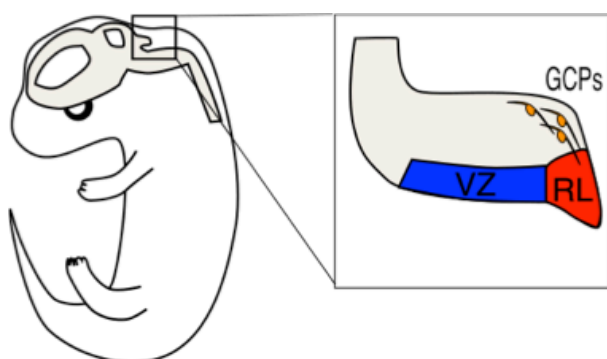


図 1.1 胎生期小脳模式図

脳室帯(VZ)からは抑制性の神経細胞が産み出され、菱脳唇(RL)からは顆粒細胞前駆体(GCPs)が産み出される。GCPsはその後、軟膜面に沿って移動し、外顆粒層(EGL)を形成する。

1.3 GCPsの発生

前述の通り、小脳神経細胞を構成するほとんどの神経細胞は胎生期のVZもしくはRLを起源とし、そこで増殖し分化をして神経回路に組み込まれるが、抑制性の介在性神経細胞と興奮性のGCPsにおいては、それぞれの前駆体が、胎生期にそれぞれVZとRLで増殖した後、増殖を一時停止し、二次的なニッチまで移動し、そこで再び増殖を開始することが知られている(Altman 1972; Alder et al., 1996; Mathis et al., 1997; Milosevic and Goldman, 2002)。特に、小脳顆粒細胞前駆体は胎生後期においては極めて少数の集団であるが、発生が完了した生体の小脳では、全小脳神経細胞の9割、全中枢神経系の細胞の7割を占めるほどにまで、その数を爆発的に増加させることが知られている。

RLで増殖を停止したGCPsは、E12.5~15.5にかけて小脳皮質を覆う軟膜に沿って移動し、二次的なニッチである外顆粒層(External Granule cell Layer; EGL)を形成する(Altman and Bayer, 1996)。EGLにおいてGCPsは、表層に近い領域(outer EGL; oEGL)において増殖細胞マーカーであるKi67を発現しながら増殖し、その後増殖を停止し、より内側の領域(inner EGL; iEGL)で増殖停止マーカーであるp27を、GCsに分化する(図1.2)。分化したGCsはEGLを離脱し、分子層を通過して内顆粒層に移動し、そこで神経回路に組み込まれる(Komuro and Yacubova, 2003)。マウスにおいてEGLは生後2~3週間ほど存在し、胎生後期からEGL消失まで増殖が維持されることで、多数のGCsを産み出すことができると考えられている。興奮性神経細胞の運命決定に関わるAtoh1は、RLからoEGLに移動し増殖するGCPsで発現し続け、増殖を停止し、分化するとその発現が消失する(Flora et al., 2009)。さらに、oEGLの細胞においてAtoh1を欠失させるとGCPsの増殖は著しく阻害され、逆にAtoh1を過剰発現させたtransgenicマウスにおいては、増殖が亢進し分化が阻害されることが報告されている(Helms et al., 2001)。つまり、Atoh1は胎生期のRLにおいてはGCsを含む顆粒細胞の運命決定に関わる一方で、胎生後期から生後のEGLにおいてはGCPsの増殖を正に制御していることを示している。Sonic Hedge Hog (SHH) シグナルもAtoh1と同様に、GCPsが増殖し続けるために、重要な制御因子であることが知られている(Dahmane, 1999; Wallace, 1999; Wechsler-Reya and Scott, 1999)。SHHは、個体の発生において、体節形成や細胞増殖に極めて重要

な役割を持つ分泌分子である。SHHシグナルは、リガンドであるSHHがレセプターであるSmoothed(Smo)に結合して、シグナルを伝達する(Varjosalo and Taipale, 2008)(図1.3)。7回膜貫通型の膜分子であるSmoはSHHと結合していないときは、同じく膜状に存在するPatched(Ptch)によって、活性が抑えられているが、SHHと結合することで構造変化を起こしPtchと解離し、細胞内にシグナルを伝え、転写因子のGliやMycの転写が促進される(Rimkus et al., 2016)。小脳においては、抑制性の神経細胞であるPurkinje CellからSHHが分泌され、それがGCPsの主要な増殖因子であることが報告されている(Lewis et al., 2004)。GCPsはSHHシグナルを受けると、Gli1/2やN-Mycの発現量を上昇させ、その下流で、細胞周期のG1期からS期への遷移を担うCyclinファミリーであるCyclinD1が転写され、その結果GCPsの増殖が促進される(Kenney et al., 2003)。また、Atoh1の下流にはGliが存在し、Atoh1の発現がSHHシグナルによるGCPsの増殖に必要であることや、SHHシグナルにAtoh1のタンパク分解を阻害する機能があることがこれまでに報告されている(Flora et al., 2009; Forget et al., 2014)。つまり、GCPsが増殖を維持するためにはAtoh1とSHHシグナルの両方が必要であり、どちらか一方の機能が阻害されると、GCPsは速やかに分化すると考えられる。GCPsの増殖の維持に関する、これら二つの分子の重要性は小脳髄芽腫のモデルマウスを用いた研究からも明らかになっている(Ayrault, 2010)。

小脳髄芽腫は小児に発症する悪性腫瘍のひとつであり、現在、その形態学的、分子生物学的特徴によってWNT型、SHH型、グループ3、グループ4という4つのサブタイプに分類されている(Taylor et al., 2012)。この中のグループ3, 4に関しては未だ不明な点が多く残るものの、近年、それぞれのグループの特徴を決定する分子に関する研究が進んできている(Thompson et al., 2006; Northcott et al., 2011; Kool et al., 2014)。特にSHH型は、発症率が最も高いこと、さらに、悪性度がグループ3について高いことから、最も多くの研究がなされているタイプである。SHH型の小脳髄芽腫は、SHHシグナルが過剰に亢進したGCPsに起因することが報告されている(Schuller et al., 2008; Yang et al., 2008)。実際に、ヒトのSHH型の小脳髄芽腫では、SHHシグナルの下流で転写されるGLI2やNMYCの発現が上昇し悪性度と相関している(Ahmed et al., 2011; Buczkowicz

et al., 2011; Kool et al., 2014)。さらに、マウスにおいては、Smoの活性化や、Ptchの欠失によって、SHH型の小脳髄芽腫を発症する (Goodrich et al., 1997)。興味深いことに、Smoが活性化した小脳髄芽腫のモデルマウスにおいて、Atoh1を欠失させると、小脳髄芽腫の形成や悪性化を抑制できる (Flora et al., 2009; Han et al., 2009)。これらのモデルマウスを用いた研究からも示唆される通り、GCPsの増殖を維持するためにはSHHシグナルとAtoh1が協調的に働く必要があることがわかる。

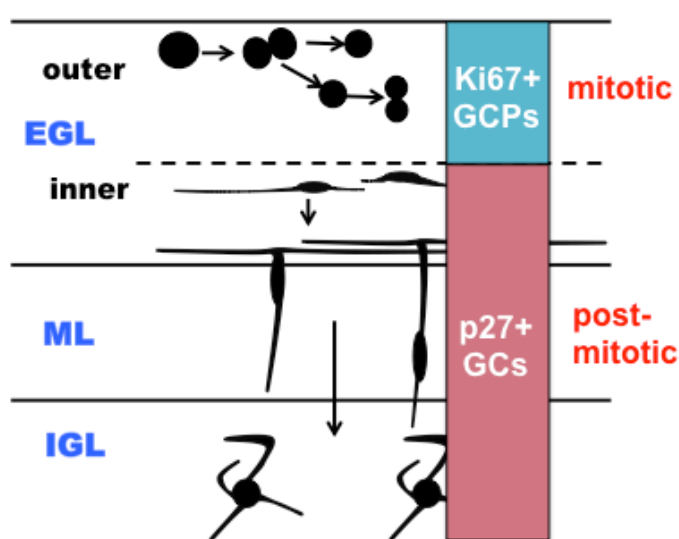


図 1.2 EGL の模式図

外顆粒層 (EGL) は胎生後期から生後 2~3 週にかけて小脳で見られる構造で、表層側 (outerEGL) に KI67 陽性の GCPs が存在し、実質側 (inner) に p27 陽性の顆粒細胞 (GCs) が存在する。GCs はその後分子層 (ML) を通って内顆粒層 (IGL) へと移動する

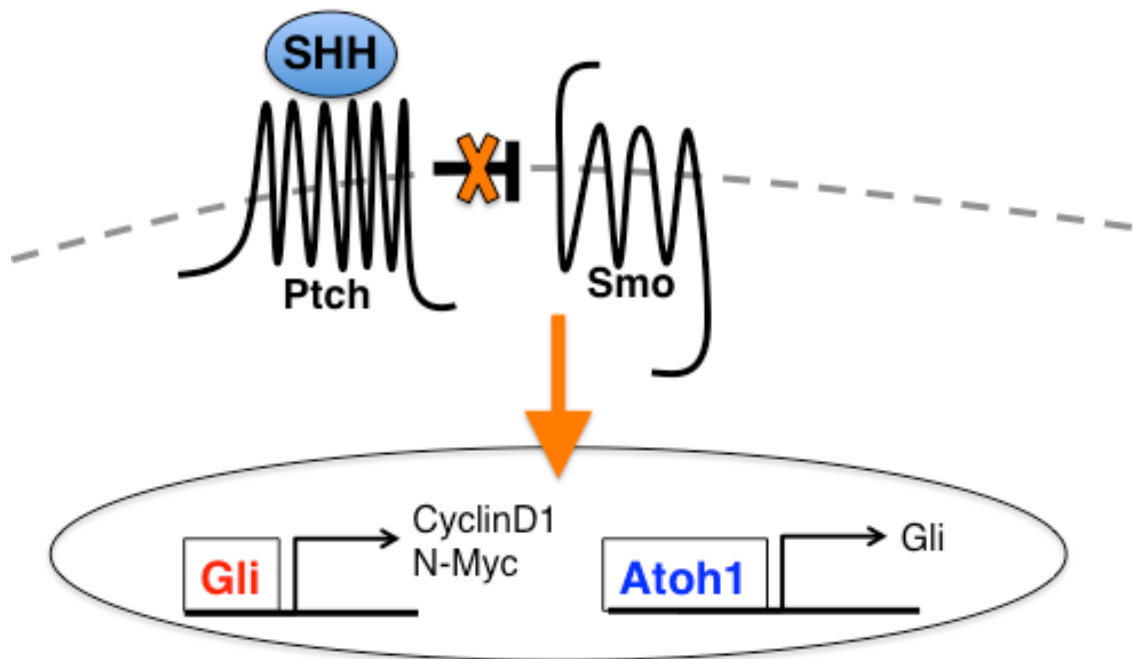


図 1.3 SHH シグナル模式図

SHH が Ptch に結合すると、Ptch による Smo の抑制ができなくなり、下流にシグナルが伝わる。SHH シグナルを伝える転写因子である Gli は CyclinD1 や N-Myc といった増殖を促進する分子の発現を上昇させる。同時に、SHH シグナルの下流では Atoh1 タンパクが安定化し、Atoh1 のターゲット分子の発現が上昇する。

1.4 研究目的

神経前駆細胞の増殖と分化が適切に制御されることは、中枢神経系の形成過程において極めて重要な過程であると同時に、この制御機構を明らかにすることは、中枢神経系の発生を理解するだけでなく、その破綻によって生じる疾患の病態を解明するために重要な課題である。GCPsは、中枢神経系の全神経細胞の大部分を占めるGCsの前駆細胞であり、胎生後期から生後にかけて、爆発的にその数を増加させる。その増殖を適切に制御し停止させなければ小脳髄芽腫のような悪性腫瘍の形成につながってしまう。しかしながら、GCPsの増殖の停止と分化を制御する分子メカニズムに関しては未だ不明な点が多い。本研究では、GCPsの発生を制御する分子機構を明らかにすることで、「神経前駆細胞の増殖と分化の制御機構」を解明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 (Wilcock et al., 2007; Zhong and Chia, 2008)。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。対称分裂と非対称分裂の際、細胞がどのような挙動を示すかに関しては数多く研究がなされた一方、分裂面の角度を決定する分子機構に関しては未だ未解明な点が多い。そこで本研究では、(1) GCPsの細胞分裂の方向を調べ、その分裂方向に規則性があるかどうかを解析した。その結果、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。以上の結果を受けて、(2) 小脳スライス培養の系を用いて、GCPsの分裂面角度を決定する分子機構を明らかにすることを目的に解析を行った。次に、(3) GCPsの増殖と分化を制御する分子機構のさらなる解析のために、oEGLにおける様々なマーカー探索と細胞周期解析を行った。これまで均一と考えられていたoEGLのGCPsの中に、異なる細胞集団が存在することを見出した。最後に、(4) 遺伝子導入実験などによって、これらの細胞集団の分化を制御する分子機構の解明を目指した。

第2章 小脳顆粒細胞における分裂軸の解析

2.1 序論

GCPs における増殖の停止機構を明らかにするために、GCPs が分裂する際の分裂軸に着目して研究を行った。神経前駆細胞や幹細胞において分裂軸の方向とそこから産み出される娘細胞の運命(増殖を維持するか停止するか)が相関していることが、報告されている(Wilcock et al., 2007; Zhong and Chia, 2008)。Chen と McConell は、大脳皮質におけるタイムラプスイメージングによって、神経幹細胞が、軟膜に対して平行に分裂する場合(平行分裂)には、産出される娘細胞はどちらも神経幹細胞か、どちらも増殖を停止した神経細胞になること(対称分裂)を見出した(Chenn and McConnell, 1995)。一方、軟膜に対して垂直に分裂する場合には(垂直分裂)、1つの神経幹細胞と1つの神経前駆細胞を産み出すこと(非対称分裂)が観察された。その後、大脳皮質以外でもこの現象が観察されたことから、神経幹細胞や神経前駆細胞に共通した現象であることが示唆された。そこで、小脳においても同様の現象が観察されるかどうかを生後マウスの様々なステージで確かめた。

2.2 実験手法

2.2.1 動物

本論文で行った全ての動物実験は、国立精神神経医療研究センター神経研究所が設置する動物倫理委員会において承認されている(承認番号;2017018)。また、全ての動物実験は、日本 SLC より購入した ICR マウス及びその胎児を用いて行った。

2.2.2 マウスの固定と標本作成

胎生 16.5 日目のマウスは、母体から摘出後、氷冷した PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 0.2 mM) 内で速やかに脳組織を取り出し、4%PFA/PBS 溶液(ナカライテスク)に移し、4°C で 2 時間固定した。生後のマウスは、三種混合麻酔(3% ドミツール(日本全薬工業) 8% ドルミカム(アステラス製薬), 10% ベトルフェノール(ファルマ)/生理食塩

水(大塚製薬))によって麻酔をかけ、4% PFA/PBS を用いて 10 分間灌流固定を行った。灌流固定後、固体から脳組織を取りだし、氷上で 2 時間 4% PFA/PBS によって後固定を行った。

固定した脳組織は、10%-20%-30%スクロースによって置換し、O. C. T compound で包埋し、凍結保存した。凍結保存した脳組織は、クライオスタット(Leica Biosystems)を用いて、16 μ m の厚さの標本にし、スライドガラスに貼り付けた。

2.2.3 免疫染色と抗体

スライドガラスに貼り付けた標本を 3 回 PBS で洗浄し、室温で 1 時間 1% Donkey Serum/0.2%PBST(0.2% Triton-X を含む PBS) でブロッキングを行った。そして、ブロッキング液で希釈した一次抗体液を用いて、4°Cで一晩、一次抗体反応を行った。翌日、PBS で一次抗体液を洗浄し、alexa488 で標識された二次抗体(abcam)を用いて、室温で 2 時間、二次抗体反応を行った。次に、PBS で二次抗体液を洗浄し、PBS で 20000 倍に希釈した DAPI(同仁化学研究所, D523)を室温で 10 分間反応させた。最後に、PBS で DAPI を洗浄し、PermaFluor(LVC)で封入した。用いた一次抗体は、rabbit anti phosphor-histone H3(Cell Signaling Technology, 9701S)、二次抗体は Donkey anti rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 488)(abcam, ab150073)。

2.2.4 観察と統計解析

免疫染色を行ったサンプルは共焦点顕微鏡 (LSM780, Carl Zeiss) で観察し、ImageJ(RSB)で解析を行った。免疫染色を行ったサンプルは、小脳の吻側から観察し、最初の 50 細胞の分裂軸の角度を計測した。次に、分裂面の角度を、ImageJ を用いて計測した(図)。まず、DAPI の染色像をもとに、EGL と軟膜面の境界線を引き、二つの娘細胞の分裂面と境界線から引いた垂線がなす角度を、ImageJ の角度ツールを用いて計測した。二つの娘細胞の分裂面角度の平均値を計算し、0-30° の場合を Vertical Division、30° -60° の場合を Oblique Division、60° -90° の場合を Horizontal Division にそれぞれ分類した。これを 3 個体について行い、各ステージにおける分裂面角度の割合を決定した。さらに、盲検にて得られた傾向を確認した。

①画像の取得 ②境界線の決定 ③分裂面角度の計測

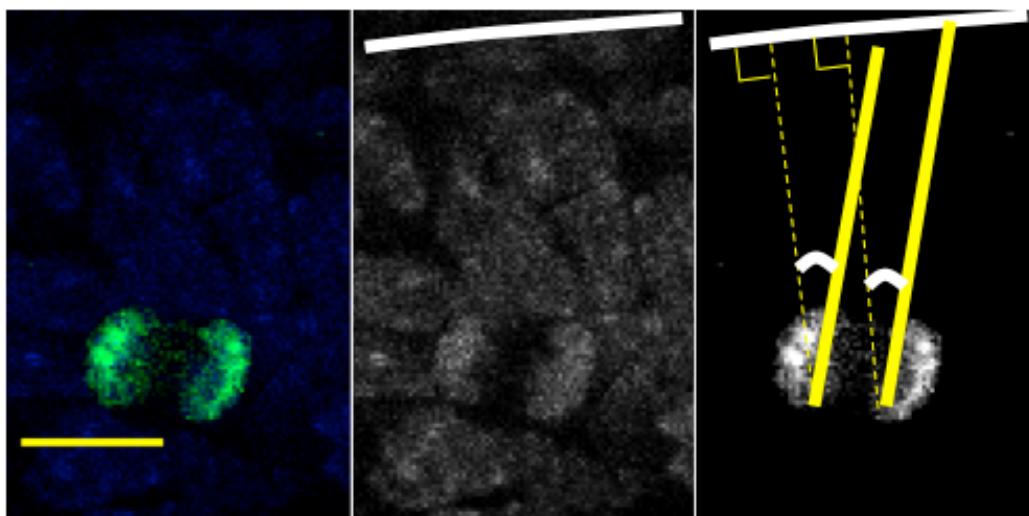


図 2.1 分裂面角度の計測

取得した画像(図は、生後9日目の冠状面における分裂細胞)をImageJに取り込み、境界線(白実線)を決定した。境界線から引いた垂線(黄点線)と二つの娘細胞の分裂面(黄実線)がなす角をそれぞれ測定し、その平均値を求めた。この場合は、左側の娘細胞の分裂面角度が 17.26° 、右側の娘細胞の分裂面角度が 14.28° であり、その平均値は 15.77° (Vertical Division)であった。scale bar $10\mu\text{m}$ 。

2.3 結果

2.3.1 PH3を用いたGCPsの分裂面角度の分類

最初に、分裂中のGCPsを可視化するために、生後6日目のマウスの小脳組織を用いて、Phospho-Histone H3(PH3)抗体による免疫染色を行った。(図2.3A-F)緑色の蛍光で可視化されるPH3の染色は、EGLの中に散在していることが観察された。青色で示されるDAPIによるDNAの染色像と重ねると、分裂中に分離している染色体と緑色のシグナルが重なっていたことから、PH3が分裂中のGCPsを可視化する良いマーカー分子であると考えられた。これ以降、分裂面の角度と軟膜がなす角によって、GCPsを(1)Vertical Division($0-30^\circ$; VD)、(2)Oblique Division($30-60^\circ$; OD)、(3)Horizontal Division($60-90^\circ$; HD)の3種類に分類し、解析を行った(図2.3G-J)。

