

小脳顆粒前駆細胞間における Notch シグナルの
機能解析

Notch signaling between cerebellar granule cell progenitors

2021 年 6 月

足立 透真
Toma ADACHI

小脳顆粒前駆細胞間における Notch シグナルの
機能解析

Notch signaling between cerebellar granule cell progenitors

2021 年 6 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
生命医科学専攻 神経生理学研究

足立 透真
Toma ADACHI

目次

目次	1
略語一覧	2-3
諸言	4-5
1. 序論	6-15
2. 実験材料および方法	16-26
3. 結果	27-50
4. 考察	51-58
5. 総括	59-61
謝辞	62
参考文献	63-69
研究業績	70-72

略語一覧

Ascl1: Achaete-Scute Family bHLH Transcription Factor 1

BGs: Bergmann glias, バーグマングリア

BMP: bone morphogenetic protein

cAMP: Cyclic adenosine monophosphate, 環状アデノシンーリン酸

DEG: Differential expressed genes, 発現遺伝子変動

EGL: external granule cell layer, 外顆粒細胞層

GCS: granule cells, 小脳顆粒細胞

GCPs: granule cell progenitors, 小脳顆粒細胞前駆細胞

GO: gene ontology

GSEA: Gene set enrichment analysis

iEGL: inner external granule cell layer, 内側外顆粒細胞層

IGL: internal granule cell layer, 内顆粒細胞層

KD: Knockdown, ノックダウン

KO: Knockout, ノックアウト

ML: molecular layer, 分子層

Ngn2: Neurogenin2

NICD: Notch intracellular domain

NPCs: neural progenitor cells, 神経前駆細胞

N.S.;, Not significant

OE: over-expression, 過剰発現

oEGL: outer external granule cell layer, 外側外顆粒細胞層

PCs: Purkinje Cells, プルキンエ細胞

PFA: Paraformaldehyde, パラホルムアルデヒド

PKA: protein kinase A, プロテインキナーゼ A

PTCH1: Patched1

Px: Postnatal day x, 生後 x 日齢

RL: Rhombic lip, 菱脳唇

Scramble: scrambled shRNA

scRNA-seq: single cell RNA-seq, シングルセル RNA-seq

SHH: sonic hedgehog

SMO: Smoothened

UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection

VZ: Ventricular zone, 脳室帯

0.2% PBST: 0.2% triton in 1xPBS

諸言

哺乳類の小脳顆粒細胞(**granule cells, GCs**)は、全神経細胞のうち 50%以上の数を占める細胞であり、適切な協調運動の実行とその学習のみならず、認知や情動、言語機能などの高次機能も司っていることが知られる重要な細胞である。GCs の発生において、前駆細胞である小脳顆粒細胞前駆細胞(**granule cell progenitors, GCPs**)は、分裂する際に GCs だけでなく、未分化な GCPs も生み出すことが知られているが、一様な細胞集団である GCPs から、異なる分化状態の娘細胞が生み分けられるその制御機構に関しては、未だに未解明な点が多い。本研究において私は、一様とされていた GCPs が、Notch シグナルの有無によって、異なるサブグループを形成することを示した。

私はまず、GCPs において、Notch 関連遺伝子のうち、Notch レセプターである *Notch1*、*2*、Notch リガンドである *Jag1*、そしてレセプターの下流でエフェクターとして働く転写因子 *Hes1* が強く発現していることを示した。次に、私は、*Hes1* プロモーター活性を *in vivo* でモニターすることによって、外顆粒細胞層(**external granule cell layer, EGL**)の GCPs が、Notch シグナルが ON である細胞と OFF である細胞の二群に分けられることを発見した。そして、single cell RNA sequencing と、*in silico* の解析によって、シグナルが ON の細胞はより未分化性と分裂能が高く、OFF の細胞が逆に、分化傾向のある細胞集団であることを示した。さらに *In vivo* 電気穿孔法を用いた遺伝子過剰発現、発現抑制実験によって、NOTCH2 と HES1 が転写因子 NEUROD1 の発現を抑制することで、cell-autonomous に GCPs の分化を抑制していることを見出した。逆に JAG1 は、GCPs において発現すること

で、non-cell-autonomous に周辺の GCPs における NOTCH2-HES1 経路を活性化させ、結果的に周辺細胞の未分化性を上昇させることがわかった。これらの発見は、Notch シグナルが、一様と思われていた GCPs の中に、未分化な GCPs と分化傾向にある GCPs という異なる二つのタイプの細胞を作り出し、GCs への適切な分化の制御に貢献しているシグナル経路であることを示したものであると考える。

1. 序論

1.1 Notch シグナルについて

Notch シグナルは、脊椎、無脊椎を問わず、細胞分化・形態形成といった個体発生を担う最も重要なシグナル経路の一つである(Tsakonas et al., 1999; Andersson et al., 2011)。一般的には、Notch リガンドを膜に提示した“signal-sending cell”と、Notch レセプターを膜に提示した“signal-receiving cell”間における隣接した二細胞間シグナルとして知られている(Tsakonas et al., 1999; Andersson et al., 2011)。Notch シグナルは、リガンドとレセプターが結合することで始まり、レセプターの細胞内ドメインが切断され核内に移行し、Hes や Hey ファミリーといった転写因子の発現を上昇させ、その結果、“signal-receiving cell”を隣接する細胞と異なる運命をたどる細胞へと変質させることがわかっている(Fig. 1, Tsakonas et al., 1999; Andersson et al., 2011)。

Notch シグナルを構成する遺伝子群は、Campos-Ortega らのグループによるショウジョウバエを用いた遺伝子スクリーニング実験によって発見された(Lehmann et al., 1983)。彼らは、*Notch*、*Delta*、*Mastermind*、*Enhancer of Split*などの遺伝子群を同定し、それらの遺伝子群がショウジョウバエの胎生期の発生において、同一の細胞集団を異なる運命に誘導する機能を持つことを示した(Tsakonas et al., 1999; Lehmann et al., 1983)。後に、それらの遺伝子が Notch シグナルを構成する因子であることが判明し、更に脊椎動物においても、*Notch1-4*、*Dll1,2,4*、*Jag1,2*、*Maml1,2,3*、*Hes1-7*、*Hey1,2*などのオルソログとなる遺伝子群が同定された(Andersson et al., 2011; Kageyama et al., 2007)。Notch シグナル関