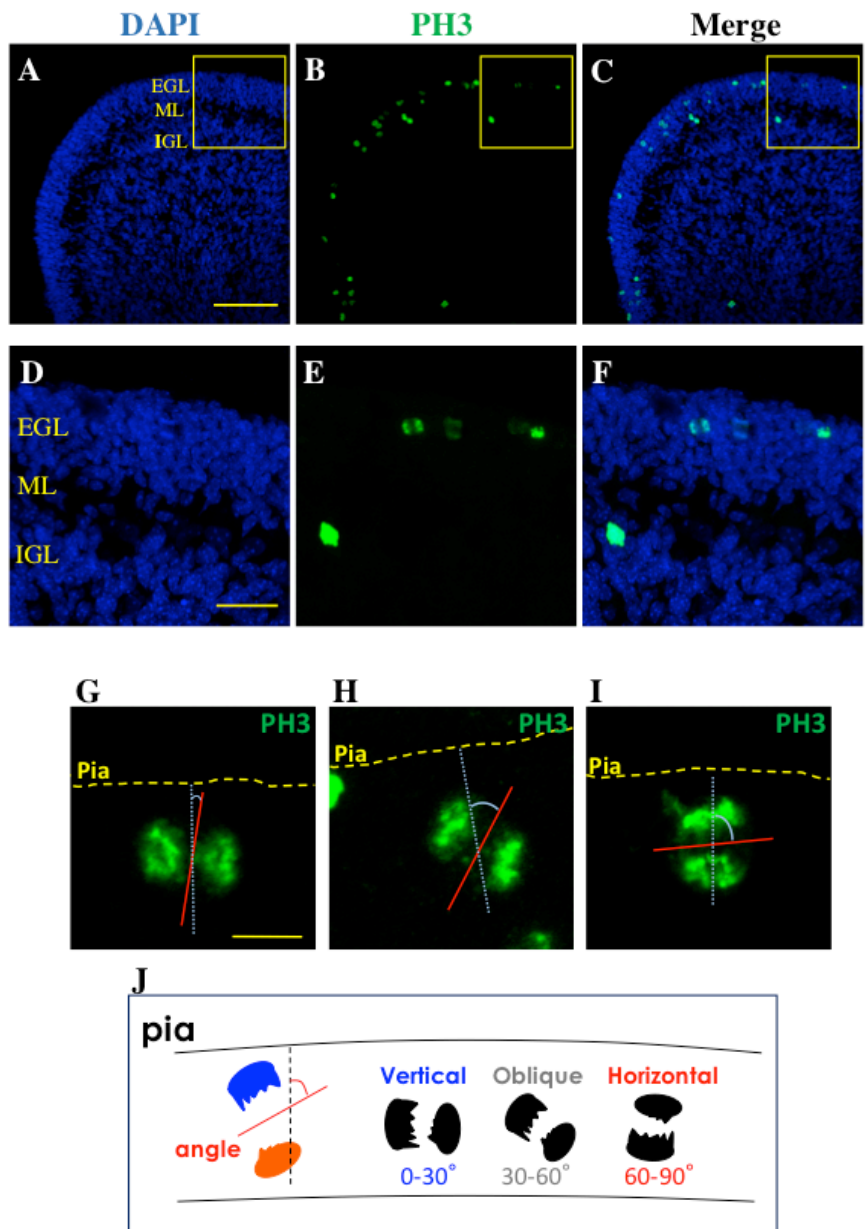


図 2.2 小脳における PH3 の発現様式

(A-F)小脳における PH3 の発現様式。DAPI(青), PH3(緑), scale bar 100 μm (A-C), 30 μm (D-F)

(G-J) PH3 の染色像をもとに、GCPs の分裂面角度を Vertical Division (0-30°), Oblique Division(30-60°),Horizontal Division (60-90°) の3種類に分類した。scale bar 10 μm

(Miyashita et al. 2017 Figure1 より引用)

2.3.2 矢状面における GCPs の分裂面角度のダイナミックな変化

EGL が形成される胎生 16.5 日目 (Embryonic day 16.5; E16.5) から EGL がほとんど消失する生後 15 日目 (Postnatal day 15; P15) にかけて、前項の分類方法を用いて、GCPs の分裂面角度を分類した (図 2.2A-G)。全ての発生時期において、3 個体から 150 細胞 (1 個体あたり 50 細胞) を計測した。EGL は、矢状面・冠状面に広がる構造を形成しているため、それぞれの断面ごとに解析を行った。E16.5 においては、HD と VD がそれぞれ 43%、41% であり、OD が 16% であった (図 2.3H)。P0 では HD の割合が 52% であり、VD が 31%、OD が 17% であった (図 2.3I)。同様に P3~P9 においても HD が 50% 前後であり、VD が 30% 前後、OD が 20% 程度であった (図 2.3J-L)。しかし、P12、P15 ではこの傾向が逆転し、VD が 50% 程度であるのに対し、HD が 30% 前後であった (図 2.3M, N)。OD は変化がなく 20% 程度であった。各ステージにおける分裂面角度の割合の推移を見ると、E16.5 では VD と HD が約 40% ずつで、両者に差はないが、生後 GCPs 発生の初期 (P0, P3, P6, P9) においては HD が VD よりも高い割合であった (図 2.30)。一方で、生後 GCPs 発生の後期 (P12, P15) になると、逆に、VD が HD よりも多いことがわかった。また、OD が常に 20% 程度であることから、GCPs の分裂面角度はランダムに制御されているのではなく、生後 GCPs 発生の初期においてはより HD を選択し、生後 GCPs 発生の後期においてはより VD を選択して分裂する傾向があると考えられる。

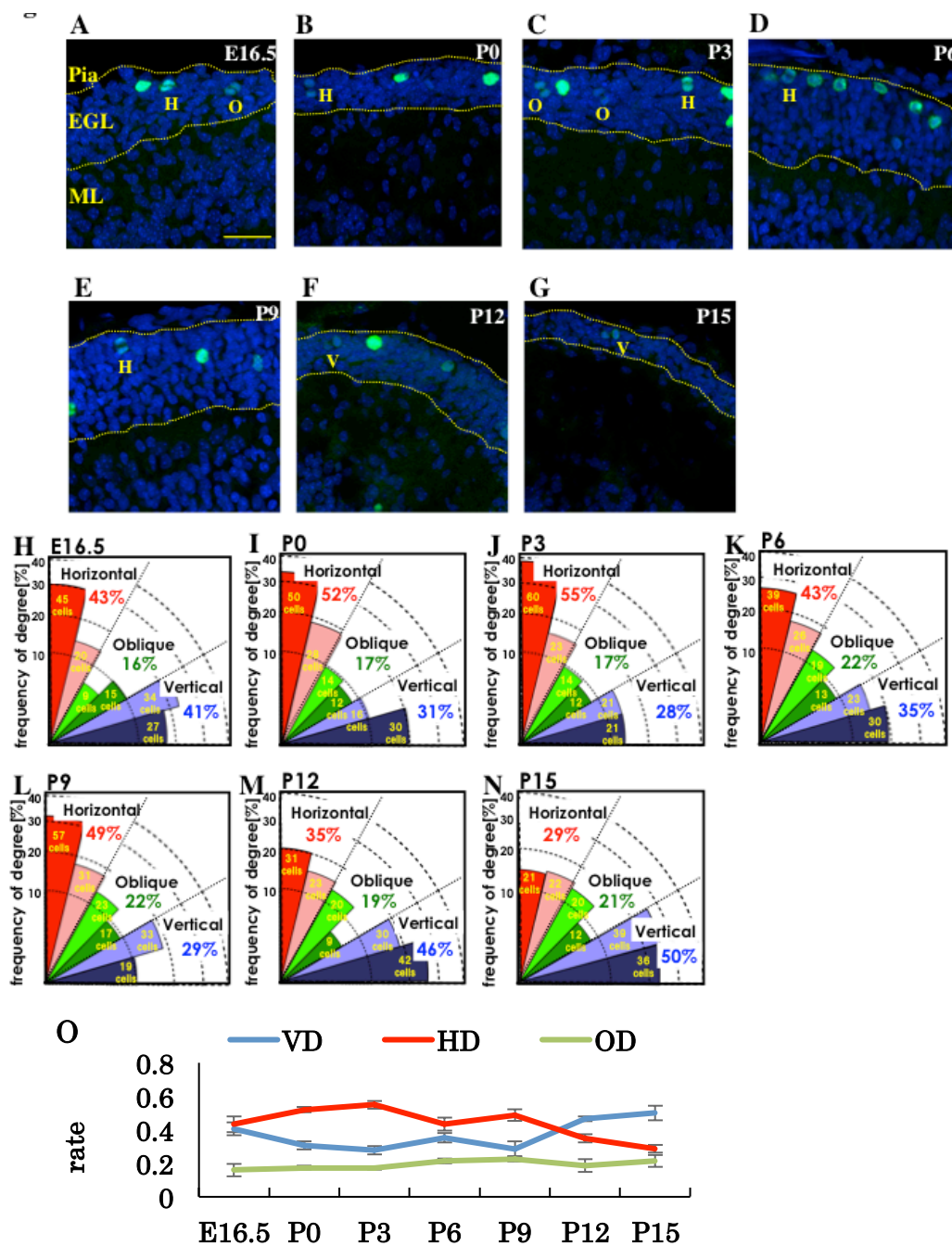


図 2.3 小脳矢状面における分裂面角度の解析

(A-G) 各ステージにおける PH3 の免疫染色。PH3(緑), DAPI(青) scale bar 30 μ m(H-N) 各ステージにおける分裂面角度のパイチャート。パイチャートは 15° 区切りで作成した。

(O) ステージ毎の分裂面角度のダイナミックな変化。Error bar S. E. M. (Miyashita et al. 2017 Figure2 より引用)

2.3.2 冠状面における GCPs の分裂面角度のダイナミックな変化

前項での矢状面における解析と同様の手法で、各ステージでの冠状面における GCPs の分裂面角度の割合を調べた(図 2.4A-F)。全ての発生時期において、3 個体から 150 細胞(1 個体あたり 50 細胞)を計測した。

冠状面における分裂面角度も、矢状面の場合と同様に、E16.5 においては VD と HD の割合が共に 40%程度で、それぞれの間には差はなく、生後 GCPs 発生の初期には HD が VD より多く、生後 GCPs 発生の後期には VD が HD よりも多くなった(図 2.4G)。

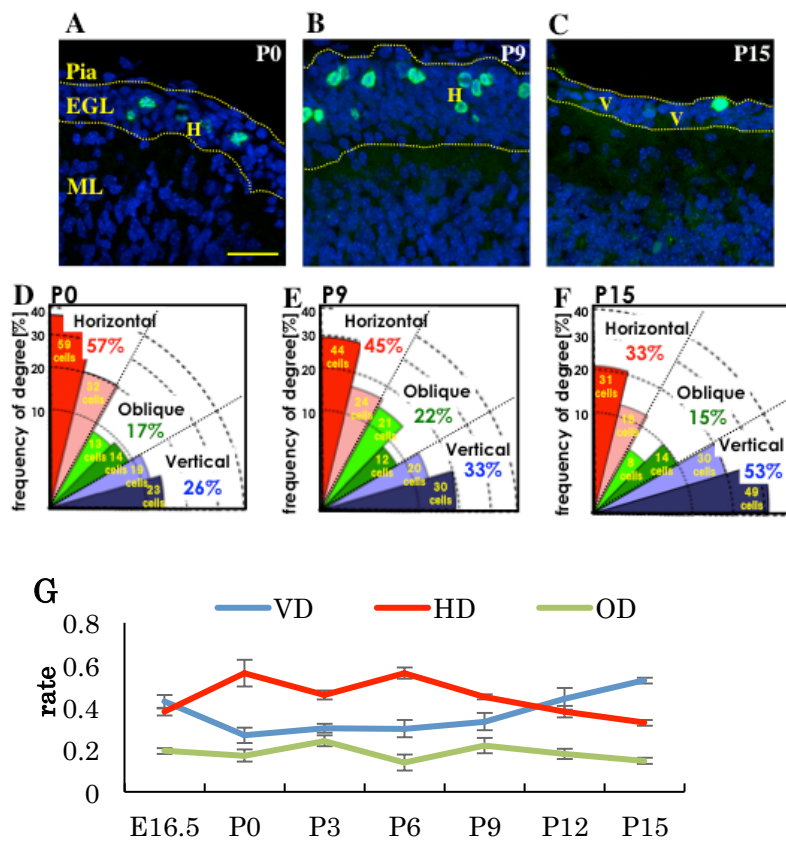


図 2.4 小脳冠状面における分裂面角度の解析

(A-C) 各ステージにおける PH3 の免疫染色。PH3(緑), DAPI(青) scale bar 30 μ m

(D-F) 各ステージにおける分裂面角度のパイチャート。パイチャートは 15° 区切りで作成した。

(G) ステージ毎の分裂面角度のダイナミックな変化。Error bar S. E. M. (Miyashita et al. 2017 Figure3 より引用)

2.4 考察

神経前駆細胞や神経幹細胞の分裂面角度と娘細胞の運命決定に相関があることがこれまで報告されてきたが、小脳においては未だ詳細な分裂面角度の解析はなされていなかった(Kosodo et al., 2004)。しかし、本研究によって、これまで明らかになっていなかった EGL における GCPs の分裂面角度が、ランダムではなく発生段階に応じて HD もしくは VD が選択されているということが示された。これまでの研究と照らし合わせると、GCPs の分裂面角度のダイナミックな変化は、GCPs の対称・非対称分裂と相関していることが推測される。この結果から、図 2.5 のようなモデルを提唱したい(図 2.5)。生後 GCPs 発生の初期(P0, 3, 6, 9)では、EGL における GCPs の母数を拡大させつつ、分化した細胞を産み出す必要があることから、胎生期から生後 GCPs 発生の初期においては、VD によって二つの GCPs を産み出し、GCPs の母数を増大させながら、HD によって一つの GCPs と一つの GCs を産み出すことで、少しずつ分化した細胞の数も増やしていく。生後 GCPs 発生の後期(P12, P15)では、生後 GCPs 発生の初期において増加した分裂細胞を速やかに分化細胞にしていくために、VD の割合を増やすことで一回の分裂によって二つの GCs を産み出しているのではないだろうか。実際に、神経前駆細胞や幹細胞において、共通して、分裂面角度と娘細胞の運命決定の相関があることや EGL の厚みが発生初期では拡大し、発生後期には縮小し最後には消失することを踏まえると、このモデルは十分に妥当なモデルであると判断できる。今後、このモデルを厳密に証明するためには、GCPs において、(1) 分裂面角度と娘細胞の運命を確かめること、(2) 発生の初期と発生の後期で、VD によって産み出される娘細胞の種類が変化することを確認する必要がある。

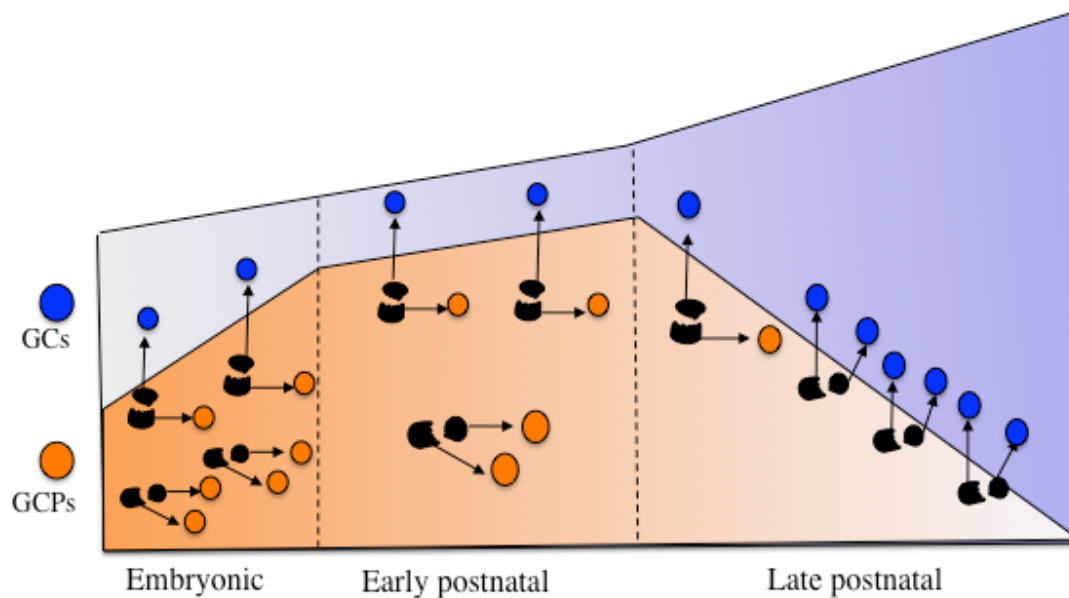


図 2.5 分裂面角度の方向と対称分裂のモデル図

GCPs は、EGL が存在する間、HD 分裂により一つの GCs と一つの GCPs を産み出す(非対称分裂)。一方、VD は発生初期においては二つの GCPs を産みだし、発生後期には二つの GCs を産み出す(対称分裂)。このことで、胎生後期から生後 1 週にかけて、GCs を産み出しながら EGL を拡大し GCPs の母数を増やすことができる。その後、EGL が消滅するまでに、対称分裂によって GCPs を速やかに GCs に分化させることで、発生を完了させる

第3章 SHH シグナルが分裂面角度の決定に与える影響の解析

3.1 序論

前項において、GCPs の分裂面角度が発生の初期から後期にかけてダイナミックに変化していることが示された。しかし、そのダイナミックな変化を制御する分子機構に関しては未だ不明である。大脳皮質において、SHH のレセプターである Smo を恒常的に活性化させた変異マウスでは分裂面角度が変化することが報告されている (Wang et al., 2016)。さらに、生後の小脳において SHH シグナルは、プルキンエ細胞から放出され GCPs の増殖を促進する。これらのことから、小脳 EGL においても、SHH シグナルが GCPs の分裂面角度を制御していると考えられる。そこで、小脳スライス培養系を用いて、SHH シグナルが GCPs の分裂面角度に与える影響を調べた。

3.2 実験手法

3.2.1 小脳スライス培養と SHH シグナル阻害剤投与

P9 のマウスから摘出した脳組織から、小脳組織を分離し、2%の低融点アガロースゲルに包埋した。vibratome (Leica) を用いて、包埋した小脳組織を、矢状面方向に 250 μ m 厚で切断した。切断された小脳スライスを、Millicell (EMD Millipore) 上に移し、37°C, 5% CO₂ の環境下で培養した。培養液は、DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) に 5% horse serum, 5% FBS, 10nM EGF (Sigma-Aldrich), 10nM FGF (Sigma-Aldrich), 1xN2 サプリメント (Thermo Fisher Scientific, 17502048), 1xB27 サプリメント (Thermo Fisher Scientific, 17504044) 100units/ML ペニシリンーストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) を上記濃度となるように加えた。

SHH シグナル阻害剤 SANT1 (Sigma-Aldrich) は、小脳スライスを作成後、6時間 37°C, 5% CO₂ の環境下で培養したのちに 1nM の濃度となるように培地に加えた (Chen et al., 2002)。

3.2.2 免疫染色と解析

スライス作成から 12 時間後 (SANT1 投与から 6 時間後)、小脳スライスを、4% PFA/PBS を用いて、4°C で一晩固定し、翌日、4% BSA/0.4% PBST 溶液に移し、4°C で一晩インキュベートした。翌日、前述の PH3 抗体をブロッキング液で希釈した一次抗体液に小脳スライスに移し、4°C で一晩反応させた。翌日、前述の二次抗体液に小脳スライスに移し、4°C で一晩反応させた。最後に、DAPI を 20000 倍に希釈した液に小脳スライスに移し、10 分間反応させたのち、スライドガラスに小脳スライスを貼り付け、PermaFlour (LVC) で封入した。作成した標本は、共焦点顕微鏡 (LSM780, Carl Zeiss) で観察し、ImageJ (RSB) で解析を行った。

統計解析は、3 個体から作成した小脳スライスからそれぞれ 50 細胞以上 (DMSO 群 ; 計 153 細胞、SHH inhibitor 群 ; 計 150 細胞) を解析し、2 群間における HD, VD, OD の平均値に対して、Student-T test を行った。有意水準は、* (P<0.05), ** (P<0.01), *** (P<0.001) とした。

3.3 結果

まず、小脳スライス培養系が生体での GCPs の振る舞いを再現しているかどうかを確かめるために、P9 の EGL における GCPs の分裂面角度と P9 マウスから調整した小脳スライスにおける GCPs の分裂面角度を比較した (図 3.1)。小脳スライスにおける GCPs の分裂面角度の割合は、P9 EGL における割合と有意な差は見られなかった。つまり、本論文で用いた小脳スライス培養系は、生体における GCPs の分裂面角度を正確に再現しているといえる。

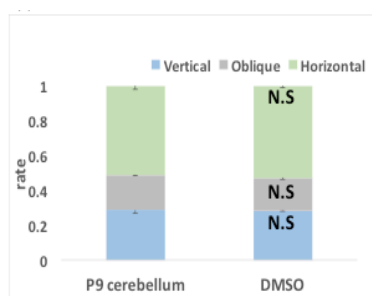


図 3.1 P9 小脳と P9 スライスカルチャーにおける分裂面角度の比較

P9 小脳と P9 スライスカルチャーにおける分裂面角度を比較した。VD (青) OD (赤) HD (緑)。Error bar S.E.M. N.S. $p \geq 0.05$ 。

(Miyashita et al. 2017 Figure4 より引用)

次に、小脳スライス培養に SHH シグナル阻害剤を加え、DAPI と PH3 によって免疫染色を行い、GCPs の分裂面角度に与える影響を調べた(図 3.2 A-V)。SHH シグナル阻害剤を加えた小脳スライス(SHH inhibitor 群)は、DMSO を加えた小脳スライス(DMSO 群)と比較して、VD の割合が有意に増加し、HD の割合が有意に減少していた(図 3.2 W)。さらに、興味深いことに、SHH inhibitor 群では、OD の割合も有意に増加することがわかった。

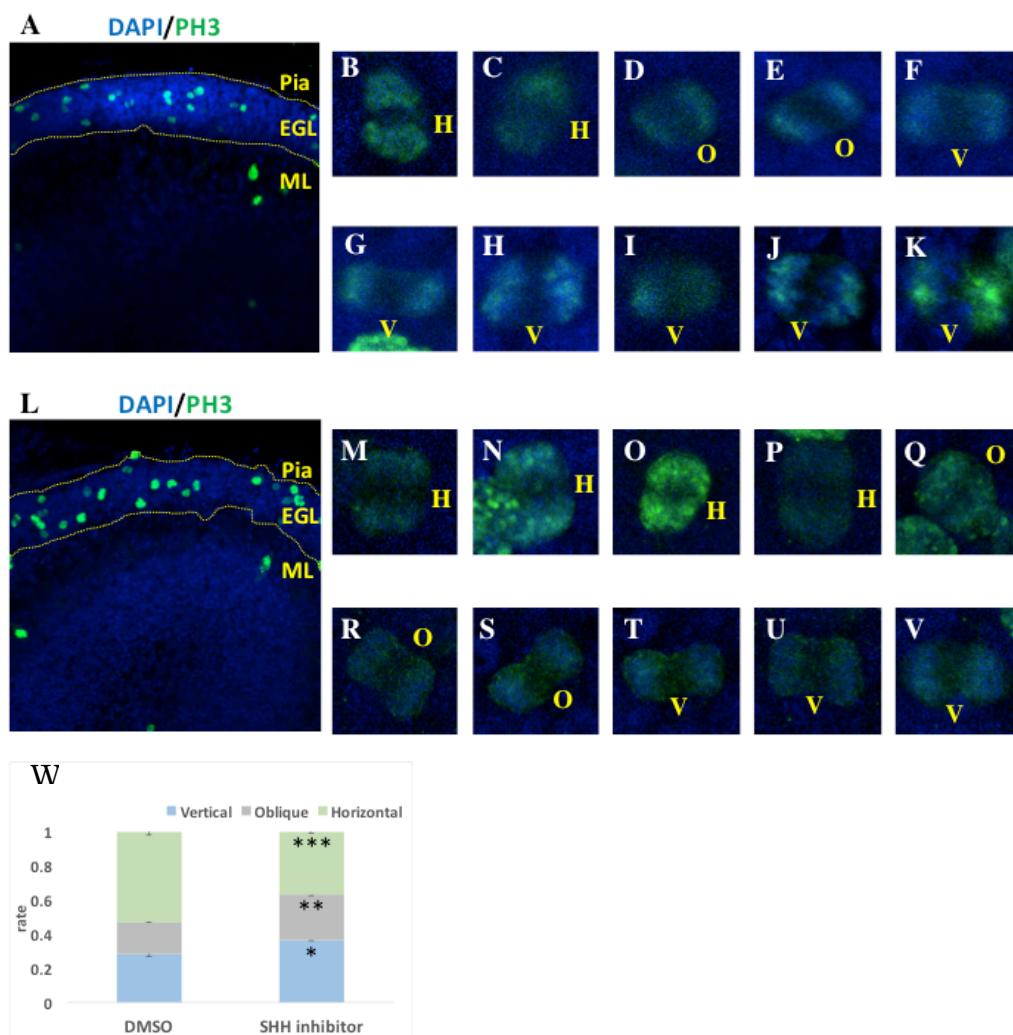


図 3.2 DMSO 群と SHH inhibitor 群における分裂細胞

(A-V)DMSO 群(A-K)と SANT-1 を加えた阻害群(L-V)において PH3(緑)と DAPI(青)で免疫染色を行った。それぞれの群において HD, OD, VD が観察された。図における H, O, V はそれぞれ HD, OD, VD を示している。

(W) DMSO 群と SHH inhibitor 群における分裂面角度を比較した。VD(青)OD(赤)HD(緑)。Error bar S.E.M。統計解析は T-test を用いて、それぞれの分裂面の割合を比較した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

(Miyashita et al. 2017 Figure4 より引用)

3.4 考察

本項では、SHH シグナル阻害剤を小脳スライス培養系に加えることで、SHH シグナルが GCPs の分裂面角度の制御に必要であることを明らかにした。これまでの大脳皮質における研究で、SHH シグナルの活性化によって HD が増加することが報告されていた(Wang et al., 2016)。本論文では、阻害剤によって逆に、HD が有意に減少することが観察されたことから、SHH シグナルの活性化は、神経前駆細胞や神経幹細胞が Horizontal 方向に分裂することに必要であることが示唆される。さらに、今回用いた SHH シグナル阻害剤 SANT-1 は SHH シグナルのレセプターである Smo に結合し、SHH シグナルを活性化する薬剤であることと、薬剤の投与から 6 時間後の段階で、分裂面角度の変化が見られていることから、Horizontal 方向への分裂の制御は、Gli1/2 の転写を介した典型的な SHH シグナル経路ではなく、Smo から Gli1/2 の転写を介さずに行われている可能性を示唆している。これは、これまで明らかになっていない SHH シグナルの新規経路であり、今後さらなる解析が必要となる

第4章 転写因子Atoh1とNeuroDを発現するGCPsサブタイプの同定

4.1 序論

マウス大脳皮質では、Radial Glia(RG)が VZ で増殖を行った後、VZ を離脱し脳室下帯(Sub Ventricular Zone; SVZ)で再び増殖することで、産み出される神経細胞の数をコントロールしていることが報告されている(Sun and Hevner 2014; Homem et al., 2015)。より複雑なしわ構造を持つフェレットや霊長類においては、マウスの SVZ に相当する Inner SVZ (ISVZ)を抜けた細胞がさらに Outer SVZ(OSVZ)で増殖すると考えられている(Fietz et al., 2010)。このように、2段階・3段階と神経幹細胞・前駆細胞が増殖し神経細胞を産み出すことは、VZ から直接神経細胞を産み出すよりも効率的なシステムであると考えられる。このシステムにより、RG は神経幹細胞・前駆細胞の数を維持しつつ、より多くの神経細胞を産み出すことができる。小脳は、フェレットや霊長類の大脳皮質のように複雑なしわ構造を持つ組織であり、その構造は生後に EGL より産み出される多量の GCs によって形成される。一方、EGL における GCPs は、数段階で分裂する RG と異なり Atoh1 を発現する均一な細胞集団であると考えられてきた(Roussel and Hatten 2011)。筆者は多量の GCs を産み出す GCPs にも RG と同様に数段階の分裂機構があるのではないかと仮説を立て、解析を行った。

4.2 実験手法

4.2.1 免疫染色

免疫染色は、2章と同様のプロトコルで行った。

以下に使用した抗体のリストを示す。

	メーカー (製品番号)	動物種	濃度	機能
Atoh1	Home made (Yamada et al. 2014)	rabbit	1/200	未分化な GCPs で発現する 転写因子
Ki67	eBioscience (14-5698-82)	rat	1/500	増殖細胞マーカー

NeuroD	Santa Cruz (sc1084)	goat	1/500	GCPs の分化に関わる転写因子
CyclinD1	MBL -553	rabbit	1/500	細胞周期関連タンパク
CyclinD2	Santa Cruz (sc5933)	rabbit	1/1000	細胞周期関連タンパク
Prox1	R&D (AF2727)	goat	1/500	神経前駆細胞の運命決定に関わる転写因子
p27	MBL (K0082-3)	rabbit	1/200	細胞周期の停止を制御するタンパク
Gli1	Santa Cruz (sc2087)	goat	1/200	SHH シグナルの下流で発現し、GCPs の増殖を促進する転写因子
Zic1	abcam (ab72694)	rabbit	1/1000	GCPs から GCs への分化を促進する転写因子

4.2.2 EdU を用いた解析

5-Ethynyl-2-deoxyuridine (EdU, Thermo Fisher Scientific) は生後マウスの腹腔内に 50mg/kg で投与し、10 分後にサンプリングを行った (S 期細胞の標識。結果 4.3.2)。

検出には EdU click it alexa647 kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。2 次抗体反応後のスライドを 3%BSA (sigma)/0.2%PBST で 2 度洗浄する。次に、EdU detection mixture 溶液で 30 分間、室温で反応させる。その後、PermaFlour で封入した。

4.2.3 EdU を用いた cumulating label

Cumulating label 法は細胞周期の長さを同定するための手法である (Takahashi et al., 1993; Takahashi et al., 1995)。EdU を一定間隔で投与していくと、ある時点 (図中 X hrs) で全ての前駆細胞において EdU が検出される (図 4.1A)。Cumulating label 法では、EdU 1 回投与群を 0 時間とし、EdU の初回投与からの時間 (横軸) に対し、それぞれの時間における EdU 陽性細胞の割合 (縦軸) をプロットし、線形近似直線を求める。そこから、0 時間

のときの EdU 陽性細胞の割合 (近似直線における b の値) と EdU 陽性細胞の割合が 1 になる時間 (Xhrs) を求める。EdU は S 期において特異的に取り込まれるため、近似直線における b の値は、細胞周期の総時間 (T_c ; Total cell cycle length) における S 期の総時間 (T_s ; Total Sphase length) の割合を表していると考えられる。一方、EdU 陽性細胞の割合が 1 になる時間は、初回投与時にちょうど S 期を抜け、EdU を取り込まなかった細胞 (図中 青円) が、EdU を取り込むまでにかかった時間と考えられるので、 T_c から T_s を引いた総時間 ($T_c - T_s$) で表すことができる。これらの式から、 T_c と T_s をそれぞれ求めることができる。

本論文においては、生後 6 日目マウスの腹腔内に EdU を投与 (50mg/kg) し、投与から 1 時間後にサンプリングを行った。EdU を 3 時間間隔で、最大 4 回投与 (0, 3, 6, 9 時間投与群) したマウスをそれぞれサンプリングした (図 4. 1B)。サンプリングした小脳に対して NeuroD と Ki67 で免疫染色を行い、EdU click it kit で EdU を検出し、EdU 陽性細胞の割合を調べた。

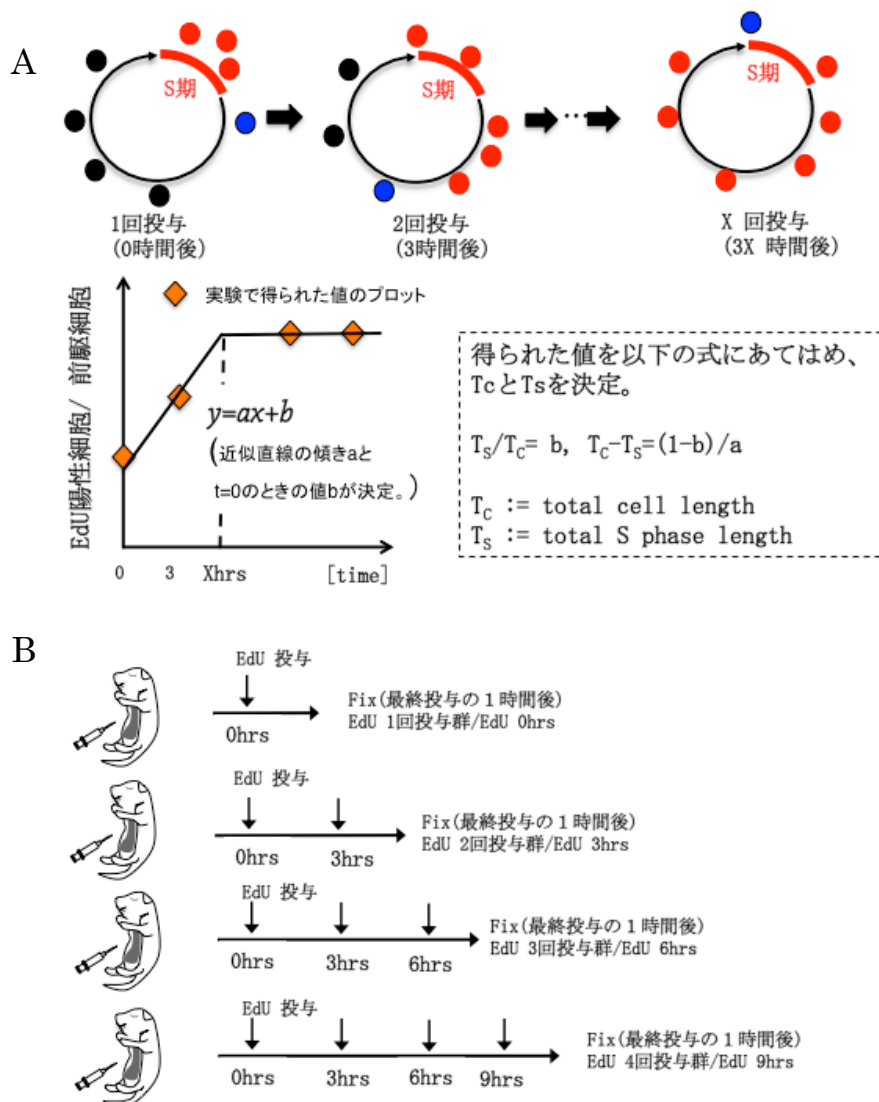


図 4.1 Cumulating label 法の実験概要

(A) 細胞周期の各フェイズに存在する前駆細胞の中で S 期に存在するものだけが EdU を取り込む(赤円 ; EdU を取り込んだ細胞、黒円 EdU を取り込んでいない細胞、青円 ; 初回投与時に S 期を離脱したばかりで、EdU を取り込まなかった細胞。X 回投与時に最後に EdU を取り込むと考えられる)。EdU を一定間隔で連続投与することで、ある時点で全ての前駆細胞において EdU が取り込まれ EdU が検出される。投与時間を横軸に、取り込んだ細胞が全前駆細胞に占める割合を縦軸にプロットし、近似直線から、 T_c , T_s を推定する。

(B) 本論文では、EdU を 3 時間間隔で最大 4 回投与し(1, 2, 3, 4 回投与群)、そこから、GCPs における細胞周期の長さを求めた。

4.2.4 ベクターコンストラクション

NeuroD の発現ベクターは、生後 1 日目のマウス小脳から調整した cDNA をテンプレートに NeuroD のオープンリーディングフレーム (Open Reading Frame; ORF) を PCR で増幅し、pCAGGS ベクターに挿入した。Atoh1 の shRNA ベクターは相補的な oligoDNA (Thermo Fisher scientific) をアニーリングした後、U6 ベクターに挿入した。Atoh1 のターゲット配列、相補的な oligoDNA は以下の通りである。

Atoh1 target	TAGTGGACGAGCTTGGCTGCA
oligoDNA-Forward	TTTGTAGTGGACGAGCTTGGCTGCATTCAA GAGATGCAGCCAAGCTCGTCCACTATTTTT
oligoDNA-Reverse	CTAGAAAAATAGTGGACGAGCTTGGCTGCA TCTCTTGAATGCAGCCAAGCTCGTCCACTA

作成したベクターを大腸菌で増幅し、精製したのち、シーケンスを確認した。エレクトロポレーションには、シーケンスを確認したベクターを大腸菌で再び増幅し、Endofree MaxiPrep kit (QIAGEN) を用いて精製した。

4.2.5 エレクトロポレーション

生後 5 日目のマウスを氷上に 5 分間静置し氷上麻酔をかける。氷上麻酔をかけたマウスの背頸部を切開し、プラー (Narishige, PC10) で引いたガラスキャピラリー (Narishige, G1) を、小脳上部の頭蓋に挿し、DNA 液を 3~5 μ l 吹き入れた。円形白金電極 (NEPA GENE, CUY650P5) のプラス極をマウスの顎先、マイナス極を背頸部にあて、エレクトロポレーター (BEX, CUY21) で 80mV, 100ms の矩形波電圧を 7 回かけた。エレクトロポレーション後のマウスは 37°C でのホットプレート上で回復させ、母マウスの元に戻した (Umeshima et al., 2007)。エレクトロポレーションから数日後にサンプリングを行い、免疫染色法で解析した (図 4.2)。

NeuroD 強制発現実験の DNA 溶液は、核に存在するヒストン H2B と GFP の融合タンパクを発現させる pCAGGS-H2BGFP ベクターと 0.25 μ g/ μ l と NeuroD の発現ベクター 1.0 μ g/ μ l の混合液 (コントロール群には同濃度の pCAGGS empty ベクター) を、Atoh1 のノックダウン実験は pCAGGS-H2BGFP

0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ と Atoh1 shRNA ベクター 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の混合液(コントロール群には同濃度の pU6 empty ベクター)を用いた。

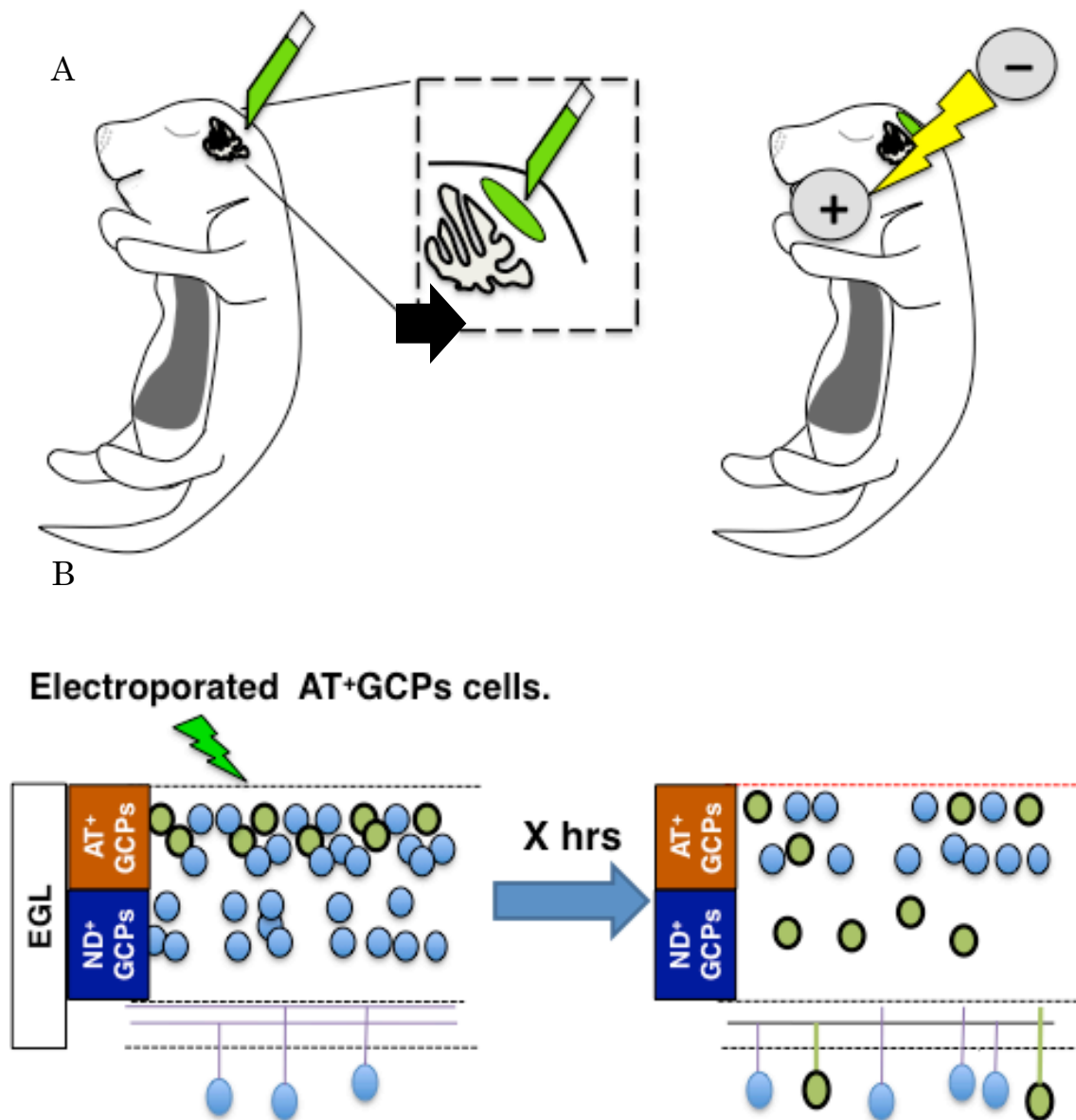


図 4.2 GCPs へのエレクトロポレーションの模式図

(A) EGL へのエレクトロポレーションは頭蓋骨と小脳の間隙にキャピラリーを挿し、DNA 溶液(図中 緑)を吹き入れた。その後、図のような向きに電流を流すことで、遺伝子を導入した。

(B) 導入された遺伝子は AT⁺GCPs において発現した。(図中 緑色の細胞) 遺伝子導入された細胞がどのような挙動を示すかで、遺伝子の機能を推定した。

4.3 実験結果

4.3.1 GCPs における詳細な転写因子の発現解析

EGL 内に存在する GCPs が *Atoh1* を発現する均一な細胞集団かどうかを調べるために、GCPs を染色する増殖細胞のマーカーである Ki67 と *Atoh1* の共染色を行った(図 4.3)。Ki67 陽性の GCPs は EGL の上層側に位置しており、その中の表層に存在する GCPs のみが *Atoh1* を発現していた。つまり、EGL に存在する GCPs の中には *Atoh1* 陽性の GCPs と *Atoh1* 陰性の GCPs が存在していて、均一な集団ではない可能性が示された。それでは、*Atoh1* 陰性の細胞においてどのような遺伝子が発現しているのか。SVZ において発現する転写因子であり、小脳でも発現が確認されている *NeuroD* の EGL における発現を調べた(図 4.4) (Miyata et al., 1999; Chen et al., 2015)。*NeuroD* は *Atoh1* の転写の下流に存在する一方で、*NeuroD* の小脳特異的 KO マウスでは *Atoh1* の発現が上昇することが報告されている (Pan et al., 2009; Klisch et al., 2011)。Ki67 と *Atoh1* の共染色を行うと、*NeuroD* は Ki67 陽性の GCPs の中でも特に実質側の細胞で強い発現が確認された。*NeuroD* は、bHLH 型の転写因子であり、これまでに GCs の移動を制御することが報告されていた。*NeuroD* は *Atoh1* の転写の下流に存在する一方で、*NeuroD* の cKO マウスでは *Atoh1* の発現が上昇することが報告されている (Pan et al., 2009; Klisch et al., 2011)。さらに、EGL に存在する GCPs において、*Atoh1* 陽性細胞は EGL の表層側に存在し、それと相補的に *NeuroD* 陽性の GCPs が存在していることが示された。