連遺伝子は脊椎動物の発生においても、神経系を含む多くの組織において、適切な細胞運命の決定を担っていることがわかっており (Louvi et al., 2006)、例えば、哺乳類の大脳皮質の発生においては、放射状グリアからの神経細胞と神経前駆細胞の産み分けにおいて、HES1 を介した Notch シグナルが重要な役割を担うことが既に知られている (Shitamukai et al., 2011)。このように、これまでの研究から、Notch シグナルの重要な働きの一つは、単一の細胞集団から異なる性質の細胞を産み分けることであると考えられている。

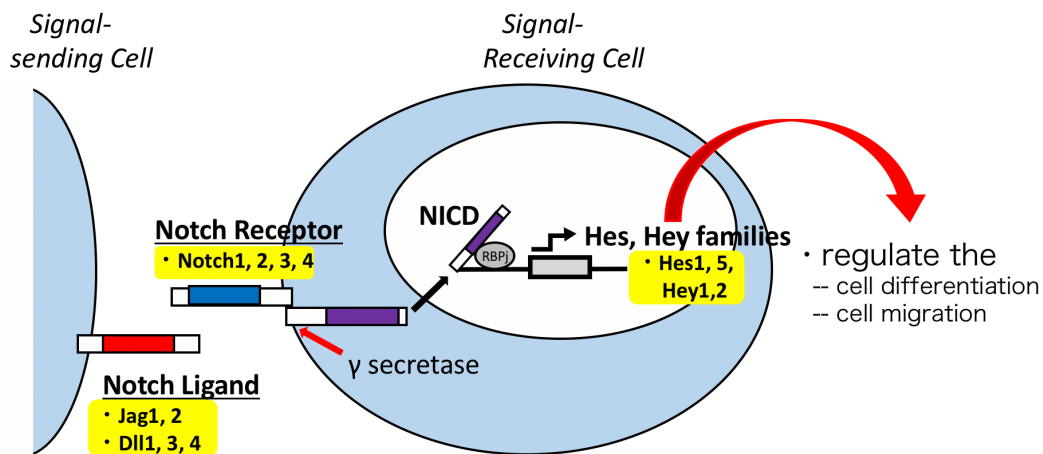


Fig. 1. 一般的な Notch シグナルのモデル図

一般的に Notch シグナルは二細胞間シグナルであり、隣接する細胞に異なる刺激を導入するシグナルとして知られている。“signal-sending cell”が膜に提示した Notch リガンドと、“signal-receiving cell”が膜に提示した Notch レセプターが結合することでシグナルが始まり、レセプターの細胞内ドメインが切断され核内に移行し、Hes や Hey ファミリーといった転写因子の発現を上昇させる。Notch シグナルの刺激が入った細胞は、細胞分化や移動が抑制され、未分化性の高い性質を持つことが多いことが知られている。

1.2 小脳顆粒細胞の発生について

小脳顆粒細胞(Granule cells, GCs)は哺乳類の中樞神経系における全神経細胞の 50%以上を占める興奮性の神経細胞であり (Williams et al., 1988)、小脳に由来する協調運動、運動学

習、情動や言語能力の適切な調整において、重要な役割を担っていることが知られている (Lackey et al., 2018)。小脳顆粒細胞前駆細胞(Granule cell progenitors, GCPs)は GCs を生み出す細胞であり、マウスにおいては胎生 10 日目から 16 日目にかけて、脳室帯に隣接する菱脳唇から生み出される (Fig. 2, Leto et al., 2016)。GCPs はその後小脳の最表層に移動し、胎生 17 日目から生後 15 日目の間には外側外顆粒細胞層(outer external granule cell layer, oEGL)を形成し、分裂によってその数を爆発的に増やすことが知られている (Fig. 2, Chizhikov et al., 2003)。また、oEGL における分裂時には、GCPs と GCs、二つの異なる状態の細胞を生み出すことがわかっており (Yang et al., 2015)、その分裂後の娘細胞の運命は、GCPs が分裂する方向と相関があることはわかってきているが (Yang et al., 2015, Haldipur et al., 2015, Miyashita et al., 2017)、制御機構に関しては、未だ未解明な点が多い。GCs へと分化した細胞は、その後内側外顆粒細胞層(inner external granule cell layer, iEGL)へと落ち込み、層構造に対して垂直に分子層(molecular layer, ML)を縦断した後、内顆粒細胞層(internal granule cell layer, IGL)において成熟した GCs になることが知られている (Fig. 2, Schilling et al., 2018)。GCPs と GCs の産み出しのバランスは厳密に制御されており、その制御機構の破綻は小脳形成不全や GCPs から形成される腫瘍である SHH 型の髄芽腫の発生を引き起こすことがわかっている (Basson et al., 2013, Goodrich et al., 1997)。

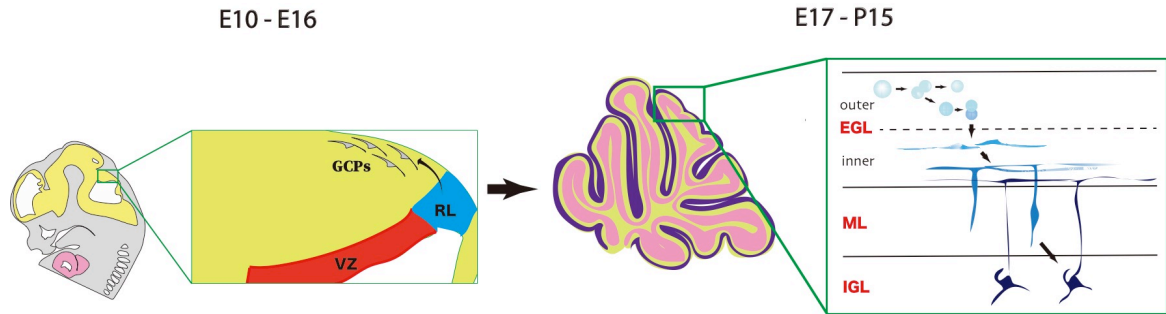


Fig. 2. マウス小脳における GC lineage の発生

マウスにおいては、GCPs は胎生 10 日目から 16 日目にかけて、脳室帯 (Ventricular zone, VZ) に隣接する菱脳唇 (Rhombic lip, RL) から生み出される。GCPs はその後小脳の最表層に移動し、胎生 17 日目から生後 15 日目の間には oEGL を形成し、分裂によってその数を増やす。oEGL で一定回数分裂した GCPs は GCs へと分化し、同時に iEGL へと落ち込む。その後、垂直に ML を縦断した後、IGL において、成熟した GCs になる。生後 15 日ごろには EGL を構成する全ての GCPs は GCs へと分化し、成熟した小脳では EGL は存在しない。