これまで均一と考えられていた GCPs だが、免疫染色法によって遺伝子発現を詳細に調べることで、*Atoh1* 陽性の GCPs と *NeuroD* 陽性の GCPs に区別できることがあきらかになった。本論文では *Atoh1* 陽性の GCPs を AT⁺GCPs, *NeuroD* 陽性の GCPs を ND⁺GCPs とし、それぞれの細胞の特徴を調べるために、さらなる解析を行った。

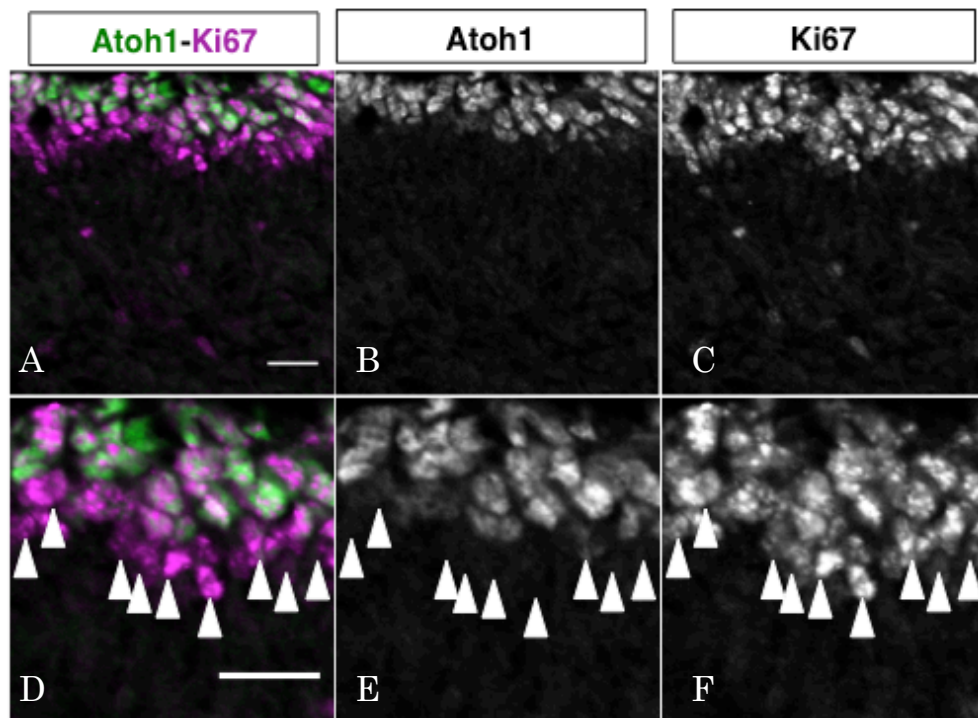


図 4.3 EGL における Atoh1 の詳細な発現様式

(A-F) 生後 6 日目の小脳 EGL に対して、Atoh1 と Ki67 を用いて免疫染色を行った。Atoh1 (緑), Ki67 (マゼンタ)。低倍率 (A-C), 高倍率 (D-F)。scale bar 20 μ m。図中の矢頭は Atoh1 陰性で、Ki67 陽性の細胞を示している。

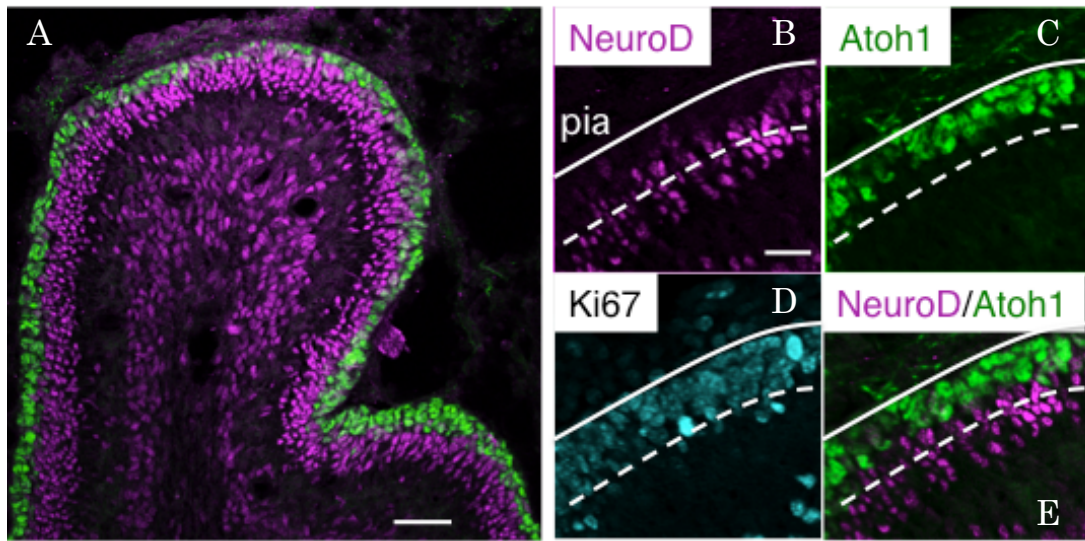


図 4.4 EGL における Atoh1 と NeuroD の相補的な発現様式

(A-E) 小脳 EGL に対して Atoh1, Ki67, NeuroD で免疫染色を行った。Atoh1 と NeuroD が EGL 全体に渡って相補的に発現していることがわかる。(A) さらに、Atoh1-Ki67-NeuroD の三重染色によって、Atoh1 陰性 Ki67 陽性な細胞において NeuroD が発現している様子が観察された。(B-E) scal bar 50 μ m(A), 20 μ m(B-E)。

4.3.2 ND⁺GCPs が分裂細胞であることの証明

Ki67 は細胞周期のすべてのフェイズで発現する分子であるため、ND⁺GCPs が Ki67 陽性であっても、DNA 複製や細胞分裂をしているとは限らない。ND⁺GCPs が EGL における GCPs のサブタイプであることを示すためには、ND⁺GCPs が DNA 複製を行い、細胞分裂を行うことを明らかにする必要がある。そこで、ND⁺GCPs において、合成期(S 期)の細胞で特異的に DNA に取り込まれる 5-Ethynyl-2-deoxyuridine (EdU) と分裂細胞のマーカーである PH3 を用いて実験を行った。まず、P6 のマウスに EdU を投与し、10 分後にサンプリングを行った。投与から 10 分後にサンプリングを行うことで、DNA 合成を行っている S 期の細胞をラベルすることができる。ND⁺GCPs において、EdU 陽性の細胞が観察されたため、ND⁺GCPs が DNA 複製を行う細胞集団であることが示された(図 4.5A-D)。次に、抗 Atoh1、抗 NeuroD、抗 PH3 抗体を用いて、P6 のマウス EGL に対して免疫染色を行った(図 4.5E-H)。ND⁺GCPs において、PH3 陽性の細胞が観察されたため、ND⁺GCPs は細胞分裂を行う細胞であることが明らかになった。以上のことから、ND⁺GCPs が EGL における GCPs のサブタイプの一つであることが示された。

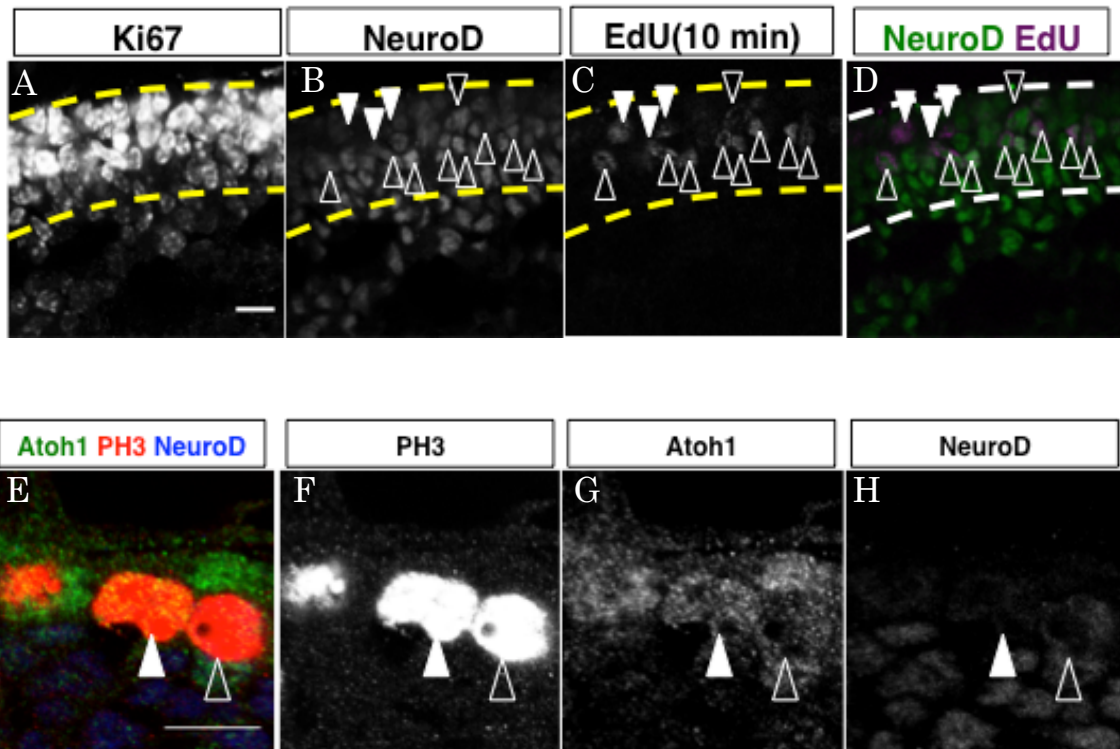


図 4.5 NeuroD 陽性細胞での S 期と M 期の細胞

(A-D) EdU を投与し、10 分後にサンプリングを行った P8 マウス小脳に対して、Ki67 と NeuroD で免疫染色を行い、EdU click it kit で EdU を検出した。NeuroD(緑)と EdU(マゼンタ)の共局在を見ると、NeuroD 陰性の細胞(白塗矢頭)だけでなく、NeuroD 陽性(白抜矢頭)な細胞においても EdU が検出された。(D) scale bar $20 \mu\text{m}$ 。

(E-H) P8 マウス小脳に対して、Atoh1(緑)と PH3(赤)と NeuroD(青)抗体を用いた三重染色を行った。Atoh1 の発現が強く NeuroD の発現が弱い細胞(白塗矢頭)と Atoh1 の発現が弱く NeuroD の発現が強い細胞(白抜矢頭)のどちらにおいても PH3 陽性の M 期の細胞が観察された。scale bar $10 \mu\text{m}$ 。

4.3.4 AT⁺GCPs と ND⁺GCPs における遺伝子発現プロファイルの解析

次に、これまでに EGL において発現が報告されている分子や GCPs の分化に関わるといわれている様々な分子の発現をそれぞれの前駆細胞において調べた(図 4.6)。まず、細胞周期に関連する分子の発現をみると、細胞周期の間期(G1 期)から S 期への遷移を制御する Cyclin ファミリーの CyclinD1 や D2 は AT⁺GCPs に強く発現していた(図 4.6C, D) (Neganova and Lako, 2008)。一方、CDK に阻害的に働き細胞周期の停止を制御する p27 は GCs において強く発現していた(図 4.6E) (Toyoshima and Hunter, 1994)。次に、様々な転写因子の発現をみると、SHH シグナルの下流分子で GCPs の増殖維持に関与する Gli1 は、AT⁺GCPs のみで強く発現していた(図 4.6F)。ショウジョウバエの prospero のホモログであり、前駆細胞の運命決定や増殖の停止を制御する Prospero related homolog1 (Prox1) は AT⁺GCPs においては発現が弱くまばらに染色像が観察されたが、ND⁺GCPs と増殖を停止した細胞においては強く均一な発現が見られた(図 4.6G) (Oliver et al., 1993; Wigle et al., 1999; Dyer et al., 2003; Foskolou et al., 2013)。Zinc finger 型の転写因子で小脳の発生に関わる Zic1 は細胞周期を停止した細胞のみで発現が確認された(図 4.6H) (Aruga et al., 1998)。以上の結果をまとめると図 4.6I のようになる(図 4.6I)。AT⁺GCPs と ND⁺GCPs はどちらも前駆細胞であるが、AT⁺GCPs では細胞の増殖を促進する分子の発現が多く見られ、ND⁺GCPs では、反対に、細胞増殖の停止と分化を促進する分子の発現が多く見られた。興味深いことに、SHH シグナルが活性化している細胞で、発現が上昇する転写因子 Gli1 や Gli1 の下流に存在する CyclinD1 が AT⁺GCPs のみで強い発現が見られたことから、AT⁺GCPs のみが SHH シグナルを受容している可能性が示唆される。

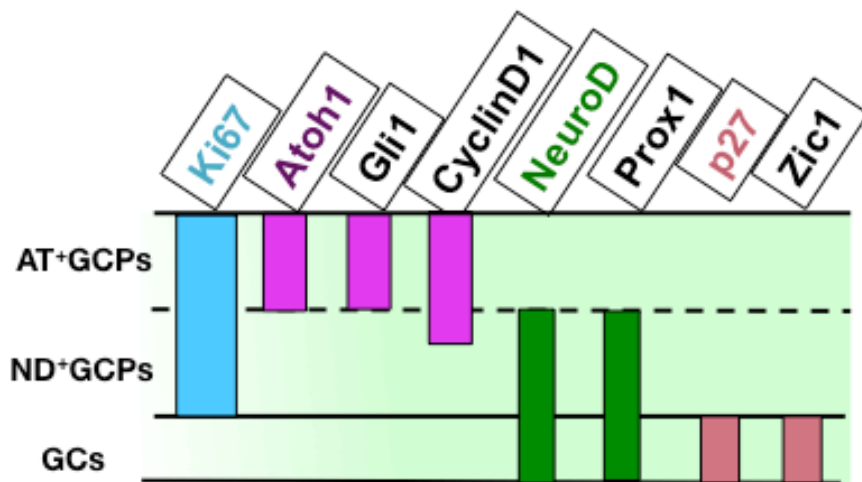
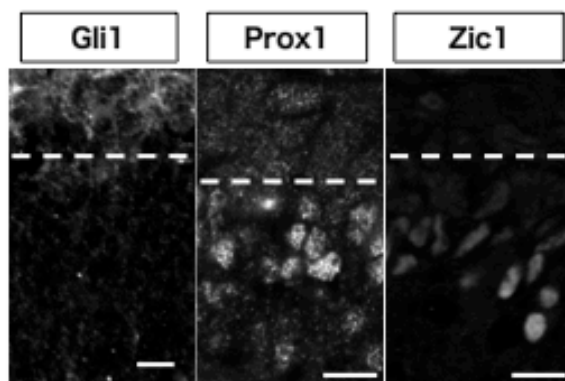
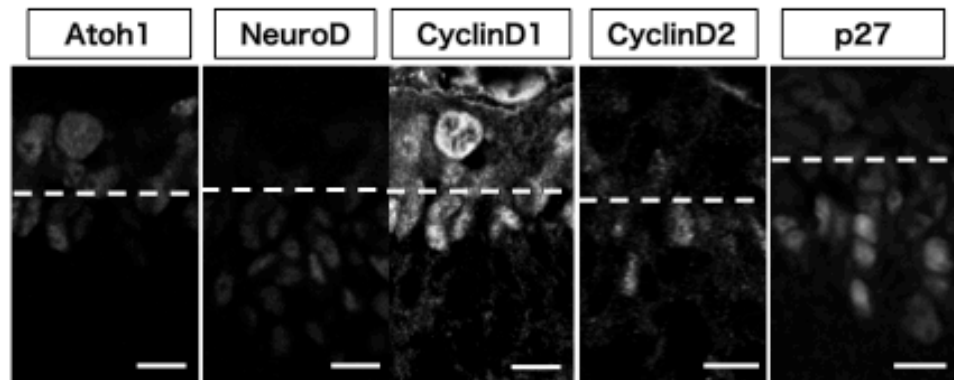


図 4.6 AT⁺GCPs と ND⁺GCPs における様々な分子の発現様式

(A-I) 生後 3 日目のマウスに対して、Atoh1 (A), NeuroD (B) の発現と細胞周期関連遺伝子 CyclinD1 (C), CyclinD2 (D), p27 (E) や小脳発生に関わる Gli1 (F), Prox1 (G) Zic1 (H) の発現様式を免疫染色で比較した。その結果をまとめた図 (I)。scale bar 20 μ m。

4.3.5 AT⁺GCPs と ND⁺GCPs における細胞周期の長さ

これまでに造血幹細胞や神経幹細胞での研究から、細胞周期の長さが細胞分化状態と密接に関連しているということが報告されている。(Lange and Calegari, 2010)細胞が活発に増殖を繰り返す間は、G1 期が短く、より分化に近い状態のときは G1 期がより長くなる。(Lange et al., 2009)一方、S 期は活発に増殖を行うときはより長く、分化に近い時にはより短くなることが知られている。(Arai et al., 2011)つまり、細胞周期の S 期や G1 期の長さを定量することは、増殖細胞の分化状態を知るための一つの指標となる。そこで、cumulative label 法を用いて、それぞれの前駆細胞における細胞周期の長さの定量を行った(図 4.7)。本実験では、Ki67 陽性 NeuroD 陰性のものを AT⁺GCPs とし、Ki67 陽性 NeuroD 陽性のものを ND⁺GCPs とし、それぞれの GCPs で EdU 陽性細胞の割合を計測した。細胞周期の長さ(Tc)は、AT⁺GCPs が 17.01±0.26 時間で ND⁺GCPs が 22.69±0.46 であった。S 期(Ts)の長さは AT⁺GCPs が 9.31±0.40 で ND⁺GCPs が 9.07±0.40 であった。G1 期や S 期の長さの変動する一方で、G2 期や M 期の長さはほとんど変化しないことが報告されているため、細胞周期の長さから S 期の長さを引いた時間(Tc-Ts)の変化は、G1 期の長さを反映した値と言える。Tc-Ts は AT⁺GCPs が 5.69±0.34 で ND⁺GCPs は 12.61±0.87 であり、ND⁺GCPsの方が 2 倍以上長いことがわかった(図 4.7B)。

以上の遺伝子発現や細胞周期の長さという各指標から、AT⁺GCPs は二つの前駆細胞のうち、より活発に増殖を行い、より未分化な細胞で ND⁺GCPs はより増殖の停止と分化に近い細胞であると考えられる。さらに、GCPs は分化に伴って表層側から実質側へ移動していくこと EGL 形成初期には ND⁺GCPs がほとんど見られず、逆に、生後発生の後期においては AT⁺GCPs がほとんど見られなくなることを鑑みて、次のようなモデルを提唱したい。RL から移動し、EGL を形成した GCPs は、Atoh1 を発現し続けたまま AT⁺GCPs として活発に増殖を行い前駆細胞の細胞数を指数関数的に増大させる。次に、Atoh1 の発現を失い、NeuroD を発現すると、ND⁺GCPs として、増殖を維持しつつ分化した GCs を産み出していく。こうした 2 段階のプロセスによって限られた GCPs から、小脳組織の全神経細胞のうちの 9 割をしめるほどの GCs を産生し、小脳特有のしわ構造の形成を効率的に行っていると推測される。

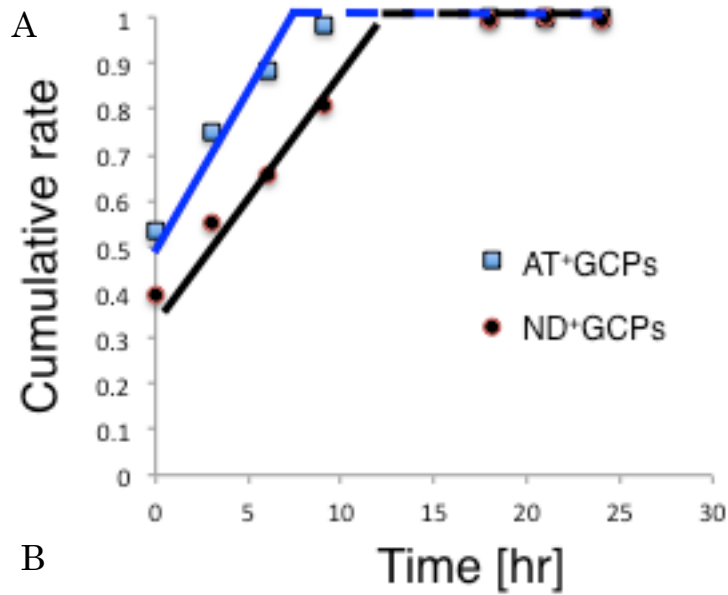


図 4.7 AT+GCPs と ND+GCPs における細胞周期の長さ

(A, B) 生後 3 日目のマウスに対して、EdU を用いた Cumulating label を行った。AT+GCPs は約 9 時間で cumulative rate が 1 になり、ND+GCPs は約 13 時間で cumulative rate が 1 になった(A)。 cumulating label で得られた結果から、AT+GCPs と ND+GCPs において、 T_c , T_s , $T_c - T_s$ を求めた(B)。

4.3.5 転写因子 Atoh1 と NeuroD の相互抑制メカニズムの解析

前項において、Atoh1 と NeuroD が EGL において、相補的に発現していることが示された。このことから、筆者は、Atoh1 と NeuroD は共に bHLH 型の転写因子であるため、相互に転写抑制し合うことでこの相補的な発現様式が成り立っていると考えた。そこで、GCPs に対してエレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入実験を行うことで、この仮説を検証した。エレクトロポレーション法は、分子機能を解析するためによく用いられる手法で、図のように、生後マウスの小脳と頭蓋の間に発現ベクターを含む溶液を注入し、電流を流すことで行われる(図 4.2) (Umeshima et al., 2007)。このようにエレクトロポレーションを行うと、AT⁺GCPs にのみ遺伝子が導入されるため、Atoh1 の shRNA を用いて Atoh1 のノックダウンを行えば、Atoh1 の機能欠損実験を行うことができ、NeuroD の発現ベクターを導入すれば NeuroD が異所的に発現した際の AT⁺GCPs への影響を解析することができる。まず、Atoh1 の shRNA ベクターを生後 5 日目のマウスにエレクトロポレーション法で導入し、2 日後に NeuroD 抗体を用いて免疫染色を行った(図 4.8)。遺伝子導入された細胞を標識するために、核に局在する H2B-GFP を同時に導入している(Kanda et al., 1998)。shRNA を導入していないコントロール群では、前項までで見られていた Atoh1 と NeuroD の相補的な発現が見られたが、Atoh1 の shRNA を導入した細胞においては、本来 NeuroD の発現が弱いはずの AT⁺GCPs において、NeuroD の発現が上昇している様子が見られた。一方、NeuroD 発現ベクターを生後 5 日目に導入し、翌日にサンプリングし、AT⁺GCPs における NeuroD の強制発現実験を行った(図 4.9)。AT⁺GCPs が多く存在する EGL の表層側で、Atoh1 のタンパク発現を調べると、GFP で標識された細胞においてのみ、Atoh1 の発現が異所的に失われている様子が観察された。これらの結果から、AT⁺GCPs において、Atoh1 が発現することで NeuroD の発現を抑制し、NeuroD の発現が上昇することで逆に Atoh1 の発現を抑制していることが示唆される。つまり、Atoh1 と NeuroD が互いの遺伝子発現を抑制し合うことによって、AT⁺GCPs から ND⁺GCPs への連続性が制御されていると推測することができる。Atoh1 の発現ベクターを用いた Atoh1 の過剰発現実験と NeuroD の shRNA ベクターを用いた NeuroD のノックダウン実験も同様に行い、上述の相互抑制関係を支持する結果を得ている(data not shown)。

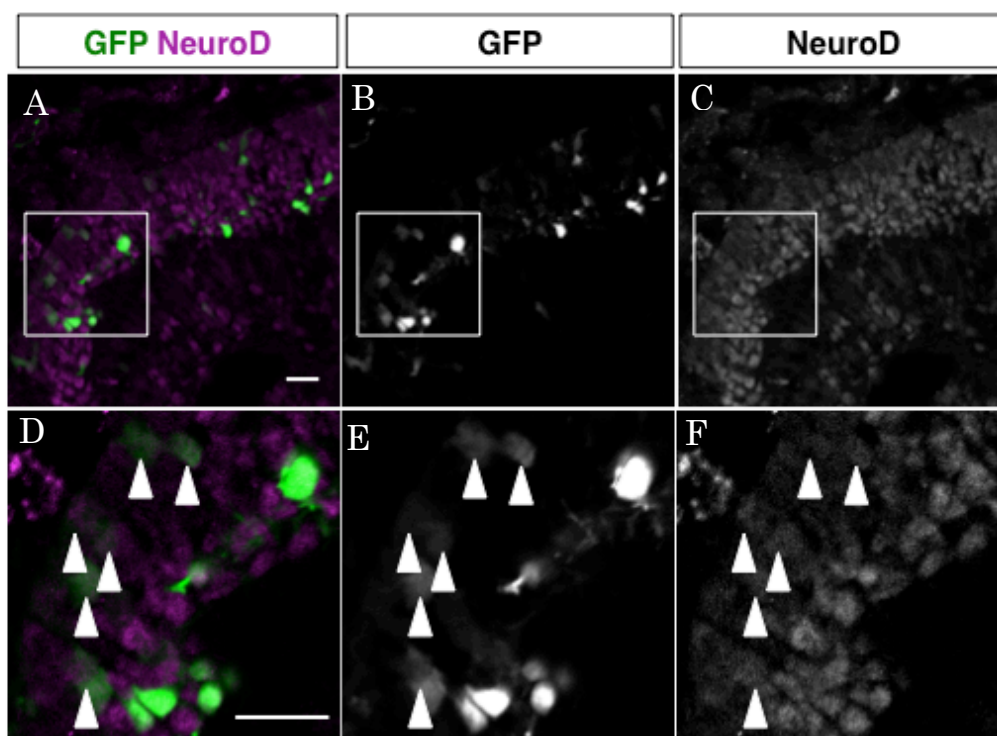


図 4.8 shRNA を用いた Atoh1 のノックダウン実験

(A-F) P5 のマウスに対して、Atoh1 の shRNA ベクターを導入し、2 日後の P7 において GFP(緑)と NeuroD(マゼンタ)の免疫染色を行った。矢頭で示されるように、本来発現が弱い領域において NeuroD の発現上昇が見られた。Scale bar 20 μ m。

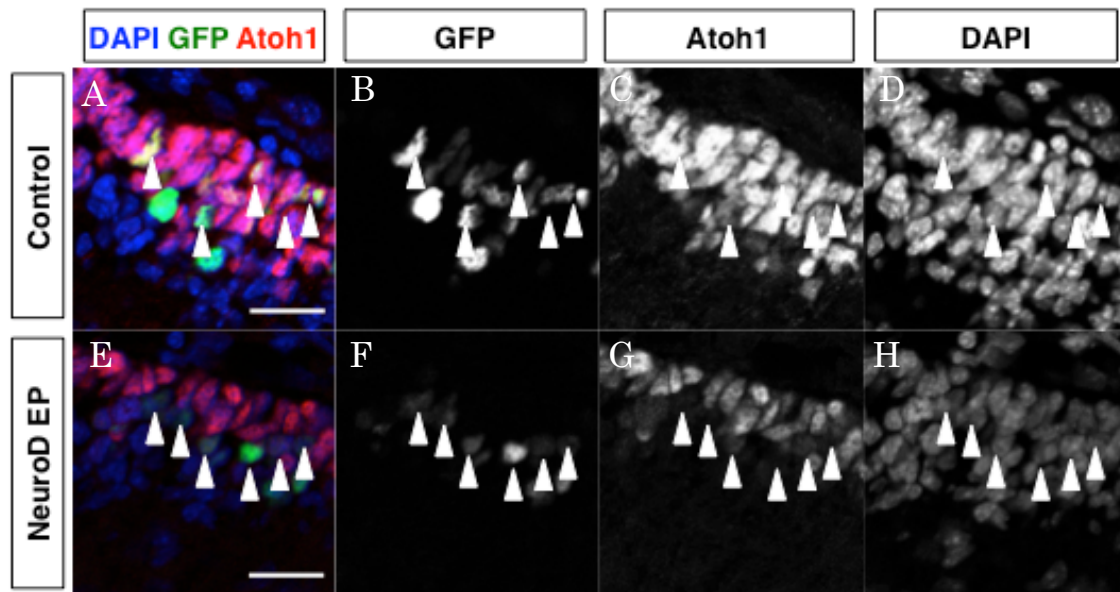


図 4.9 NeuroD の発現ベクターを用いた NeuroD の強制発現実験
 (A-H) P5 のマウスに対して、NeuroD の発現ベクターを導入し、1日後の P6 において DAPI(青)GFP(緑)と NeuroD(マゼンタ)の免疫染色を行った。NeuroD を導入していない Control では矢頭で示されるように、EGL の表層側で Atoh1 の発現が見られる。(A-D)一方、NeuroD の発現ベクターを導入すると、Atoh1 の発現が異所的に失われている様子が観察された。(E-H) Scale bar 20 μ m。

4.4 考察

これまで、生後小脳 EGL に存在する GCPs は転写因子 Atoh1 を発現する均一な細胞集団であると考えられていた (Roussel and Hatten, 2011)。しかし、Atoh1 と Ki67 の二重染色と詳細な共局在解析によって、GCPs の中には、Atoh1 陽性の細胞群と陰性の細胞群が存在することが明らかとなった。他の研究グループによる研究から、GCPs の中にサブグループが存在する可能性は示唆されていた (Xenaki et al., 2011)。しかし、これまでの研究では TAG-1 という細胞接着分子の発現様式によってサブグループの存在を示唆していたため、実際に EGL に存在するどの細胞が TAG-1 を発現し、どこに存在しているかは不明であった。一方、本研究では、転写因子である Atoh1 により細胞核を染色したことで、明瞭に区別することができ、サブグループをより明確に定義することができた。さらに、それらが oEGL の中でも表層側に層構造をなして存在することを示したことで、EGL が従来考えられていたような 2 層構造ではなく、大脳皮質のような 2 段階の増殖細胞層をもった 3 層構造によって構成されていることが解明された。また、その後の免疫染色を用いた解析によって、Atoh1 陰性の細胞群では、Atoh1 と同じ bHLH 型の転写因子である NeuroD を発現することが明らかになった。NeuroD はこれまで、GCs への分化や内顆粒層への移動に必要な分子であることが報告されており、増殖を停止した細胞において発現する分子だと考えられていた (Miyata et al., 1999)。しかし、Ki67 や PH3 との共染色により、増殖中の細胞でも発現が確認された。大脳皮質や海馬では増殖中の細胞における発現が確認されているため、本研究で見られた増殖細胞における NeuroD の発現は妥当なものだといえる (Lee et al., 2000)。以上をもって、本研究では EGL に存在する GCPs を AT⁺GCPs と ND⁺GCPs に明確に区別したと言える。AT⁺GCPs と ND⁺GCPs が、遺伝子発現様式や細胞周期の異なる前駆細胞の集団であることを示した。加えて、発現している遺伝子や細胞周期の長さから、AT⁺GCPs は活発に増殖を行う前駆細胞で、ND⁺GCPs はより分化が進んだ前駆細胞であると推察される。これまでに、Atoh1 や NeuroD の転写ターゲットとして、Gli1 や Prox1 が存在することが報告されている (Seo et al., 2007; Jahan et al., 2010; Klisch et al., 2011)。また、本研究の Atoh1 と NeuroD のノックダウン実験や強制発現実験によってそれぞれの転写因子が相互抑制関係にあることが示唆された。

このことは、Atoh1 と NeuroD がそれぞれの前駆細胞群の単なるマーカー分子ではなく、相互に転写を抑制することによって、GCPs が AT⁺GCPs から ND⁺GCPs へ遷移する際の連続性を担保し、互いの性質を決定するために重要であることを示している。

第5章 CyclinD1によるAT⁺GCPsの維持機構の解明

5.1 序論

第4章において、免疫染色法を用いて詳細にAtoh1タンパクの発現を調べることができた。さらに、Atoh1とNeuroDが相互抑制関係にあることで、AT⁺GCPsからND⁺GCPsへの連続性が担保されている可能性を示した。つまり、AT⁺GCPsからND⁺GCPsに遷移する際には、Atoh1の発現が減少することが必要であると考えられる。それでは、AT⁺GCPsにおいて、Atoh1の遺伝子発現を維持する分子メカニズムは何か。筆者は、CyclinD1に着目した。CyclinD1はCyclinDファミリーに属する細胞周期制御タンパクであり、主に、Cdk4と複合体を作り、Retinoblastoma (Rb) を含む様々な基質をリン酸化することで細胞周期のG1期からS期への移行を制御していることが知られている (Giacinti and Giordano, 2006; Suryadinata et al., 2010)。また、最近の研究によって、細胞周期の制御だけではなく、転写制御や細胞移動にも関わることが報告されている (Fu et al., 2004; Li et al., 2006; Casimiro et al., 2012)。小脳においては、SHHシグナルの下流でCyclinD1の発現が上昇し、CyclinD1を欠損したマウスでは、GCPsの増殖が著しく阻害され小脳形成に異常が生じる (Pogoriler et al., 2006)。さらに、前章において、CyclinD1がAT⁺GCPsのみに発現する様子が観察されていることから、CyclinD1がAT⁺GCPsの維持やAtoh1タンパクの発現を制御していると考えて解析を行った。

5.2 実験手法

5.2.1 ベクターコンストラクション

CyclinD1, CyclinD2, CyclinE1, Cdk2, Cdk4 の発現ベクターは、生後1日目のマウス小脳から調整した cDNA をテンプレートに CyclinD1 を PCR で増幅し、pCAGGS ベクターに挿入した。CyclinD1 の shRNA ベクターは相補的な oligoDNA (Thermo Fisher scientific) をアニーリングした後、U6 ベクターに挿入した。CyclinD1 のターゲット配列、相補的な oligoDNA は以下の通りである。

CyclinD1 target	AGACCATCCGCAAGCATGC
oligoDNA-Forward	TTTGAGACCATCCGCAAGCATGCTTCAA GAGAGCATGCTTGCGGATGGTCTTTTTT
oligoDNA-Reverse	CTAGAAAAAAGACCATCCGCAAGCATGC TCTCTTGAAGCATGCTTGCGGATGGTCT

作成したベクターを大腸菌で増幅し、精製したのち、シーケンスを確認した。エレクトロポレーションには、シーケンスを確認したベクターを大腸菌で増幅し、Endofree MaxiPrep kit(QIAGEN)を用いて精製した。

5.2.2 エレクトロポレーション

エレクトロポレーションのプロトコルは前述の通りである。各遺伝子の過剰発現実験のDNA溶液は、pCAGGS-H2BGF 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ と発現ベクター 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の混合液(コントロール群には同濃度の pCAGGS empty ベクター)を、CyclinD1 のノックダウン実験は pCAGGS-H2BGF 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ と CyclinD1 shRNA ベクター 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の混合液(コントロール群には同濃度の pU6 empty ベクター)を用いた。

5.3 実験結果

5.3.1 CyclinD1の詳細な発現様式

CyclinD1の発現様式を調べるために、CyclinD1, Ki67, NeuroD抗体を用いた三重染色を行った(図5.1)。前章と同様に、CyclinD1の発現は、AT⁺GCPs (Ki67陽性/NeuroD陰性)において強く見られるが、ND⁺GCPs (Ki67陽性/NeuroD陽性)においてはほとんど発現が見られない。前述の通り、このCyclinD1の発現はSHHシグナルの影響であると考えられる。CyclinD1は一般的にG1期からS期にかけて一過的にタンパク発現が上昇するため増殖細胞の中で不均一な発現様式を示す分子であるが、AT⁺GCPsでは一様に発現している様子が観察された。そこで、GCPsにおいて細胞周期非依存的な発現があるかどうかを確かめるために、CyclinD1の発現が本来弱いと考えられる分裂期の細胞を可視化できるPH3とCyclinD1の共染色を行った(図5.2)。NeuroD陽性のND⁺GCPsにおいては、M期の細胞でCyclinD1の発現が見

られないが(図5.2 E-G)、NeuroD陰性のAT⁺GCPsにおいては、M期の細胞でも発現が見られた(図5.2 B-D)。これらの結果から、CyclinD1が本来の機能であるG1期からS期への遷移以外の機能があると推測される。

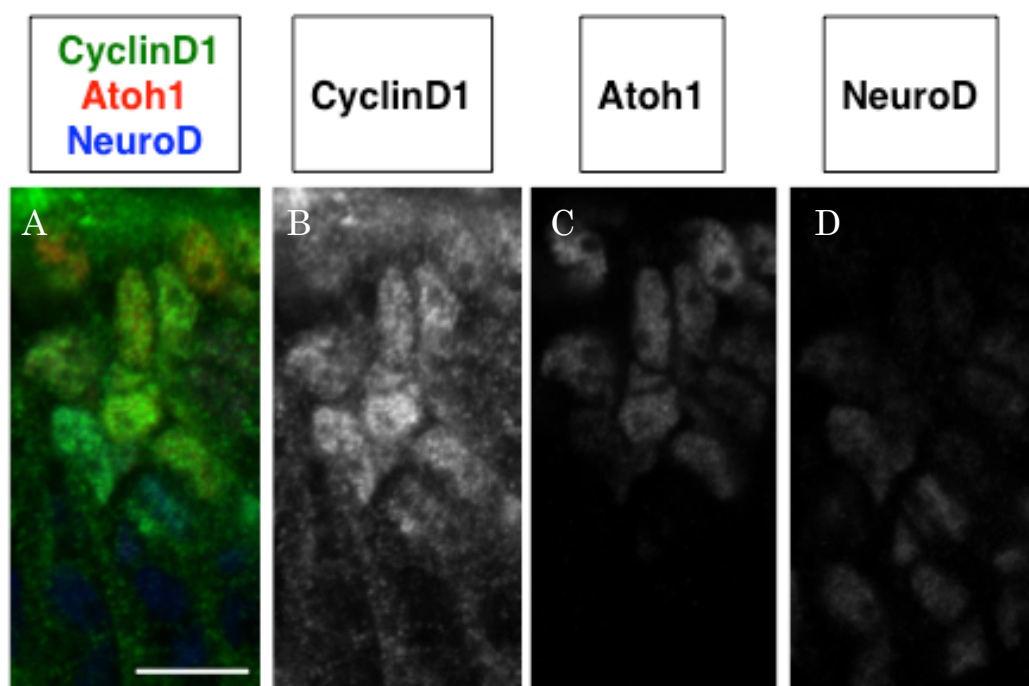


図 5.1 CyclinD1 の詳細な発現様式

(A-D) P3 のマウス EGL に対して、CyclinD1(緑)と Atoh1(赤)と NeuroD(青)で免疫染色を行った。CyclinD1 は Atoh1 陽性細胞において一様に発現している一方で、NeuroD 陽性細胞においては一部の細胞においてのみ発現している。

Scale bar 10 μ m。

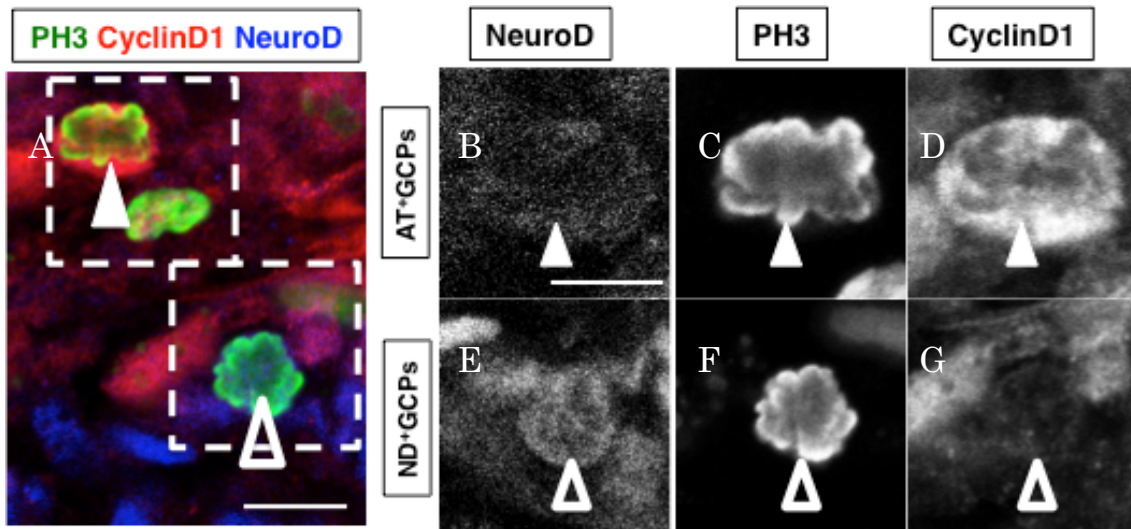


図 5.2 CyclinD1 の細胞周期非依存的な発現様式

(A-D) P3 のマウス EGL に対して、PH3(緑)と CyclinD1(赤)と NeuroD(青)で免疫染色を行った。(A) NeuroD 陰性の AT⁺GCPs において PH3 陽性細胞で CyclinD1 が発現している様子が見られた。(A-D) 一方、ND⁺GCPs では PH3 陽性細胞で CyclinD1 の発現は観察されなかった。(E-G) Scale bar, 10 μ m。

5.3.2 AT⁺GCPs における CyclinD1 の機能解析

AT⁺GCPsにおけるCyclinD1の機能を解析するために、EGLに存在するGCPsに対して、エレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入実験を行った。筆者はまず、CyclinD1のshRNAベクターを作成し、エレクトロポレーションによるノックダウン実験を行った。生後5日目のマウスにCyclinD1 KDベクターを導入し、次の日にサンプリングを行い、CyclinD1抗体で免疫染色を行った。遺伝子導入された細胞を可視化するために、ヒストンとGFPの融合タンパクを発現させるH2B-GFPを導入している。CyclinD1のKDがAT⁺GCPsの維持やND⁺GCPsへの遷移に影響を与えるかどうかを調べるために、生後5日目に遺伝子導入し、次の日にサンプリングした小脳EGLに対し、Atoh1-Ki67-NeuroDで免疫染色を行った(図5.3)。KDベクターを導入していないコントロール群と比較して、KDベクターを導入した群では、遺伝子導入された細胞がより実質側に移動していることがわかる(図5.3A-H)。遺伝子導入された細胞の中で、NeuroD陰性Atoh1陽性のAT⁺GCPsの割合をコントロール群とKD群で比較すると、KD群の方が有意にAT⁺GCPsの割合が増加しているがKi67陽性のGCPsの割合には変化がなかった(図5.3 I, J)。この結果は、CyclinD1をKDすることによって、AT⁺GCPsからND⁺GCPsへの遷移が促進されたことを示めている。つまり、CyclinD1が存在すると、ND⁺GCPsへの分化が阻害され、AT⁺GCPsとしての性質が維持されることが示唆される。