1.3 小脳顆粒細胞の分化を制御するシグナル機構について

GCs は小脳に由来する重要な脳機能を複数担う細胞であり、その発生は様々なシグナル経路によって厳密に制御されている (Klein et al., 2001, Rios et al., 2004, Wang et al., 2019)。本項においてはその中でも GCPs の発生における重要な制御因子として知られる sonic hedgehog (SHH) シグナル、bone morphogenetic protein (BMP) シグナル、WNT シグナル、SDF-1/CXCR4 シグナルについて説明する。

SHH シグナルは小脳発生のパターン形成におけるマスターレギュレーターの一つであり、GCPs の発生においても最も重要な調節因子であると考えられている (Dahmane et al., 1999, Anna et al., 2003)。小脳において、分泌因子 SHH タンパク質は ML と IGL の境界面に一列に並ぶプルキンエ細胞 (Purkinje cell, PC) から分泌されており、oEGL における GCPs

の分裂を制御していると言われている(Lewis et al., 2004)。GCPs の膜上には、膜貫通型受容体 Patched1(PTCH1)が SHH シグナルのエフェクターである膜貫通型 G タンパク質共役型受容体 Smoothed(SMO)と結合する形で局在している。PTCH1 に SHH が結合すると、PTCH1 による SMO の抑制が解除され、転写因子 GLI1,2 が活性化される。活性化した GLI1,2 は核内に移行し、*CyclinD1* や *N-Myc* の転写を活性化させることが知られている(Kenney et al., 2003)。CYCLIND1 は細胞周期の G1 期から S 期への遷移を担う Cyclin ファミリーの一つであり、N-MYC は多くの増殖遺伝子の発現を活性化させる bHLH 型転写因子である(Kenney et al., 2003, Hatton et al., 2006)。以上のように、SHH シグナルは GCPs の未分化性、分裂能を維持する上で、重要なシグナル系であることが知られている。

BMP シグナルもまた、GCPs の分化を制御する重要なシグナル系であると言われている(Rios et al., 2004, Zhao et al., 2008)。発生期の小脳においては、リガンドである BMP は 7 が PC から、2 と 4 が iEGL と IGL の GCs から分泌されている(Rios et al., 2004)。BMP2 と 4 は特に GCPs の分化制御に関与していると言われており、BMP2 は BMP シグナルのエフェクター-SMAD5 の活性化を介して、SHH シグナル関連タンパク質の発現を抑制する機能を持つことが知られている(Rios et al., 2004)。また、BMP2 と 4 は、GCPs の未分化性を保つ転写因子である ATOH1 のタンパク質分解を促進し、GCs への適切な分化を誘導する(Zhao et al., 2008)。BMP シグナルのエフェクターである SMAD の発現は、マウス生後の GC lineage において普遍的に発現している転写因子 MEIS1、PAX6 によって制御されていることもわかっており(Owa et al., 2018)、BMP による GC lineage の発生制御機構は、

SHH シグナルと異なり、GC lineage 自身による内在性の分化調節機構であると考えられる。

WNT シグナルは、多くの神経系の幹細胞、前駆細胞における未分化性と分裂能の維持への寄与が報告されているシグナル経路であるが(Chenn et al., 2002, Woodhead et al., 2006, Herrera et al., 2014)、哺乳類の生後 GCPs の未分化性と分裂能の維持という点では、むしろ抑制的な機能を持つことが知られている(Lorenz et al., 2011, Moreno et al., 2014, Anne et al., 2013, Yang et al., 2019)。Canonical な WNT シグナル経路の下流である Beta-catenin の常時活性化型を小脳 GCPs 特異的に発現させた場合や、Beta-catenin の分解に重要な *Apc* の発現を抑制することで WNT シグナルの canonical 経路を活性化させた場合、マウスの小脳は小さくなり、生後発生期には EGL が薄く、GCPs、GCs の数が著しく減少することが知られている(Lorenz et al., 2011, Yang et al., 2019)。また、WNT シグナルのリガンドである WNT3 を GCP culture に加えた場合、non-canonical な WNT シグナルの下流である ERK1/2 の活性化が進み、GCPs の分化誘導が起こることもわかっている(Anne et al., 2013)。この分化誘導は、*Ptch1*、*Gli1,2* などの SHH シグナル関連遺伝子に加えて、GCPs の未分化性の維持に重要な転写因子 *Atoh1* の発現量が減少した結果生じるものだと考えられており、BMP シグナル非依存的なシグナル系であることがわかっている(Anne et al., 2013)。このように、GCPs の分裂、分化のバランスにおいては、分化を誘導する機能に注目が集まっている WNT シグナルではあるが、Beta-catenin の発現が、小脳 GCPs においては SHH シグナルの下流で N-MYC を介して制御されており、GCPs の分裂能の維持に重要であるという報告もある(Mani et al., 2020)。生後小脳において、WNT リガンドがどの細胞から分泌されて

いるかという明確な報告もなく、WNT シグナルによる GCPs の分化状態への制御機構に関しては、より詳細な解析が待たれている現状である。

小脳 GCPs における SDF-1/CXCR4 シグナルは、小脳表面を覆う脳軟膜から放出されるケモカイン、SDF-1(CXCL12)による GCPs の制御機構である(McGrath et al., 1999)。脳軟膜から放出される SDF-1 と、GCPs において発現する SDF-1 の受容体である CXCR4 の発現が、GCPs の未分化性を保つ上で重要であることは既に 1990 年代から知られている(Ma et al., 1998; Zou et al., 1998)。環状アデノシンリン酸(cAMP)とその下流のプロテインキナーゼ A(PKA)は GCPs において SHH シグナルを抑制させる機能が知られているが(Hynes et al., 1995; Concordet et al., 1996; Epstein et al., 1996; Ungar and Moon, 1996)、SDF-1a を受容した CXCR4 は、GCPs 内で Gai を活性化させ、cAMP の働きを抑制することで、結果的に SHH シグナル依存的な GCPs の分裂能を亢進させていると考えられている(Klein et al., 2001)

1.4 小脳顆粒細胞の発生における Notch シグナルによる制御機構について

これまでの先行研究から、Notch 関連遺伝子、タンパク質が小脳 GC lineage において発現していることは既に示唆されていた(Tanaka et al., 1999; Irvin et al., 2001; Solecki et al., 2001; Stump et al., 2002; Irvin et al., 2004; Eiraku et al., 2005; Tanaka et al., 2003)。加えて、Solecki らのグループは NOTCH2 と HES1 の過剰発現によって、GCPs の突起伸長が抑制され、分化が阻害されることを GCPs 培養実験(*in vitro*)と小脳切片培養実験(*ex vivo*)に