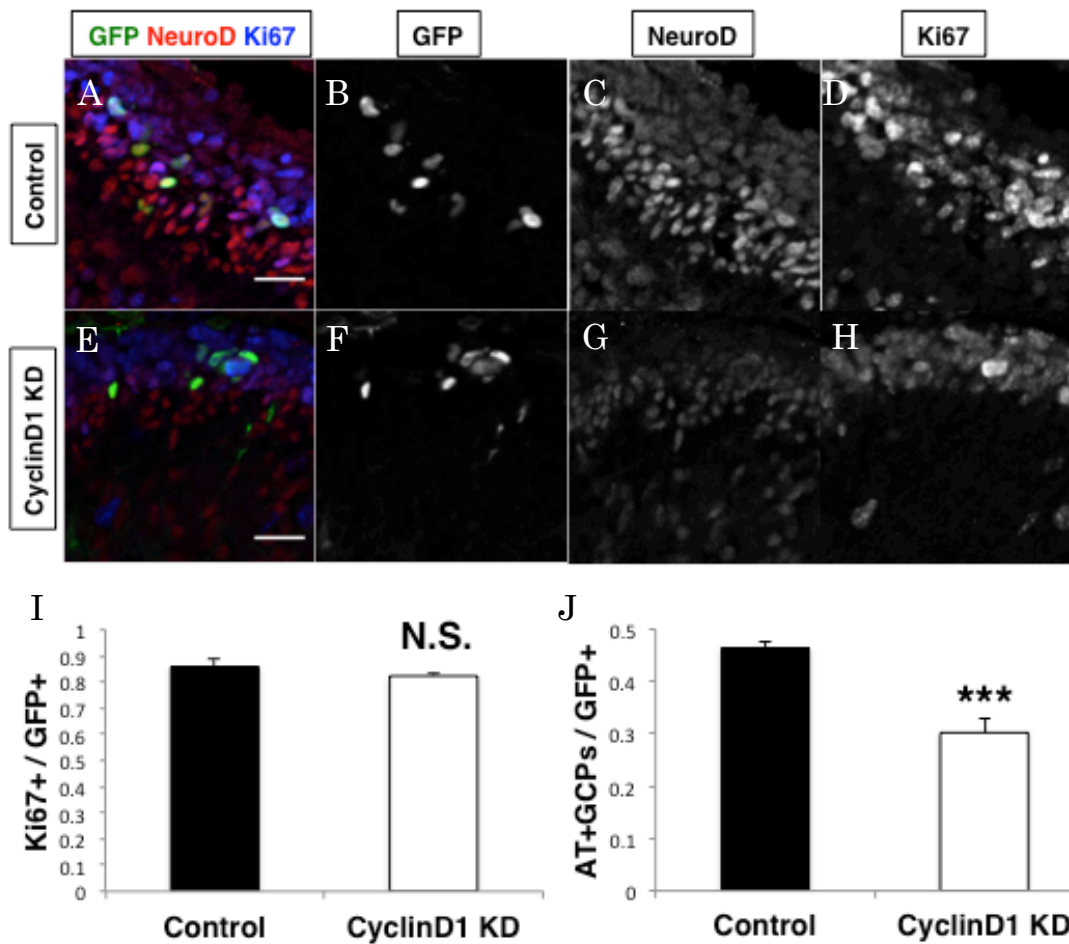


図 5.3 CyclinD1 の機能解析

(A-J) P5 のマウス EGL に対して、CyclinD1 shRNA を遺伝子導入し、P6 で GFP (緑), NeuroD(赤), Ki67(青)の免疫染色を行った。Control 群(A-D) と CyclinD1 sh RNA 導入群(CyclinD1 KD, E-H)。scale bar, 20 μ m。遺伝子が導入され GFP で可視化された細胞のうち Ki67 陽性の細胞の割合(I) と NeuroD 陰性の AT+GCPs の割合(J)。統計解析は T-test を用いた。N.S. $p \geq 0.05$, *** $p < 0.0001$ 。

5.3.3 CyclinD1によるAT⁺GCPsの維持に関わる分子機構

前述の通り、CyclinD1にはCdkと複合体を作らずに、CyclinD1単体で転写の調節や移動を制御することが報告されている。CyclinD1によるAT⁺GCPsの維持がCdkとの複合体によるものなのか、それともCyclinD1単体によるものなのかを調べるために、エレクトロポレーション法を用いたCyclinD1の過剰発現実験を行った。LangeらはCyclinD1単体の過剰発現により、表現型が出るならば、それはCdkを介さないCyclinD1の機能であると報告している(Lange et al., 2009)。そこで、生後5日目にCyclinD1の発現ベクターを導入し、その翌日に免疫染色を行った(図5.4)。コントロール群とCyclinD1の過剰発現群を比較すると、AT⁺GCPsの割合に差は見られなかった。本実験では、ベクター導入から翌日に解析を行っているため、CyclinD1の過剰発現による効果を見るには短い可能性や、AT⁺GCPsが内在的に多くのCyclinD1を発現していることにより、過剰発現による効果が見られなかったという可能性も否定できない。しかしながら、shRNAによるCyclinD1のノックダウン実験ではコントロールと差が見られていることやAtoh1を多く発現するAT⁺GCPsに過剰にAtoh1を発現させる実験においてもコントロールと差が見られていることを踏まえると、AT⁺GCPsの維持はCyclinD1によるCdk非依存的な機能ではないということが推察される。CyclinD1は、G1期において細胞周期依存的キナーゼのCdk4や6と結合し、Rbをリン酸化することでG1期からS期への移行に寄与することが知られている(Giacinti and Giordano, 2006; Suryadinata et al., 2010)。Cdk4はEGLにおいて発現することがすでに報告されているが、Cdk6の発現に関しては不明である(Migheli et al., 1999)。本実験においては、CyclinD1とCdk4の複合体に着目した。そこで、CyclinD1の機能がCdk4に依存するかどうかを確かめるために、CyclinD1とCdk4の発現ベクターを同時に導入し、AT⁺GCPsの割合を調べた(図5.5)。CyclinD1とCdk4を同時に導入した群(CyclinD1・Cdk4共発現群)では、Ki67陽性細胞の割合には変化がないものの、AT⁺GCPsの割合が有意に増加していることがわかる(図5.5I, J)。前項の結果とあわせて、CyclinD1はAT⁺GCPsにおいて、細胞周期非依存的に発現していることが明らかになっていることから、AT⁺GCPsにおいては、常にCyclinD1とCdk4が複合体を形成することで、Cdkがキナーゼ活性を持ち、AT⁺GCPsの維持に関与していることが推察される。

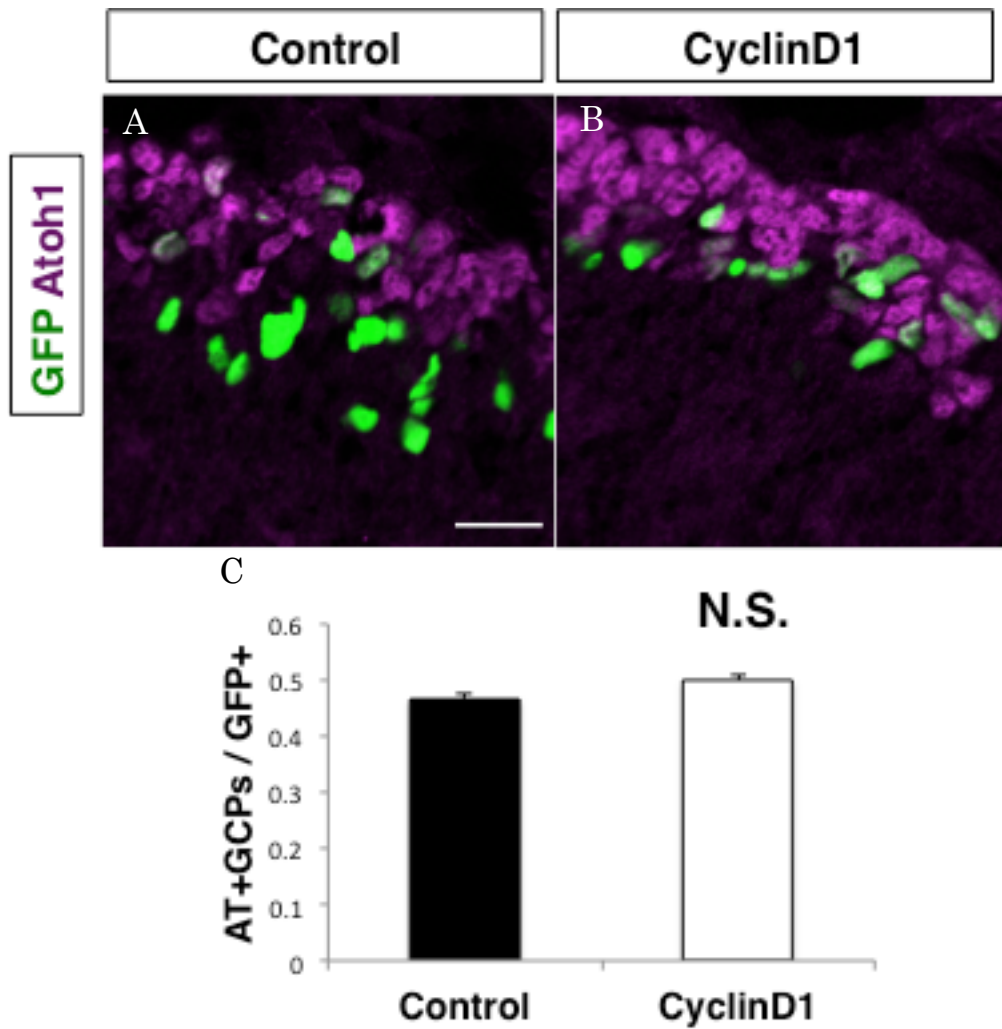


図 5.4 CyclinD1 の過剰発現実験

(A-C) P5のマウス EGL に対して、CyclinD1 発現ベクターを遺伝子導入し、P6 で GFP (緑)、Atoh1(マゼンタ)の免疫染色を行った。Control 群(A)と CyclinD1 過剰発現群(CyclinD1, B)の間で Atoh1 陽性細胞の割合に差は見られなかった(C)。N. S. $p \geq 0.05$

scale bar, 20 μ m。

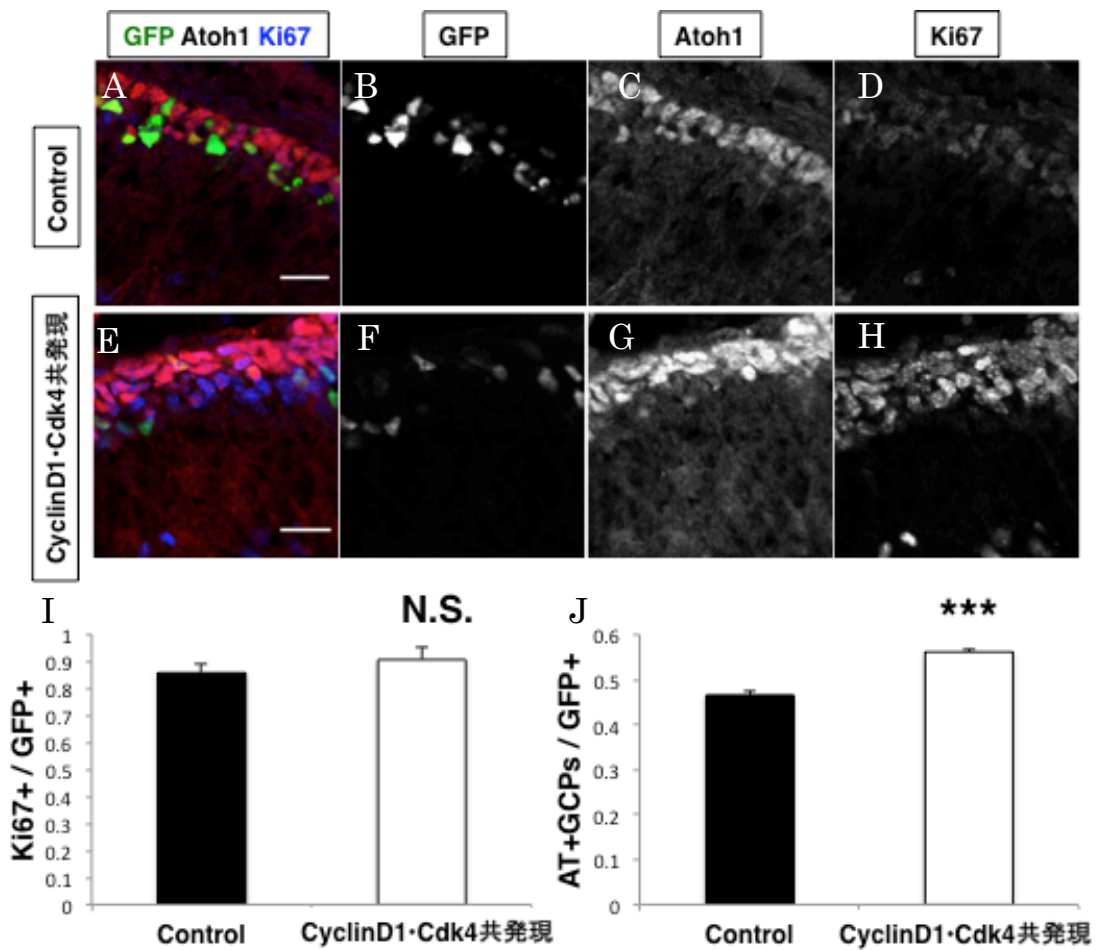


図 5.5 CyclinD1+Cdk4 複合体の過剰発現実験

(A-J) P5 のマウス EGL に対して、CyclinD1 shRNA を遺伝子導入し、P6 で GFP (緑), Atoh1 (赤), Ki67 (青) の免疫染色を行った。Control 群 (A-D) と CyclinD1 と Cdk4 共発現群 (CyclinD1·Cdk4 共発現 KD, E-H)。scale bar, 20 μ m。遺伝子が導入され GFP で可視化された細胞のうち Ki67 陽性の細胞の割合 (I) と NeuroD 陰性の AT⁺GCPs の割合 (J)。統計解析は T-test を用いた。N. S. $p \geq 0.05$, *** $p < 0.0001$ 。

5.4 考察

前章において、EGL には、AT⁺GCPs と ND⁺GCPs の 2 種類の前駆細胞が存在することが示され、それぞれ転写因子 Atoh1 と NeuroD が相互抑制の関係で互いの性質の維持を制御していることが示唆された。つまり、AT⁺GCPs が ND⁺GCPs へ遷移する際には、Atoh1 の発現が減少することが必要であると考えられる。本章では、AT⁺GCPs において細胞周期非依存的に発現している CyclinD1 に着目し、エレクトロポレーション法を用いて、CyclinD1 の発現が AT⁺GCPs の維持に重要であることを示した。さらに、*in vitro* や *in vivo* での解析から、CyclinD1 の機能が、CyclinD1 単体によるものではなく、CyclinD1 と Cdk4 複合体によるものであることが示唆された。EGL に存在する GCPs は SHH シグナルが主要な増殖因子であり、本研究により AT⁺GCPs が SHH シグナルを受け、CyclinD1 を高発現していることがわかった。EGL は生後に存在する前駆細胞であるが、生後から生涯にかけて存在する海馬や大脳皮質の神経幹細胞と異なり、生後 2 週間ほどで消失してしまう (Ming and Song, 2011)。これは、プルキンエ細胞における SHH の発現量が出生直後は高く、その後、減少していくことによって、CyclinD1 の発現量も減少し、その結果、Atoh1 の発現量が減少していくことが原因であると考えられる。実際に、SHH の過剰発現マウスにおいては、出生直後は EGL の厚みに変化はないものの、野生型において EGL が消失してしまう時期でも EGL に増殖細胞が存在していることが報告されている (Corrales, et al., 2004)。

第6章 総括

生物が受精卵から生体へと発生する過程で、各組織における幹細胞や前駆細胞は増殖を繰り返し、適切なタイミングで増殖を停止することで、増殖細胞から機能を持った分化細胞へと性質を変化させる。このように、適切なタイミングで増殖を停止することは生物の発生における重要なプロセスであり、各組織においてこのプロセスが正常に完了することで、組織は形成され機能する。しかしながら、どのような細胞メカニズムや分子機構でこのタイミングが制御されているのかは未だ完全に解明されていない。特に、適切な組織形成が正常な機能獲得に重要である中枢神経系において、この制御機構を解明することは中心的な課題のひとつである。本論文において、筆者は中枢神経系における増殖細胞の増殖停止機構を解明するために、小脳顆粒細胞前駆体(GCPs)をモデルに研究を行った。

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。

大脳皮質における神経前駆細胞は、分裂面の角度に規則性があり、なおかつ、分裂面の角度と娘細胞の運命決定の間に相関関係があることが報告されている(Wilcock et al., 2007; Zhong and Chia, 2008)。そこで第2章では、GCPsにおける対称分裂・非対称分裂を調べるために、発生段階の各ステージで分裂面角度を解析した。まず、GCPsの分裂を分裂面の角度によって、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の分裂面方向をVDまたはHDに決定させる機構があることが推察された。GCPsの発生初期(胎生後期)では、VDとHDの割合に差が見られなかった。一方、GCPsの発生中期(P0~P9)においてはHDの割合がVDに対して高くなり、GCPsの発生後期(P12以降)においてはこの傾向が逆転した。この傾向は、矢状面・冠状面のどちらの方向から解析した場合でも、観察された。小脳EGLは生後の初期に拡大し生後の後期には消失していくこと、分裂面方向と対称分裂・非対称分裂の間に相関関係があることを総合し、EGLの拡大と縮小過程を分裂面方向の変化によって説明するモデルを提唱した。

第3章では、このGCPsの分裂面の角度のダイナミックな変化を制御する分子機構を明らかにするために、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。まず、我々の小脳スライス培養の系が生体における分裂面の割合を反映していることを確かめた。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、HDの割合が減少し、VD, ODの割合が増加し、GCPsの分裂面がコントロールよりもよりランダムになることが示唆された。この結果は、SHHシグナルがGCPsの分裂面角度の規則性をもたらしていることを示唆するデータである。第2章・第3章では、主に大脳皮質において得られていた分裂面の変化と神経幹細胞の増殖停止機構に関する知見を基に、GCPsにおいても同じ傾向を見出すことができた(Chenn and McConnell, 1995; Kosodo et al., 2004)。このことは、神経幹細胞や前駆細胞の増殖の停止機構が中枢神経系全体に渡って共通の制御機構で支配されている可能性を指し示す結果である。分裂面の角度は、(1) 分裂前の母細胞において、分裂後の娘細胞の運命(再び増殖するか、増殖を停止し分化するか)を決定する機構と(2) 分裂中の細胞において、紡錘体の分裂方向を決定する機構が複雑に相互作用することによって決定されると考えられる。(1)や(2)のプロセスを制御する分子のどちらかを欠損した場合においても、分裂面角度の制御に異常が生じることが報告されている(Fish et al., 2006, Konno et al., 2008, Asami et al., 2011)。Wangらの研究によって、大脳皮質においてSHHシグナルの活性化が神経前駆細胞の分裂面角度に影響を及ぼすことが報告されている(Wang et al., 2016)。しかし、Wangらの研究では、Smoothened (Smo)の恒久的な活性化マウスを用いているため、分裂期以外の神経細胞と分裂中の神経前駆細胞のどちらにおいてもSHHシグナルの活性化による影響が生じていると考えられる。すなわち、SHHシグナルが前述の(1)か(2)のどちらに影響を及ぼし、分裂面角度の制御が行っているのかを区別することは難しい。それに対して本論文では、小脳スライス培養に阻害剤を投与し、投与から6時間後に解析するという実験スケジュールを採用した。この場合、SHHシグナルの下流の転写因子であるGli1やGli2の転写調節機能への阻害効果はほとんど無視できると考えられる。つまり、(1)の母細胞における運命決定による影響はほとんどないか、存在しても

極めて限定的であると考えるのが妥当だろう (Rimkus et al., 2016)。本論文において得られた SHH シグナル阻害による分裂面角度の制御機構の欠如は、SHH シグナルの下流で Smo が活性化することにより、直接、紡錘体の分裂方向に影響を与えていると解釈することができるのではないだろうか。この新しい知見は、分裂停止機構の解明や分裂面角度のダイナミックな変化を制御する分子機構のより詳細な解析をする上で、GCPs の発生だけでなく中枢神経系の発生に関わる分野全体の発展に貢献しうる重要な知見を与える結果であると考えられる。しかしながら、Gli の転写を介した典型的な SHH シグナルの影響を完全に排除する結果ではないため、さらなる解析で、より厳密に (1) と (2) を区別することが必要である。また、SHH シグナルは小脳髄芽腫の原因であるため、本論文において得られた知見は、将来的に、小脳髄芽腫の病態解明や新規治療戦略の開発においても重要な役割を担う可能性も考えられる。

第 4 章では、GCPs の増殖停止に関わる分子機構をさらに解析するために、bHLH 型の転写因子 *Atoh1* に着目した。これまで、*Atoh1* は oEGL に存在する Ki67 陽性の GCPs において、均一に発現する分子であると考えられてきた (Akazawa et al., 1995)。しかし、*Atoh1* と Ki67 による二重染色によって、Ki67 陽性の GCPs が *Atoh1* 陽性と陰性の細胞に分離できることが明らかとなった。さらに、*Atoh1* 陰性の細胞群では bHLH 型の転写因子 *NeuroD* が発現していることも見出し、これらの細胞群を AT⁺GCPs, ND⁺GCPs とそれぞれ定義した。それぞれの前駆細胞が DNA 合成と細胞分裂を行うことを示したことで、GCPs の中に 2 種類の前駆細胞が存在することを明らかにした。本論文では、*Atoh1* 遺伝子の欠損マウスを用いて抗体の特異性が確かめられている抗体を使用したため、これまでに報告されてこなかった GCPs における *Atoh1* タンパクの発現の不均一性を初めて明らかにすることができたと考えられる (Yamada et al., 2014)。次に、AT⁺GCPs と ND⁺GCPs で発現している遺伝子と細胞周期の長さを調べた。AT⁺GCPs では増殖の維持に関わる分子が発現し、ND⁺GCPs では増殖の停止に関わる分子が発現していた。また、細胞周期の長さは、S 期の長さが AT⁺GCPs で長く、S 期を除いた長さは ND⁺GCPs の方が長かった。細胞周期の長さは増殖細胞の分化に伴って、S 期が短く、G1 期が長くなることが報告されている (Lange et al., 2009; Arai et al., 2011)。一方、G2 期・M 期の長さはあまり変動

しないことから、ND⁺GCPs ではG1 期が長くなったことで、S 期以外の細胞周期の時間が長くなっていると考えられる。これらの結果はどちらもND⁺GCPs の方がより分化した性質の前駆細胞であることを示唆する結果である。また、GCPs は EGL を形成する前の RL に存在するときから Atoh1 を発現し続けること、ND⁺GCPs の方が AT⁺GCPs よりも実質に近いところに存在し、GCPs は分化するにつれて内側に移動していくことを総合して考慮し、GCPs は EGL 内で AT⁺GCPs→ND⁺GCPs→GCs という順に分化していくという新規モデルを提唱した。今後、さらなる解析によって、AT⁺GCPs→ND⁺GCPs→GCs という一方向性を証明する必要がある。EGL に存在する GCPs を、Atoh1 か NeuroD を発現する 2 種類の細胞に明瞭に区分することができ、どちらも発現しない細胞や両方の遺伝子を強く発現する細胞はほとんど観察されなかった。このことは、GCPs において、Atoh1 と NeuroD の発現が連続的に切り替わることを示唆している。そこで、Atoh1 と NeuroD が相互に転写抑制を行っているという仮説を立て、エレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入実験を行った。AT⁺GCPs において、Atoh1 をノックダウンすると、異所的な NeuroD タンパクの発現上昇が見られ、AT⁺GCPs に NeuroD を過剰発現すると、Atoh1 タンパクの発現が減少した。これらの結果は、Atoh1 と NeuroD が相互に転写抑制を行っているという仮説を支持する結果である。しかしながら、この転写抑制関係が、直接的なものか間接的なものかに関しては今後さらなる解析が必要である。

GCPs 内のサブグループの存在についてはこれまでも議論されてきたが、そのサブグループの有用なマーカーや細胞の局在に関しては未だに不明であった(Xenaki et al., 2011)。本研究では、Atoh1 と NeuroD という二つの転写因子をマーカーとして用いることで、それぞれの遺伝子を発現する細胞の核を標識し、それぞれの前駆細胞が存在する位置を明らかにすることができた Xenaki らは TAG-1 をマーカーとして用いて GCPs を分類しているが、細胞膜に局在する TAG-1 よりも核に存在する Atoh1 や NeuroD の方が、より効果的なマーカーであると考えられる。また、Xenaki らは TAG-1 を発現することで、SHH シグナルに阻害的に働き分化を阻害すると主張している。AT⁺GCPs と ND⁺GCPs も Gli1 の発現に違いが見られることから、SHH シグナルに対して異なる反応性を示していると考えられる。このことは、Xenaki らが主張する TAG-1 を発現する GCPs のサブグループが ND⁺GCPs で

ある可能性を示唆している。さらに、AT⁺GCPs と ND⁺GCPs がそれぞれ層構造を成していることから、TAG-1 のような接着因子の発現の違いによって、これらの細胞群が EGL 内でソーティングされていると考えられる。今後は、AT⁺GCPs と ND⁺GCPs において発現している遺伝子群をより網羅的に調べ、二つの細胞群の違いをより鮮明にする必要がある。しかしながら、AT⁺GCPs と ND⁺GCPs を分類できたことは、GCPs の発生だけではなく大脳皮質のしわ構造の形成機構に関しても示唆的であり、貢献できる結果であると考えられる。大脳皮質は、霊長類などの一部の生物においては特徴的なしわ構造が見られ、それは、OSVZ という増殖層が存在することでより多くの神経細胞が産み出されるためだと考えられている (Fietz et al., 2010)。しわ構造が存在する生物において、OSVZ というもうひとつの増殖層が存在することで、神経幹細胞が、VZ→ISVZ→OSVZ という順に層を移動し徐々に分化しながら増殖を繰り返すことができるため、しわ構造が存在しない生物よりも効率良く増殖することができる。小脳においても、Atoh1 陽性細胞から Atoh1 陰性細胞へと 2 段階の増殖プロセスを持つことで、少数の前駆細胞から数多くの神経細胞を産み出すことが可能となり、しわ構造を形成できると考えている。実際に Atoh1 の欠損マウスや過剰発現マウスを用いた研究では、GCPs の増殖が影響を受けしわ構造に異常が生じることが観察されている (Helms et al., 2001; Flora et al., 2009)。前述の通り、大脳皮質のしわ構造の形成には、発生期の VZ→SVZ→OSVZ という三段階の増殖層の存在が関連していると考えられているが、同じくしわ構造を有する小脳も GCPs の起源である胎生期の RL を含めると RL→AT⁺GCPs→ND⁺GCPs という三段階の増殖層をもつことから、大脳皮質のしわ構造形成の解析の新たなモデルとなることを提案したい (図 6. 1)。現在、OSVZ の発生機構は、OSVZ を持つ霊長類やフェレットを用いて解析を行うか、マウスの大脳皮質への遺伝子導入や遺伝子欠損によって人工的に OSVZ を作り上げ解析を行うといった手法で行われている。前者は、モデル動物としてマウスやラットよりも管理や解析に困難が多く伴い、後者は、人工的なモデルのため、生体内でおこる細胞の振る舞いや遺伝子発現を必ずしも反映していないというデメリットがある。一方で、ND⁺GCPs が OSVZ のモデルとして研究に用いられるようになれば、野生型のマウスに生来的に存在しているため、人工的なモデルと比較して細胞の振る舞いや遺伝子発現を忠実に反映してい

ることが期待され、さらに、マウスはモデル動物として長らく研究されてきたため、遺伝子工学的手法を用いた実験系が多く確立している。小脳と大脳皮質で組織が違うため、理想的なモデルであるとは言えないかもしれない。しかし、小脳はマウスの中枢神経系において唯一、しわ構造を持つ組織であり、第2章・第3章で明らかにしたように、大脳皮質における神経幹細胞の挙動と同様の挙動がGCPsにおいても観察された。さらに、これまでにヒトのOSVZにおいて発現が上昇することが報告されているいくつかの遺伝子がEGLでも発現していることを見出している。上述したAT⁺GCPsやND⁺GCPsにおける網羅的な遺伝子発現解析が行われた際には、ヒトのOSVZにおいて発現している遺伝子群と発現プロファイルを比較する実験を行うことで、ND⁺GCPsがヒトOSVZのマウスモデルとしての妥当性を検証したいと考えている。

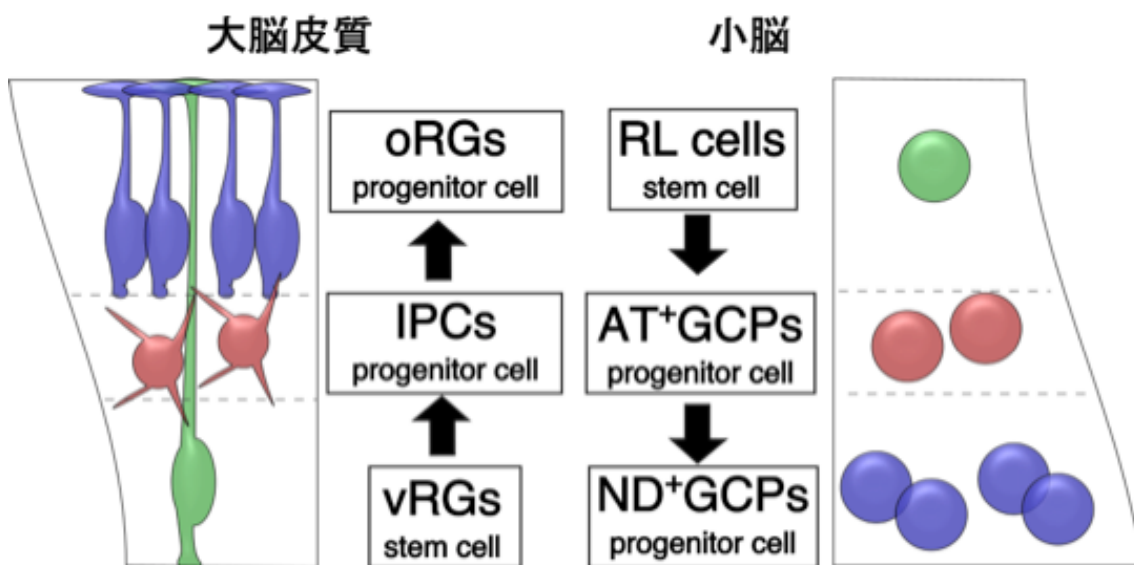


図 6.1 大脳皮質と小脳に見られる類似した構造

大脳皮質ではVZに存在するventral Radial Glial cells(vRGs)から、1SVZに存在するIntermediate Progenitor Cells(IPCs)が産み出され、そして、OSVZに存在するouterRadial Glial cells(oRGs)が産み出される。一方、小脳はRLで産まれたGCPsがEGLを形成し、EGL内でAT⁺GCPs→ND⁺GCPs

と分化していく。このように、どちらの組織においても3段階の前駆細胞の増幅機構が見られる。

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ために、さらなる解析を行った。第4章において、細胞周期関連タンパク質の1つであり、SHH シグナルの下流で発現が上昇する 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。CyclinD1 は G1 期 Cyclin のひとつであり、CyclinD ファミリーに属する分子である。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。このことは、PH3 を用いた免疫染色で、一般的に CyclinD1 が弱いと考えられている M 期においても、強い発現が見られたことから確かめられた。CyclinD1 は、G1 期において細胞周期依存的キナーゼの Cdk4 や 6 と結合し、Rb をリン酸化することで G1 期から S 期への移行に寄与することが知られている (Giacinti and Giordano, 2006; Suryadinata et al., 2010)。しかし、近年では、これまでに知られていた細胞周期に関わる働きだけではなく、転写調節や細胞移動にも関わることが報告されている (Fu et al., 2004)。これらのことから、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、CyclinD1 が AT⁺GCPs から ND⁺GCPs への分化に果たす役割を解析した。shRNA ベクターを用いた CyclinD1 のノックダウン実験を行ったところ、CyclinD1 のノックダウンにより、AT⁺GCPs の割合が有意に減少することを見出した。つまり、CyclinD1 が AT⁺GCPs から ND⁺GCPs への分化を阻害し、AT⁺GCPs の維持を制御していることが示唆された。次に、この表現型が Cdk との結合を介さない、CyclinD1 の機能であるかどうかを調べるために、CyclinD1 の過剰発現実験を行った。CyclinD1 を単独で過剰発現させると、内在的に発現している Cdk よりも多量の CyclinD1 が細胞内で発現されると考えられる。そのため、細胞周期の進行以外の機能がある場合には、Cdk と結合できない CyclinD1 が転写調節や細胞移動の制御を行うと解釈されている (Lange et al., 2009)。しかし、AT⁺GCPs において、CyclinD1 の過剰発現を行っても AT⁺GCPs の割合に有意な差が見ら

れなかった。一方、CyclinD1 と Cdk4 を同時に過剰発現させた場合には AT⁺GCPs の割合が有意に上昇したことから、この表現型には Cdk4 との結合を介した CyclinD1 の機能が重要であると考えられる(図 6.2)。今回、Cdk6 ではなく Cdk4 を採用したのは、Cdk4 の発現がすでに報告されていたためである(Migheli et al., 1999)。今後、EGL における Cdk6 の発現の有無や CyclinD-Cdk6 複合体において AT⁺GCPs の割合がどう変化するかを確かめる必要がある。前章で示されたように、Atoh1 と NeuroD は相互に抑制し合う関係にあるため、Atoh1 陽性/NeuroD 陰性の AT⁺GCPs から Atoh1 陰性/NeuroD 陽性の ND⁺GCPs へと分化する際には、Atoh1 の発現低下が必要になる。第 5 章で明らかにした CyclinD1 の機能と生後マウスの AT⁺GCPs と ND⁺GCPs では CyclinD1 の発現様式が大きく異なっていることを踏まえると、AT⁺GCPs において CyclinD1 の発現量が低下することによって AT⁺GCPs から ND⁺GCPs への分化が進行していると考えられる。第 4 章で示したように、AT⁺GCPs において Gli1 が発現していることから、AT⁺GCPs のみが SHH シグナルに応答していると考えられる。Gli1 の下流のターゲットに CyclinD1 が存在していることから、GCPs の細胞外に存在する SHH シグナルの減少や細胞内での SHH シグナルへの応答性が変化することによって、CyclinD1 の減少とそれに伴う Atoh1 タンパクの不安定化により発現量が減少し、AT⁺GCPs から ND⁺GCPs へと分化すると推測される(Kenney et al., 2003)。これまでに、SHH を放出するプルキンエ細胞において、SHH の発現量が発生に伴って減少することや Gli1 のエピジェネティックな制御により GCPs の SHH シグナルへの応答性が変化することが報告されている(Corrales et al., 2004; Tiberi et al., 2014)。以上のことを踏まえると、細胞外と細胞内の両方向から SHH シグナルへの応答性を制御する機構が存在することによって AT⁺GCPs から ND⁺GCPs への分化が正常に完了するように担保されていると推察することができる。SHH 型の小脳髄芽腫では、SHH シグナルの過剰な亢進と Atoh1 の高発現が報告されている。これは、本研究によって明らかにした CyclinD1-Cdk4 複合体による AT⁺GCPs から ND⁺GCPs への分化阻害機構が、Atoh1 タンパクの高発現に寄与している可能性が疑われる(Flora et al., 2009; Kool et al., 2014)。

本論文では、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、GCPs の発生をモデルとして、分裂面の角度という細

胞の挙動と Atoh1 と CyclinD1 を中心とした分子メカニズムの観点から研究を行った。どちらの観点からも、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知見を得ることができた。さらに、SHH シグナルが分裂面の角度だけではなく AT⁺GCPs から ND⁺GCPs への分化にも必要であることが推察された。今後は、それぞれの観点に関して深く研究を推進していくとともに、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ついても研究を行っていくことで新たな知見を積み重ねることができよう。また、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も今後の大きな課題の一つである。

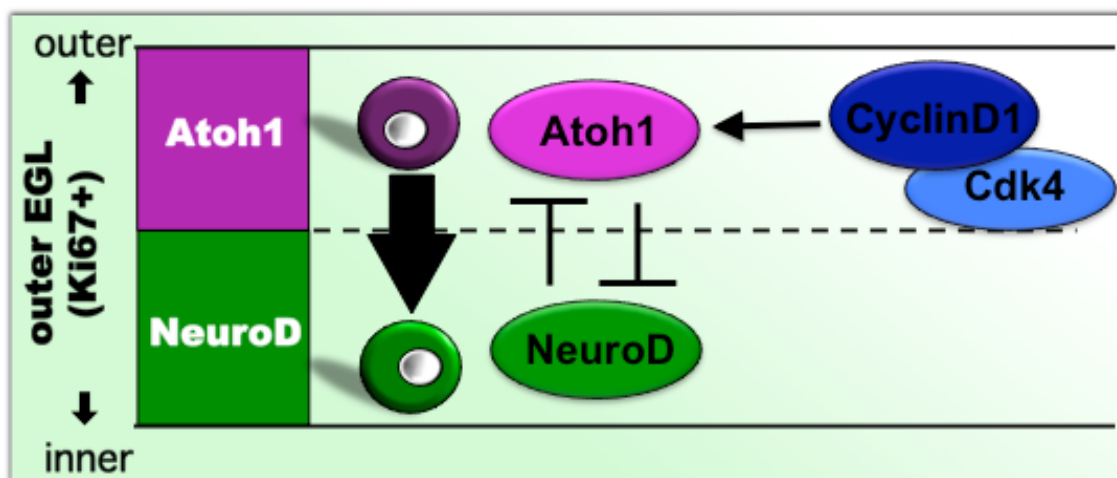


図 6.2 AT⁺GCPs と ND⁺GCPs における分子の発現制御機構

outer EGL は Atoh1 を発現する AT⁺GCPs と NeuroD を発現する ND⁺GCPs に分類することができる。Atoh1 と NeuroD は発現を相互に抑制し合うことで、互いの性質を維持し、AT⁺GCPs から ND⁺GCPs に移行する際にはその連続性を担保する。また、AT⁺GCPs において、CyclinD1-Cdk4 複合体が ND⁺GCPs への分化を阻害していることが示唆された。

参考文献

Ahmed, I., S. N. Kureel and N. Chandra (2011). "Stridor with recurrent chest infection." Asian Cardiovasc Thorac Ann **19**(6): 443.

Akazawa, C., M. Ishibashi, C. Shimizu, S. Nakanishi and R. Kageyama (1995). "A mammalian helix-loop-helix factor structurally related to the product of *Drosophila* proneural gene *atonal* is a positive transcriptional regulator expressed in the developing nervous system." J Biol Chem **270**(15): 8730-8738.

Alder, J., N. K. Cho and M. E. Hatten (1996). "Embryonic precursor cells from the rhombic lip are specified to a cerebellar granule neuron identity." Neuron **17**(3): 389-399.

Altman, J. (1972). "Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. I. The external germinal layer and the transitional molecular layer." J Comp Neurol **145**(3): 353-397.

Altman, J., and S.A. Bayer(1997) "Development of cerebellar system; in relation to its evolution, structure, and functions." CRC Press.

Arai, Y., J. N. Pulvers, C. Haffner, B. Schilling, I. Nusslein, F. Calegari and W. B. Huttner (2011). "Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production." Nat Commun **2**: 154.

Aruga, J., O. Minowa, H. Yaginuma, J. Kuno, T. Nagai, T. Noda and K. Mikoshiba (1998). "Mouse *Zic1* is involved in cerebellar development." J Neurosci **18**(1): 284-293.

Asami, M., G. A. Pilz, J. Ninkovic, L. Godinho, T. Schroeder, W. B. Huttner and M. Gotz (2011). "The role of Pax6 in regulating the orientation and

mode of cell division of progenitors in the mouse cerebral cortex." Development **138**(23): 5067–5078.

Ayrault, O., H. Zhao, F. Zindy, C. Qu, C. J. Sherr and M. F. Roussel (2010). "Atoh1 inhibits neuronal differentiation and collaborates with Gli1 to generate medulloblastoma-initiating cells." Cancer Res **70**(13): 5618–5627.

Azevedo, F. A., L. R. Carvalho, L. T. Grinberg, J. M. Farfel, R. E. Ferretti, R. E. Leite, W. Jacob Filho, R. Lent and S. Herculano-Houzel (2009). "Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain." J Comp Neurol **513**(5): 532–541.

Behesti, H. and S. Marino (2009). "Cerebellar granule cells: insights into proliferation, differentiation, and role in medulloblastoma pathogenesis." Int J Biochem Cell Biol **41**(3): 435–445.

Ben-Arie, N., H. J. Bellen, D. L. Armstrong, A. E. McCall, P. R. Gordadze, Q. Guo, M. M. Matzuk and H. Y. Zoghbi (1997). "Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons." Nature **390**(6656): 169–172.

Brooks, E. E., N. S. Gray, A. Joly, S. S. Kerwar, R. Lum, R. L. Mackman, T. C. Norman, J. Rosete, M. Rowe, S. R. Schow, P. G. Schultz, X. Wang, M. M. Wick and D. Shiffman (1997). "CVT-313, a specific and potent inhibitor of CDK2 that prevents neointimal proliferation." J Biol Chem **272**(46): 29207–29211.

Buczkwicz, P., J. Ma and C. Hawkins (2011). "GLI2 is a potential therapeutic target in pediatric medulloblastoma." J Neuropathol Exp Neurol **70**(6): 430–437.

Butts, T., M. J. Green and R. J. Wingate (2014). "Development of the cerebellum: simple steps to make a 'little brain'." Development **141**(21):

4031-4041.

Casimiro, M. C., M. Crosariol, E. Loro, A. Ertel, Z. Yu, W. Dampier, E. A. Saria, A. Papanikolaou, T. J. Stanek, Z. Li, C. Wang, P. Fortina, S. Addya, A. Tozeren, E. S. Knudsen, A. Arnold and R. G. Pestell (2012). "ChIP sequencing of cyclin D1 reveals a transcriptional role in chromosomal instability in mice." J Clin Invest **122**(3): 833-843.