よって示している(Solecki et al., 2001)。しかしながら、これらの結果は、培養条件下における過剰発現実験であり、内在性の Notch 関連遺伝子、タンパク質の機能を示したものはなかった。また、複数の先行研究において、GCPs で Notch 関連遺伝子をノックアウト(Knockout, KO)したマウスを用いた実験が行われてきた(Eiraku et al., 2005, Weller et al., 2006)。Eiraku らのグループは Notch シグナルの non-canonical リガンドである *Dner* を conventional KO したマウスを用いて解析を行い、GCPs の分化と移動が遅延することを発見した(Eiraku et al., 2005)。Weller らのグループは *En2-Cre; Jag1-flox* マウスを用いて小脳全体で *Jag1* を欠失させた結果、Eiraku らの研究と同様に、GCPs の分化と移動が遅延することを確認した(Weller et al., 2006)。これらの結果は、小脳組織における Notch リガンドが、GCPs の分化状態に影響を及ぼすことを示唆する重要な知見であるが、小脳 GCPs 特異的に Notch 関連遺伝子を KO したマウスを用いた実験ではなかった為、得られた表現型が GCPs 由来の Notch 関連遺伝子が欠失した結果なのか、それともそれ以外の細胞の Notch 関連遺伝子が欠失した結果なのかどうか、判別することができなかった。特に、どちらのマウスにおいても、GCs の移動の際に足場として働くことが知られているバグマングリア(Bergmann glias, BGs)の異所性、形態の乱れが確認されていた為、GCPs の分化異常が BG の突起形成異常によって、二次的に引き起こされたものである可能性も、十分に考えられる結果であった。(Eiraku et al., 2005, Weller et al., 2006)

1.5 総括

前述の通り、これまでなされたいくつかの研究により、Notch シグナルが GCPs の分化を制御する因子として働いていることが示唆されている (Solecki et al., 2001, Eiraku et al., 2005, Weller et al., 2006)。しかしながら、内在性の Notch シグナルが GCPs において機能しているかどうかを *in vivo* で観察した研究は存在せず、更に Notch シグナルによる GCPs の分化制御機構が存在するとしても、その制御機構が GCPs 同士においてなされるものなのか、GCPs とその他の細胞の間でなされるものなのかどうかということに関してなどの詳細はわかっていなかった。私は、これまで知られている SHH、BMP、WNT、SDF-1/CXCR4 などのシグナル系と同様に、Notch シグナルもまた、GCPs の発生の制御における重要な因子なのではないかと考え、研究を行なった。

本研究において、私はまず、未分化な GCPs と分化した GCs、それぞれの細胞にどの Notch シグナル関連遺伝子が発現しているかの詳細を解析した。次に、私はマウス小脳 GCPs における *Hes1* プロモーターの活性を可視化する技術と、単離した GCPs を single cell RNA seq 解析によって詳細に解析する技術を用いて、単一と思われていた oEGL の GCPs が、Notch シグナルが ON であるか OFF であるかという性質において、二つの細胞集団に分けることができるということを、*in vivo* と *in silico* の二つの側面から示した。更に私は、Notch-ON GCPs がより未分化で増殖性に富み、Notch-OFF GCPs がより増殖性が低く、分化に近い細胞集団であることを示し、GCPs 間において、Notch リガンドである JAG1 と Notch レセプターである NOTCH2 を介した Notch シグナルが存在することを示した。最後に、私は NOTCH2 の下流で活性化が確認された転写因子 HES1 によって、GCs の分

化を担う重要な転写因子である **NEUROD1** の発現が抑制されることを示し、**Notch** シグナルが小脳 **GC lineage** の分化度合いの制御において、重要な役割を持つことを示した。本研究は **GC lineage** の発生において、**Notch** シグナルが担う新たな制御機構を明らかにした仕事であり、小脳発生のみならず、その発生が乱れた結果生じる小脳疾患の原因解明においても、重要な示唆を与える仕事であると考えている。

2. 実験材料及び方法

2.1 実験動物

全てのマウス実験は国立精神・神経医療研究センターの動物倫理委員会の承認を受けて行われている。また、全てのマウス実験は、日本 SLC 社より購入した ICR マウスの新生児を利用して行なった。実験前後においてマウスは 12 時間の明暗サイクルのある SPF 環境下において飼育し、餌と水を自由に摂取させた。

2.2 小脳顆粒細胞初代培養と回収

P6 の ICR マウスから小脳を単離し、脳軟膜を切除したあと、trypsin/Dnase 溶液によって細
胞接着をほぐした(5min, 37°C)。Trypsin/DNase 溶液を取り除き、Dnase 溶液を加え、
ピペッティングによって細胞を分散した。その後、二つの濃度の異なる Percoll 溶液を用いて細胞比重により GCPs を単離し、35 mm 培養皿にて pre-culture を行なった。30 分後、培養皿に接着している繊維芽細胞を剥がさないように GCPs を回収し、Poly-D-Lysin と Matrigel によって表面をコートしておいた 35 mm 培養皿に GCPs を 5×10^6 個撒く。この際に、半数の培養皿には SAG を 200 nM の濃度となるように添加する。小脳顆粒細胞培養用の培地としては 0.5 ml 100xPen/Strep、0.5 ml 100xGlutamine、0.5 ml D⁺-Glucose solution 45%、0.5 ml 100xSPITE、0.5 ml 100xOleic Acid Albumin/Linoleic Acid、1 ml 50xB27、50 ul 1000x N-Acetyl Cysteine を加えた Neural basal (basic) 50 ml を用いた。48 時間後に

trypsin/Dnase で細胞を培養皿から剥がし、Ovomocoid solution によって trypsin を不活性化、SAG-と+に分けて回収した。

2.3 定量 PCR

定量 PCR は SAG の有無によって二つの条件で 2 日間小脳顆粒細胞初代培養したサンプルを回収して行なった。RNAeasy plus Kit (QIAGEN)を用いて RNA extraction を行い、Superscript II kit (Invitrogen)を用いて cDNA への逆転写を行なった。qPCR の内在性コントロールとしては、*Hrpt1*、*Rpl27*、*Rer1* の三つの遺伝子の発現の平均を用いた(Thomas et al., 2014)。qPCR には、