Chedotal, A. (2010). "Should I stay or should I go? Becoming a granule cell." Trends Neurosci **33**(4): 163-172.

Chen, C., G. A. Lee, A. Pourmorady, E. Sock and M. J. Donoghue (2015). "Orchestration of Neuronal Differentiation and Progenitor Pool Expansion in the Developing Cortex by SoxC Genes." J Neurosci **35**(29): 10629-10642.

Chen, J. K., J. Taipale, K. E. Young, T. Maiti and P. A. Beachy (2002). "Small molecule modulation of Smoothed activity." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14071-14076.

Chenn, A. and S. K. McConnell (1995). "Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis." Cell **82**(4): 631-641.

Corrales, J. D., G. L. Rocco, S. Blaess, Q. Guo and A. L. Joyner (2004). "Spatial pattern of sonic hedgehog signaling through Gli genes during cerebellum development." Development **131**(22): 5581-5590.

Custo Greig, L. F., M. B. Woodworth, M. J. Galazo, H. Padmanabhan and J. D. Macklis (2013). "Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity." Nat Rev Neurosci **14**(11): 755-769.

Dahmane, N. and A. Ruiz i Altaba (1999). "Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum." Development **126**(14): 3089-3100.

Ernst, C. (2016). "Proliferation and Differentiation Deficits are a Major Convergence Point for Neurodevelopmental Disorders." Trends Neurosci **39**(5): 290-299.

Dyer, M. A., F. J. Livesey, C. L. Cepko and G. Oliver (2003). "Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina." Nat Genet **34**(1): 53-58.

Feitelson, M. A., A. Arzumanyan, R. J. Kulathinal, S. W. Blain, R. F. Holcombe, J. Mahajna, M. Marino, M. L. Martinez-Chantar, R. Nawroth, I. Sanchez-Garcia, D. Sharma, N. K. Saxena, N. Singh, P. J. Vlachostergios, S. Guo, K. Honoki, H. Fujii, A. G. Georgakilas, A. Bilsland, A. Amedei, E. Niccolai, A. Amin, S. S. Ashraf, C. S. Boosani, G. Guha, M. R. Ciriolo, K. Aquilano, S. Chen, S. I. Mohammed, A. S. Azmi, D. Bhakta, D. Halicka, W. N. Keith and S. Nowsheen (2015). "Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets." Semin Cancer Biol **35 Suppl**: S25-S54.

Fietz, S. A., I. Kelava, J. Vogt, M. Wilsch-Brauninger, D. Stenzel, J. L. Fish, D. Corbeil, A. Riehn, W. Distler, R. Nitsch and W. B. Huttner (2010). "OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling." Nat Neurosci **13**(6): 690-699.

Fish, J. L., Y. Kosodo, W. Enard, S. Paabo and W. B. Huttner (2006). "Aspm specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(27): 10438-10443.

Flora, A., T. J. Klisch, G. Schuster and H. Y. Zoghbi (2009). "Deletion of Atoh1 disrupts Sonic Hedgehog signaling in the developing cerebellum and prevents medulloblastoma." Science **326**(5958): 1424-1427.

Flora, A., T. J. Klisch, G. Schuster and H. Y. Zoghbi (2009). "Deletion of *Atoh1* disrupts Sonic Hedgehog signaling in the developing cerebellum and prevents medulloblastoma." Science **326**(5958): 1424-1427.

Forget, A., L. Bihannic, S. M. Cigna, C. Lefevre, M. Remke, M. Barnat, S. Dodier, H. Shirvani, A. Mercier, A. Mensah, M. Garcia, S. Humbert, M. D. Taylor, A. Lasorella and O. Ayrault (2014). "Shh signaling protects *Atoh1* from degradation mediated by the E3 ubiquitin ligase *Huwe1* in neural precursors." Dev Cell **29**(6): 649-661.

Foskolou, I. P., D. Stellas, I. Rozani, M. D. Lavigne and P. K. Politis (2013). "Prox1 suppresses the proliferation of neuroblastoma cells via a dual action in p27-Kip1 and Cdc25A." Oncogene **32**(8): 947-960.

Fu, M., C. Wang, Z. Li, T. Sakamaki and R. G. Pestell (2004). "Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions." Endocrinology **145**(12): 5439-5447.

Giacinti, C. and A. Giordano (2006). "RB and cell cycle progression." Oncogene **25**(38): 5220-5227.

Goodrich, L. V., L. Milenkovic, K. M. Higgins and M. P. Scott (1997). "Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants." Science **277**(5329): 1109-1113.

Han, Y. G., H. J. Kim, A. A. Dlugosz, D. W. Ellison, R. J. Gilbertson and A. Alvarez-Buylla (2009). "Dual and opposing roles of primary cilia in medulloblastoma development." Nat Med **15**(9): 1062-1065.

Harrison, P. W. and S. H. Montgomery (2017). "Genetics of Cerebellar and Neocortical Expansion in Anthropoid Primates: A Comparative Approach." Brain Behav Evol **89**(4): 274-285.

He, X., M. N. Treacy, D. M. Simmons, H. A. Ingraham, L. W. Swanson and M. G. Rosenfeld (1989). "Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development." Nature **340** (6228): 35-41.

Helms, A. W., K. Gowan, A. Abney, T. Savage and J. E. Johnson (2001). "Overexpression of MATH1 disrupts the coordination of neural differentiation in cerebellum development." Mol Cell Neurosci **17**(4): 671-682.

Holubowska, A., C. Mukherjee, M. Vadhvani and J. Stegmuller (2014). "Genetic manipulation of cerebellar granule neurons in vitro and in vivo to study neuronal morphology and migration." J Vis Exp(85).

Homem, C. C., M. Repic and J. A. Knoblich (2015). "Proliferation control in neural stem and progenitor cells." Nat Rev Neurosci **16**(11): 647-659.

Hoshino, M., S. Nakamura, K. Mori, T. Kawauchi, M. Terao, Y. V. Nishimura, A. Fukuda, T. Fuse, N. Matsuo, M. Sone, M. Watanabe, H. Bito, T. Terashima, C. V. Wright, Y. Kawaguchi, K. Nakao and Y. Nabeshima (2005). "Ptfla, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum." Neuron **47**(2): 201-213.

Jahan, I., J. Kersigo, N. Pan and B. Fritsch (2010). "Neurod1 regulates survival and formation of connections in mouse ear and brain." Cell Tissue Res **341**(1): 95-110.

Kenney, A. M., M. D. Cole and D. H. Rowitch (2003). "Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors." Development **130**(1): 15-28.

Klisch, T. J., Y. Xi, A. Flora, L. Wang, W. Li and H. Y. Zoghbi (2011). "In vivo Atoh1 targetome reveals how a proneural transcription factor

regulates cerebellar development." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(8): 3288–3293.

Komuro, H. and E. Yacubova (2003). "Recent advances in cerebellar granule cell migration." Cell Mol Life Sci **60**(6): 1084–1098.

Konno, D., G. Shioi, A. Shitamukai, A. Mori, H. Kiyonari, T. Miyata and F. Matsuzaki (2008). "Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis." Nat Cell Biol **10**(1): 93–101.

Kool, M., D. T. Jones, N. Jager, P. A. Northcott, T. J. Pugh, V. Hovestadt, R. M. Piro, L. A. Esparza, S. L. Markant, M. Remke, T. Milde, F. Bourdeaut, M. Ryzhova, D. Sturm, E. Pfaff, S. Stark, S. Hutter, H. Seker-Cin, P. Johann, S. Bender, C. Schmidt, T. Rausch, D. Shih, J. Reimand, L. Sieber, A. Wittmann, L. Linke, H. Witt, U. D. Weber, M. Zapatka, R. Konig, R. Beroukhim, G. Bergthold, P. van Sluis, R. Volckmann, J. Koster, R. Versteeg, S. Schmidt, S. Wolf, C. Lawrenz, C. C. Bartholomae, C. von Kalle, A. Unterberg, C. Herold-Mende, S. Hofer, A. E. Kulozik, A. von Deimling, W. Scheurlen, J. Felsberg, G. Reifenberger, M. Hasselblatt, J. R. Crawford, G. A. Grant, N. Jabado, A. Perry, C. Cowdrey, S. Croul, G. Zadeh, J. O. Korbel, F. Doz, O. Delattre, G. D. Bader, M. G. McCabe, V. P. Collins, M. W. Kieran, Y. J. Cho, S. L. Pomeroy, O. Witt, B. Brors, M. D. Taylor, U. Schuller, A. Korshunov, R. Eils, R. J. Wechsler-Reya, P. Lichter, S. M. Pfister and I. P. T. Project (2014). "Genome sequencing of SHH medulloblastoma predicts genotype-related response to smoothed inhibition." Cancer Cell **25**(3): 393–405.

Kosodo, Y., K. Roper, W. Haubensak, A. M. Marzesco, D. Corbeil and W. B. Huttner (2004). "Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells." EMBO J **23**(11): 2314–2324.

Lange, C. and F. Calegari (2010). "Cdks and cyclins link G1 length and differentiation of embryonic, neural and hematopoietic stem cells." Cell Cycle **9**(10): 1893–1900.

Lange, C., W. B. Huttner and F. Calegari (2009). "Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors." Cell Stem Cell **5**(3): 320–331.

Lee, J. K., J. H. Cho, W. S. Hwang, Y. D. Lee, D. S. Reu and H. Suh-Kim (2000). "Expression of neuroD/BETA2 in mitotic and postmitotic neuronal cells during the development of nervous system." Dev Dyn **217**(4): 361–367.

Leto, K., M. Arancillo, E. B. Becker, A. Buffo, C. Chiang, B. Ding, W. B. Dobyns, I. Dusart, P. Haldipur, M. E. Hatten, M. Hoshino, A. L. Joyner, M. Kano, D. L. Kilpatrick, N. Koibuchi, S. Marino, S. Martinez, K. J. Millen, T. O. Millner, T. Miyata, E. Parmigiani, K. Schilling, G. Sekerkova, R. V. Sillitoe, C. Sotelo, N. Uesaka, A. Wefers, R. J. Wingate and R. Hawkes (2016). "Consensus Paper: Cerebellar Development." Cerebellum **15**(6): 789–828.

Lewis, P. M., A. Gritli-Linde, R. Smeyne, A. Kottmann and A. P. McMahon (2004). "Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum." Dev Biol **270**(2): 393–410.

Li, Z., C. Wang, X. Jiao, Y. Lu, M. Fu, A. A. Quong, C. Dye, J. Yang, M. Dai, X. Ju, X. Zhang, A. Li, P. Burbelo, E. R. Stanley and R. G. Pestell (2006). "Cyclin D1 regulates cellular migration through the inhibition of thrombospondin 1 and ROCK signaling." Mol Cell Biol **26**(11): 4240–4256.

Machold, R. and G. Fishell (2005). "Math1 is expressed in temporally discrete pools of cerebellar rhombic-lip neural progenitors." Neuron **48**(1): 17-24.

Manoranjan, B., C. Venugopal, N. McFarlane, B. W. Doble, S. E. Dunn, K. Scheinmann and S. K. Singh (2012). "Medulloblastoma stem cells: where development and cancer cross pathways." Pediatr Res **71**(4 Pt 2): 516-522.

Mathis, L., C. Bonnerot, L. Puellas and J. F. Nicolas (1997). "Retrospective clonal analysis of the cerebellum using genetic lacZ/lacZ mouse mosaics." Development **124**(20): 4089-4104.

Migheli, A., R. Piva, S. Casolino, C. Atzori, S. R. Dlouhy and B. Ghetti (1999). "A cell cycle alteration precedes apoptosis of granule cell precursors in the weaver mouse cerebellum." Am J Pathol **155**(2): 365-373.

Milosevic, A. and J. E. Goldman (2002). "Progenitors in the postnatal cerebellar white matter are antigenically heterogeneous." J Comp Neurol **452**(2): 192-203.

Ming, G. L. and H. Song (2011). "Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions." Neuron **70**(4): 687-702.
Pogoriler, J., K. Millen, M. Utset and W. Du (2006). "Loss of cyclin D1 impairs cerebellar development and suppresses medulloblastoma formation." Development **133**(19): 3929-3937.

Miyashita S, Adachi T, Yamashita M, Sota T and Hoshino M (2017).
" Dynamics of the cell division orientation of granule cell precursors during cerebellar development." Mech Dev **147**:1-7.

Miyata, T., T. Maeda and J. E. Lee (1999). "NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus."

Genes Dev **13**(13): 1647-1652.

Miyazawa, K., T. Himi, V. Garcia, H. Yamagishi, S. Sato and Y. Ishizaki (2000). "A role for p27/Kip1 in the control of cerebellar granule cell precursor proliferation." J Neurosci **20**(15): 5756-5763.

Northcott, P. A., A. Korshunov, H. Witt, T. Hielscher, C. G. Eberhart, S. Mack, E. Bouffet, S. C. Clifford, C. E. Hawkins, P. French, J. T. Rutka, S. Pfister and M. D. Taylor (2011). "Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants." J Clin Oncol **29**(11): 1408-1414.

Neganova, I. and M. Lako (2008). "G1 to S phase cell cycle transition in somatic and embryonic stem cells." J Anat **213**(1): 30-44.

Oliver, G., B. Sosa-Pineda, S. Geisendorf, E. P. Spana, C. Q. Doe and P. Gruss (1993). "Prox 1, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development." Mech Dev **44**(1): 3-16.

Pan, N., I. Jahan, J. E. Lee and B. Fritsch (2009). "Defects in the cerebella of conditional Neurod1 null mice correlate with effective Tg(Atoh1-cre) recombination and granule cell requirements for Neurod1 for differentiation." Cell Tissue Res **337**(3): 407-428.

Ramon y Cajal, S (1911). "Histologie du système nerveux de l' homme et des vertèbres"(transl, Azoulay L) Maloine, Paris.

Rimkus, T. K., R. L. Carpenter, S. Qasem, M. Chan and H. W. Lo (2016). "Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors." Cancers (Basel) **8**(2).

Roussel, M. F. and M. E. Hatten (2011). "Cerebellum development and medulloblastoma." Curr Top Dev Biol **94**: 235-282.

Schuller, U., V. M. Heine, J. Mao, A. T. Kho, A. K. Dillon, Y. G. Han, E. Huillard, T. Sun, A. H. Ligon, Y. Qian, Q. Ma, A. Alvarez-Buylla, A. P. McMahon, D. H. Rowitch and K. L. Ligon (2008). "Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma." Cancer Cell **14**(2): 123-134.

Seo, S., J. W. Lim, D. Yellajoshiyula, L. W. Chang and K. L. Kroll (2007). "Neurogenin and NeuroD direct transcriptional targets and their regulatory enhancers." EMBO J **26**(24): 5093-5108.

Stein, G. S. and J. B. Lian (1993). "Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype." Endocr Rev **14**(4): 424-442.

Sun, T. and R. F. Hevner (2014). "Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations." Nat Rev Neurosci **15**(4): 217-232.

Suryadinata, R., M. Sadowski and B. Sarcevic (2010). "Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates." Biosci Rep **30**(4): 243-255.

Taylor, M. D., P. A. Northcott, A. Korshunov, M. Remke, Y. J. Cho, S. C. Clifford, C. G. Eberhart, D. W. Parsons, S. Rutkowski, A. Gajjar, D. W. Ellison, P. Lichter, R. J. Gilbertson, S. L. Pomeroy, M. Kool and S. M. Pfister (2012). "Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus." Acta Neuropathol **123**(4): 465-472.

Takahashi, T., R. S. Nowakowski and V. S. Caviness, Jr. (1993). "Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical

proliferative zone of the fetal mouse." J Neurosci **13**(2): 820-833.

Takahashi, T., R. S. Nowakowski and V. S. Caviness, Jr. (1995). "The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall." J Neurosci **15**(9): 6046-6057.

Thompson, M. C., C. Fuller, T. L. Hogg, J. Dalton, D. Finkelstein, C. C. Lau, M. Chintagumpala, A. Adesina, D. M. Ashley, S. J. Kellie, M. D. Taylor, T. Curran, A. Gajjar and R. J. Gilbertson (2006). "Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations." J Clin Oncol **24**(12): 1924-1931.

Tiberi, L., J. Bonnefont, J. van den Ameele, S. D. Le Bon, A. Herpoel, A. Bilheu, B. W. Baron and P. Vanderhaeghen (2014). "A BCL6/BCOR/SIRT1 complex triggers neurogenesis and suppresses medulloblastoma by repressing Sonic Hedgehog signaling." Cancer Cell **26**(6): 797-812.

Toyoshima, H. and T. Hunter (1994). "p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21." Cell **78**(1): 67-74.

Umeshima, H., T. Hirano and M. Kengaku (2007). "Microtubule-based nuclear movement occurs independently of centrosome positioning in migrating neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(41): 16182-16187.

Varjosalo, M. and J. Taipale (2008). "Hedgehog: functions and mechanisms." Genes Dev **22**(18): 2454-2472.

Vazin, T. and W. J. Freed (2010). "Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review." Restor Neurol Neurosci **28**(4): 589-603.

Wallace, V. A. (1999). "Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates

granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum." Curr Biol **9**(8): 445-448.

Wang, L., S. Hou and Y. G. Han (2016). "Hedgehog signaling promotes basal progenitor expansion and the growth and folding of the neocortex." Nat Neurosci **19**(7): 888-896.

Wang, V. Y., M. F. Rose and H. Y. Zoghbi (2005). "Math1 expression redefines the rhombic lip derivatives and reveals novel lineages within the brainstem and cerebellum." Neuron **48**(1): 31-43.

Wechsler-Reya, R. J. and M. P. Scott (1999). "Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog." Neuron **22**(1): 103-114.

Wigle, J. T., K. Chowdhury, P. Gruss and G. Oliver (1999). "Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation." Nat Genet **21**(3): 318-322.

Wilcock, A. C., J. R. Swedlow and K. G. Storey (2007). "Mitotic spindle orientation distinguishes stem cell and terminal modes of neuron production in the early spinal cord." Development **134**(10): 1943-1954.

Xenaki, D., I. B. Martin, L. Yoshida, K. Ohyama, G. Gennarini, M. Grumet, T. Sakurai and A. J. Furley (2011). "F3/contactin and TAG1 play antagonistic roles in the regulation of sonic hedgehog-induced cerebellar granule neuron progenitor proliferation." Development **138**(3): 519-529.

Yamada, M., Y. Seto, S. Taya, T. Owa, Y. U. Inoue, T. Inoue, Y. Kawaguchi, Y. Nabeshima and M. Hoshino (2014). "Specification of spatial identities of cerebellar neuron progenitors by *ptfla* and *atoh1* for proper production of GABAergic and glutamatergic neurons." J Neurosci **34**(14): 4786-4800.

Yang, Z. J., T. Ellis, S. L. Markant, T. A. Read, J. D. Kessler, M. Bourbonnas, U. Schuller, R. Machold, G. Fishell, D. H. Rowitch, B. J. Wainwright and

R. J. Wechsler-Reya (2008). "Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells." Cancer Cell **14**(2): 135-145.

Zhao, H., O. Ayrault, F. Zindy, J. H. Kim and M. F. Roussel (2008). "Post-transcriptional down-regulation of Atoh1/Math1 by bone morphogenic proteins suppresses medulloblastoma development." Genes Dev **22**(6): 722-727.

Zhong, W. and W. Chia (2008). "Neurogenesis and asymmetric cell division." Curr Opin Neurobiol **18**(1): 4-11.

謝辞

本研究を遂行し、本論文を執筆するにあたり、多くの方々に大変お世話になりました。この場をお借りして御礼を述べさせていただきます。

早稲田大学先進理工学研究科 電気・情報生命専攻 宗田孝之 教授には、寛大な御心で、研究開発法人国立精神神経医療研究センターで研究生として研究することをお許しいただき、また、学内から様々なサポートをしてくださり、言い尽くせないほど、お世話になりました。深く御礼を申し上げます。

早稲田大学先進理工学研究科 電気・情報生命専攻 柴田重信 教授と岡野俊行 教授には、博士学位審査にあたり、ご指導をして頂きました。深く御礼を申し上げます。

研究開発法人国立精神神経医療研究センター 神経研究所病態生化学研究部 星野 幹雄部長には、本研究を遂行する機会を与えていただき、学部生の頃よりご指導ご鞭撻を賜りました。どんな結果が出た時も議論に付き合ってください、研究の方向をお示しいただき、多くのことを学ばせていただきました。深く御礼を申し上げます。

同じく、研究開発法人国立精神神経医療研究センター 神経研究所病態生化学研究部 田谷 真一郎室長、堀 啓室長をはじめとした研究員のみなさま、先輩学生だったみなさま、事務員の皆様方には、研究だけではなく、日常生活においても、常に、励まし、支えていただきました。深く御礼を申し上げます。

京都大学 瀬戸 祐介博士には、本研究を始めた当初から、実験の技術や研究の進め方など、多くのご指導をして頂きました。本研究は、星野部長と瀬戸研究員のご指導があったからこそ遂行することができました。深く御礼を申し上げます。

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 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 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 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>

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</p> <p>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</p> <p>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</p> <p>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：包括脳ネットワーク冬のシンポジウム</p> <p>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</p> <p>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>

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/ Prox1 regulates differentiation of cerebellar granule cell precursors through suppression of CyclinD1. 発表：第40回神経科学大会 発表年月：2017年7月 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 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 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 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>