Hrpt1: CAAACTTTGCTTTCCCTGGT and TCTGGCCTGTATCCAACACTTC,

Rpl27: AAGCCGTCATCGTGAAGAACA and CTTGATCTTGGATCGCTTGGC,

Rer1: GCCTTGGGAATTTACCACCT and CTTCGAATGAAGGGACGAAA,

Ccnd2: GAGAAGCTGCCCTGATCCGCA and CTTCCAGTTGCAATCATCATCGACG,

Notch1: GCTGCCTCTTTGATGGCTTCGA and CACATTCGGCACTGTTACAGCC,

Notch2: CCACCTGCAATGACTTCATCGG and TCGATGCAGGTGCCTCCATTCT,

Notch3: GGTAGTCACTGTGAACACGAGG and CAACTGTCACCAGCATAGCCAG,

Notch4: GGAGATGTGGATGAGTGTCTGG and TGGCTCTGACAGAGGTCCATCT,

Hes1: GGAAATGACTGTGAAGCACCTCC and GAAGCGGGTCACCTCGTTCATG,

Hes5: CCGTCAGCTACCTGAAACACAG and GGTCAGGAACTGTACCGCCTC,

Jag1: TGCGTGGTCAATGGAGACTCCT and TCGCACCGATAACCAGTTGTCTC,

Jag2: CGCTGCTATGACCTGGTCAATG and TGTAGGCGTCACACTGGAAGCTC,

Dll1: GCTGGAAGTAGATGAGTGTGCTC and CACAGACCTTGCCATAGAAGCC,

Dll3: CCAGCACTGGATGCCTTTTACC and ACCTCACATCGAAGCCCGTAGA,

Dll4: GGGTCCAGTTATGCCTGCGAAT and TTCGGCTTGGACCTCTGTTTCAG.

をプライマーとして使用した。

2.4 プラスミド

HES1、HES5、JAG1、NEUROD1 発現ベクターは、pCAGGS ベクター(GE Healthcare)に挿入する形で作製した。それぞれの遺伝子のコーディング領域を E18.5 のマウス小脳由来の cDNA から PCR で増幅し、Endo Free plasmid purification kit(Qiagen)を用いて精製した後、制限酵素(EcoRI、NotI)で切断した pCAGGS ベクターと、Ligation Mix(Takara)を用いてライゲーションを行なった。ライゲーション後産物の増幅は、E.coli DH5 α コンピテントセル(Takara)を用いて行なった。それぞれの配列を増幅するために PCR に使用したプライマーは以下の通りである。

HES1: 5'-ATGCCAGCTGATATAATGG-3' and 5'-TCATCCTCTGGTCCGCT-3',

HES5: 5'-ATGGCCCCAAGTACCGT-3' and 5'-TCATCCTCTGGTCCGCT-3',

JAG1: 5'-TCCACGGAGTATATTAGAGCC-3', 5'-GCTAGCACACTCATCGATG-3',

5'-AACCCCTGCTTGAATGGG-3'and 5'-CTATACGATGTATTCCATCCGGTT-3',

NEUROD1: 5'-ATGACCAAATCATACAGCGA -3' and 5'-CTAATCGTGAAAGATGGCAT -3'

また、*Notch1*、*2*、*Hes1*、*5*、*Jag1*、*NeuroD1*用の sh ベクターは、mU6 pro ベクターに二本鎖オリゴヌクレオチドを挿入することで作製した。全ての標的配列は siDirect 2.0 (Naito et al., 2009)を用いてデザインした。全てのオリゴヌクレオチド配列には 9 塩基のヘアピン構造 (5' -TTCAAGAGA-3')を挿入した。オリゴヌクレオチド配列を制限酵素(BbsI、XbaI)で処理した後、mU6 pro ベクターと Ligation Mix (Takara)を用いてライゲーションを行なった。ライゲーション後産物の増幅は、*E.coli* DH5 α コンピテントセル(Takara)を用いて行なった。それぞれの KD ベクターを作製するための標的配列としては以下の配列を使用した。

Notch1:

#1 5'-AAGGTGTATACTGTGAAATCAAC-3',

#2 5'-CTGTAACAGTGCCGAATGTGAGT-3',

Notch2:

#1 5'-AGGCCTTAATTGTGAAATTAATT-3',

#2 5'-GAGGTGATAGGCTCTAAGATATT-3',

Hes1:

#1 5'-GAGGCGAAGGGCAAGAATAAATG-3',

#2 5'-TTGGATGCACTTAAGAAAGATAG-3',

Hes5:

#1 5'-CCGCATCAACAGCAGCATAGAGC-3',

#2 5'-CCGTCAGCTACCTGAAACACAGC-3',

NeuroD1:

#1 5'-GCCTAGAACGTTTTAAATTAAGG-3',

#2 5'-TGGCAACTTCTCTTTCAAACACG-3'

また、コントロール scramble 配列としては、以下のものを使用した。

control scrambled sequence (sh-scramble):

5' -TACGCGCATAAGATTAGGG-3'

pCAG-H2B-GFP ベクターと pCAG-mCherry ベクターは、Dr. N. Masuyama から頂いた。

pHes1-d2GFP ベクター、pHes5-d2GFP ベクター、そして、Hes1p-venus ベクターは、Dr.

R. Kageyama から頂いた (Ohtsuka et al., 2006; Kohyama et al., 2005) 。 pCAG-H2B-BFP

(pTagBFP-H2B) は、evrogen (Cat. #FP176)から購入した。Hes1 と Hes5 の cDNA を pEGFP-

N3 ベクターに挿入することで、HES1-fusion-GFP ベクターと、 HES5-fusion-GFP ベクタ

ーを作製した。

2.5 免疫染色と抗体

新生児マウスの小脳を 4%パラホルムアルデヒド(PFA)で固定し、O.C.T compound (Sakura Finetek)で包埋した。凍結した小脳組織は、クライオスタッド(CM3050 S; Leica)を用いて厚さ 18 μm の切片になるように矢状面に切断した。切片を 1% normal donkey serum containing 0.2% PBST(0.2% triton in 1xPBS, blocking 溶液)を用いて室温で 1 時間ブロッキングし、その後一次抗体を加えた blocking 溶液の中に、4 度環境下で 16 時間放置した。使用した一次抗体一覧は以下の通りである。

goat anti-Notch1 (1:500; sc-6015; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX),

goat anti-Notch2 (1:500; sc-7423; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX),

rabbit anti-Jagged1 (1:500; ab7771; Abcam, Cambridge, UK),

chicken anti-GFP (1:1000; GFP-1010; aves, Tigard, OR),

rabbit anti-RFP (1:500; PM005; MBL, Woburn, MA; RFP 抗体は pCAG-mCherry ベクターのシグナル(Fig. 4, 5, 9)を増幅するために用いた。),

rabbit anti-Atoh1 (1:200; (Yamada et al., 2014)),

rat anti-Ki67 (1:500; 14-5698-82; eBioscience, San Diego, CA),

rabbit anti-Pax6 (1:500; PRB-278P; BioLegend, San Diego, CA),

goat anti-NeuroD (N-19; 1:200; sc-1084; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX).

16 時間後、切片を乗せたスライドは PBS によって洗浄され、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 568、または、Alexa Fluor 647 (1:400; Abcam, Cambridge, UK)が接続された二次抗体と、DAPI (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Invitrogen)を加えた blocking 溶液の中で 2 時間、室温で培養した。2 時間

後、スライドを再び PBS で洗浄し、Permafluor を用いて封入を行なった。

2.6 *In vivo* 電気穿孔法

導入する遺伝子溶液は、発現ベクター: 1 ug/ul、shRNA: 2 ug/ul、蛍光タンパク質: 0.5 ug/ul の濃度となるように、それぞれのプラスミドを蒸留水に溶かして調整した。p*Hes1*-d2GFP、p*Hes5*-d2GFP、*Hes1*p-venus ベクターは、1 ug/ul の濃度となるように蒸留水に溶かした。可視化するために、溶液には Fastgreen を添加した。遺伝子導入時には、P5 か P6 の新生児マウスを氷冷によって麻酔し、小脳頭蓋骨下に、10 ul の溶液を注入した。その後、電気パルス(50 msec duration, 80 V, 7 times, 150 ms interval each)を顎から小脳の向きに電流が流れるように、forceps-type electrodes (NEPA gene)を用いて流した。遺伝子導入後の新生児マウスは、回復するまで 10 分程度 37°Cのホットプレートで休ませ、その後、ケージに戻した。この電気穿孔法による小脳 GCPs への遺伝子導入方法は、既に先行研究で確立されている技術である(Owa et al., 2018)。遺伝子導入された新生児マウスの小脳は、数日後に 4%PFA によって包埋した。遺伝子導入を二度行なった実験(Fig. 9A-C)では、一度目の遺伝子導入後新生児マウスを一旦ケージに戻し、6 時間後に、再び電気穿孔法による遺伝子導入を行なった。Fig. 9D-F の実験では、電気穿孔法による遺伝子導入の後、速やかに EdU 溶液の腹腔注射を行なった。EdU は PBS に 10 mg/ml となるように溶解させ、新生児マウスの体重に対して、50 mg/kg となる量を投与した。

2.7 小脳切片培養とタイムラプス撮影

実験には P5 で小脳に *Hes1p-Venus* ベクターと pCAG-mCherry ベクターを遺伝子導入した個体を用いた。遺伝子導入の 24 時間後にマウスから小脳を摘出し、2%UltraPure LMP Agarose (Invitrogen) に包埋した。その後、包埋した小脳組織を厚さ 250 μm の切片となるように、矢状面に切断した。小脳切片は Millicell-CM (Millipore) 上に静置し、コラーゲンによって表面を覆い、culture medium (DMEM supplemented with 5% horse serum (Invitrogen), 5% FBS (Invitrogen), 10 ng/ml EGF (PeproTech), 10 ng/ml bFGF (PeproTech), 1x B27 (Invitrogen), 1x N2 (LifeTechnology), 3 mM L-glutamine) 上で培養した。小脳切片を 37°C 環境下で 6 時間培養し、その後共焦点顕微鏡 FV3000 (Olympus) を用いてタイムラプス撮影を行った。撮影を開始するタイミングで、培地に 1 μl の DMSO、または、gamma secretase inhibitor である RO4929097 (5 nM, 1 μl , Selleck) を加えた。タイムラプス撮影では 5 分ごとに一枚の画像を取得し、合計 8 時間 20 分の撮影を行った。

2.8 画像取得と定量化

全ての画像は共焦点顕微鏡 LSM780 (Carl Zeiss) と FV3000 (Olympus) を用いて、小脳虫部の IV/V 葉か VI 葉を撮影してきている。撮影した画像は ImageJ (RSB) を用いて解析した。GCPs 分化度合いの解析では ImageJ の “Cell counter in Plugins” を用いて細胞数をカウントした。解析には EGL、ML、IGL に存在する全ての GFP 陽性、mCherry 陽性、BFP 陽性細胞を含めた。NEUROD1 タンパク質量の定量 (Fig. 10) は、ImageJ の “Measures in Analyze”

を用いて、NEUROD1 抗体による免疫染色図の輝度を計測して行なった。コントロールとして、GFP 陽性細胞に隣接する GFP 陰性細胞の NEUROD1 輝度を計測した。

2.9 細胞培養とトランスフェクション

Neuro2a 細胞は ATCC から購入し、10%FBS、100 U/ml Penicillin-Streptomycin を加えた DMEM で培養を行なった。6well プレーットの 1well につき、 5×10^6 個の Neuro2a 細胞を蒔き、24 時間後に transfectin reagent (Bio-Rad) を用いて、トランスフェクションを行なった。

トランスフェクション時には発現ベクターを 1 ug/ul、KD ベクターを 2 ug/ul 加えた。

2.10 ウェスタンブロットティング

Neuro2a 細胞をトランスフェクション後 48 時間培養し、Bioruptor BR-II を用いて破碎した。その後、1%NP40 を含んだ Lysis buffer に溶解させ、SDS-PAGE によって大きさに応じてタンパク質を分離した。分離されたタンパク質を、PVDF メンブレンにトランスファーし、一次抗体を加え 4°C 環境下で 16 時間放置した。使用した一次抗体一覧は以下の通りである。

rabbit anti- β -actin (1:1000; MBL, Woburn, MA),

rabbit anti-GFP (1:2000; MBL-598; MBL, Woburn, MA),

rabbit anti-Jagged1 (1:1000; ab7771; Abcam, Cambridge, UK)

16 時間後、二次抗体を加えた blocking 溶液の中で 1 時間培養し、HRP 基質(Millipore)を加

え、5分後に LAS4000(Fujifilm)を用いて免疫シグナルを検出した。定量化に際しては、全てのタンパク質発現量は、 β -actin の発現量によって正規化した。

2.11 Smart-seq 法によるシングルセル RNAseq

P7 のマウス小脳顆粒前駆細胞は、初代培養の際と同様に、percoll を用いて細胞比重の差を利用して単離した。単離した前駆細胞を C1 Fluidigm システムを用いて 96well chips に一細胞レベルで分配し、Smart-seq 法によりトータル RNA を抽出、ライブラリー化した。トータル RNA は 109 の細胞から回収することに成功した。本研究に用いた scRNA-seq データは、全て Gene expression omnibus (GSE153313) にデポジットしており、一般公開されている。

2.12 シングルセル RNAseq のデータ処理

ライブラリー化したシーケンスリードは、STA2.4.1d プログラム(Dobin et al., 2013)を用いて、mm10 リファレンス配列にアライメントした。一細胞あたりの遺伝子発現カウントは、HTseq-count tool 0.6.1 を用いて計算した(Anders et al., 2015)。アライメントのクオリティは Qualimap v2.2.1 を用いて確認を行った(Okonechnikov et al., 2016)。算出した発現カウントは Seurat v3 を用いて処理し、次元圧縮した(Stuart et al., 2019)。クラスター0に含まれる全ての細胞(Fig. 6A, D)は、Notch2 遺伝子の発現の有無によって Notch2 陽性細胞 ($Notch2 >0$)と陰性細胞($Notch2 =0$)に分類した。Notch2 陽性細胞と陰性細胞間での発現遺

伝子変動 (Differential expressed genes, DEG)は DESeq2(Love et al., 2014)を用いて解析した。 p 値が 0.01 を下回った遺伝子を DEGs (upregulated : 582、downregulated : 74)と定義した。 Unchanged genes は、 p 値が 0.05 よりも大きい遺伝子の中から選択した。 Gene set enrichment analysis (GSEA)は、 Molecular Signatures Database v7.1 に登録されていた NOTCH-REACTOME data (M10189, Signaling by NOTCH)と、同定した DEGs を比較して行った。 Gene ontology (GO)解析には DAVID を用いた(<https://david.ncifcrf.gov>)。

2.13 統計処理

個体数、及び試行数は biological replicates とみなしている。全てのコントロール群は試験群と同条件で実験を行なった。全てのグラフデータは平均値、及び測定誤差で表している。全ての統計処理はステューデント T 検定で検定しており、 p 値はそれぞれ、 N.S. (Not significant) for $p>0.05$; *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$ を表している。

3. 結果

3.1 GCPs における Notch 関連遺伝子、タンパク質の発現

これまでの先行研究から、Notch シグナル関連遺伝子が哺乳類の小脳 EGL において発現しているということは既に知られている(Tanaka et al., 1999; Irvin et al., 2001; Solecki et al., 2001; Stump et al., 2002; Irvin et al., 2004; Eiraku et al., 2005; Tanaka et al., 2003)。しかしながら、GCPs (oEGL)と GCs (iEGL)を切り分けて Notch シグナル関連遺伝子の発現を調べた仕事はなされておらず、その為、GCPs から GCs へと分化する際に重要な働きをする Notch 関連遺伝子については、わかっていなかった。そこで私は、最も EGL が厚い時期といわれている生後 6 日齢(Postnatal day 6, P6)のマウスから GCPs を単離し、SHH シグナルのアゴニストである SAG を加えた場合と加えていない場合の 2 条件に分けて培養することによって、未分化な GCPs と分化した GCs がそれぞれ主集団となる細胞を回収した。SHH シグナルは GCPs の未分化性を保つために重要なシグナル経路であり、この 2 条件に分けた培養によって GCP 様の性質を持つ細胞集団と、GC 様の性質を持つ細胞集団が回収されることは、既に先行研究によって知られている(Kutscher et al., 2020)。まず、私は、回収した細胞から cDNA を抽出し、分裂能を持つ GCPs において高発現することが知られている *Ccnd2* の定量 PCR を行った(Fig. 3A, B)。その結果、先行研究で示されていた通り、SAG 添加条件で培養した細胞集団の方が非添加群と比較して、高い *Ccnd2* 遺伝子発現を示すことがわかった(Fig.3A, B, Kutscher et al., 2020)。そこで私は、Notch 関連遺伝子群の発

現が二つの GC lineage の培養条件によってどのように変化するかを調べるために、最も主要な Notch レセプター(*Notch1, 2, 3, 4*)、下流の転写因子(*Hes1, 5*)、Notch リガンド(*Jag1, 2, Dll1, 3, 4*)について、定量 PCR を行った。その結果、SAG 添加群 (GCP 様細胞群)では、*Notch1, Notch2, Hes1, Jag1* が高発現しており、SAG 非添加群(GC 様細胞群)では、*Notch1, Notch2, Hes5, Jag2* の発現が高いことがわかった(Fig. 3A, C, D)。本研究では GCPs の運命決定制御機構としての Notch シグナルの働きを調べることを目指しているため、私は SAG 添加群 (GCP 様細胞群)で発現の高かった *Notch1, Notch2, Hes1, Jag1* に着目して、引き続き研究を行なった。

定量 PCR の結果では、それぞれの遺伝子の発現に関して空間的な情報が欠如しているため、次に、私は小脳 EGL における Notch 関連タンパク質の発現を免疫染色法によって確認することを試みた。転写因子 HES1 は免疫染色に有用な市販の抗体が存在しないため、私はまず、Notch レセプターである NOTCH1、2 と Notch リガンドである JAG1 の P6 マウス小脳 oEGL/iEGL における発現を、oEGL の GCPs マーカーとして知られている KI67 と共染色することで調べた(Fig. 3E, F, G)。その結果、NOTCH1、2、JAG1 は oEGL においても iEGL においても GCPs/GCs の膜に沿った蜂の巣状の染色図を示すことがわかった(Fig. 3E, F, G)。EGL では GCPs/GCs が密に局在している為に、GC lineage の膜や細胞質に局在するタンパク質の免疫染色は、蜂の巣状の染色図を示すことが既に知られている(Shiraishi et al., 2019)。このことから、NOTCH1、2、JAG1 タンパク質は EGL の GCPs、GCs の膜上、細胞質中に局在していることがわかった(Fig. 3E, F, G)。

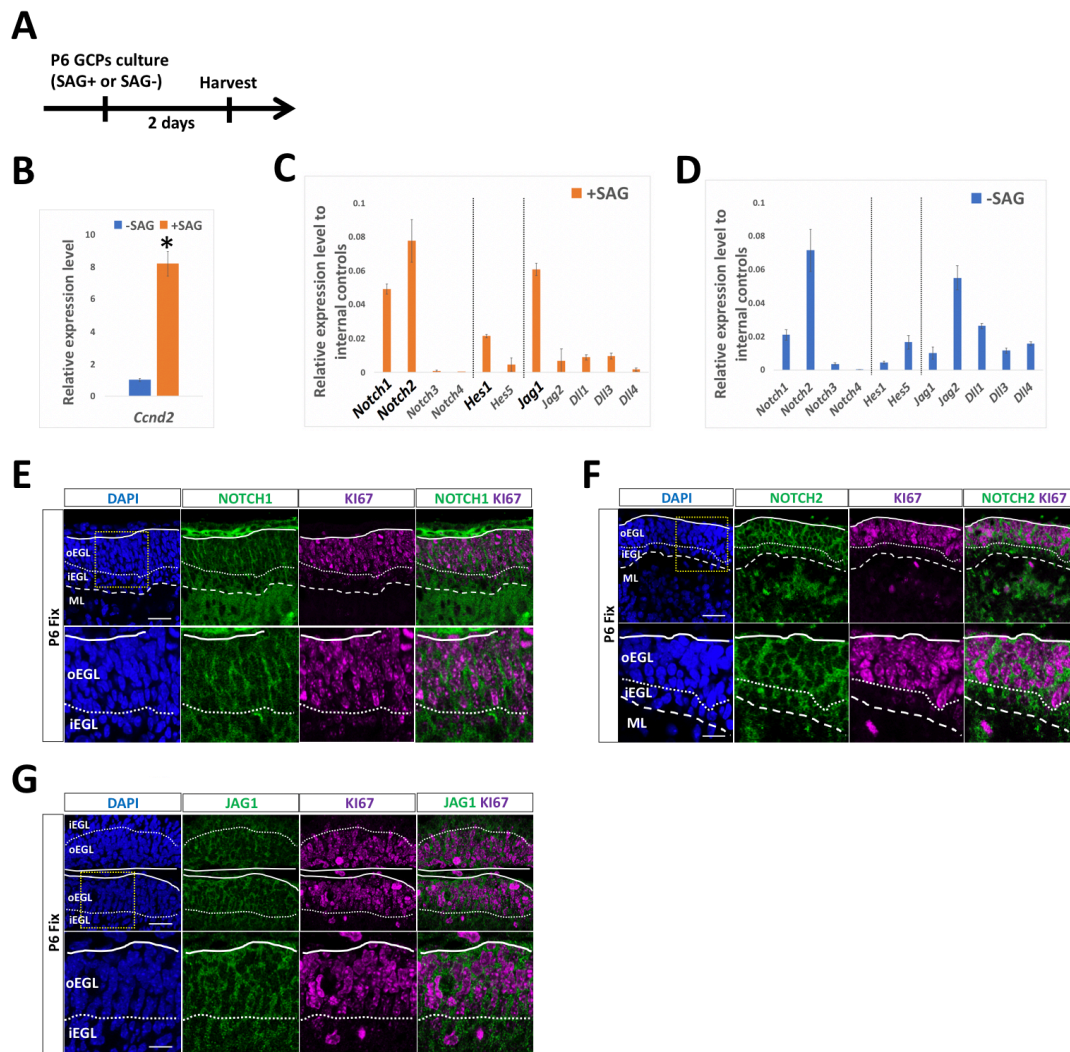


Fig. 3. GCPs における Notch 関連遺伝子、タンパク質の発現

(A-D) P6 のマウス小脳から単離した GCPs を、SAG を加えた場合と加えていない場合の 2 条件に分けて培養することによって、未分化な GCPs と分化した GCs がそれぞれ主集団となる細胞を培養開始から 2 日後に回収した(A)。回収した細胞を用いて、GCPs のマーカーである *Ccnd2*、Notch レセプター(*Notch1, 2, 3, 4*)、下流の転写因子(*Hes1, 5*)、Notch リガンド(*Jag1, 2, Dll1, 3, 4*)について、定量 PCR を行った(B-D)。内在性コントロールとして、*Hrpt1*、*Rpl27*、*Rer1* を用いた (C, D)。グラフは平均値に標準誤差のエラーバーをつけた。統計処理は t 検定で行なっており、*は p 値が 0.05 以下であることを示している。

(E-G) 矢状小脳切片に対して、NOTCH1、NOTCH2、JAG1 抗体を用いた組織免疫染色を行なった。核マーカーである DAPI と、GCPs のマーカーである KI67 と共に共染色を行なった。全ての画像は小葉虫部の IV/V 葉か VI 葉を撮影してきている。NOTCH1、NOTCH2、JAG1 タンパク質は、小脳の前後軸の違いによる発現の差は見られなかった。Scale bars: E-G, 30 μm and 15 μm 。(Adachi et al., *eNeuro*, 2021) より引用。

3.2 EGL の GCPs においては、Notch2-Hes1 シグナルが存在する

Notch 関連遺伝子、タンパク質が EGL の GCPs において発現することがわかったため、次に私は GCPs における Notch シグナルの活性をモニターすることを試みた。GCPs における Notch シグナル活性のモニターのため、私は半減期の短い GFP (d2GFP) が *Hes1*、*Hes5* プロモーターの下流に接続された二つのベクター (*pHes1-d2GFP*, *pHes5-d2GFP*, Ohtsuka et al., 2006) を用いた。二つのベクターを、それぞれ mCherry を発現するベクター (*pCAG-mCherry*) と同時に P5 のマウスの小脳に *in vivo* 電気穿孔法 (*in vivo* EP, Owa et al., 2018; Chang et al., 2019) で導入し、三日後にサンプリングを行なった。その結果、*pHes1-d2GFP* は EGL において強い発現を示したが、*pHes5-d2GFP* の発現は確認できなかった (Fig. 4A, B)。 *pCAG-mCherry* の発現は *pHes5-d2GFP* を導入したサンプルでも確認された (Fig. 4B)。 EGL におけるこの二つの遺伝子のプロモーター活性の差は、SAG 添加培地で培養した細胞群において、*Hes1* が高い発現を示し、*Hes5* が低い発現を示したことと一致する結果であると考えられる (Fig. 3C)。

次に私は、EGL で確認された *Hes1* プロモーターの活性が実際に Notch シグナルの下流で働くものであるかどうかを調べた。私は、*Hes1* プロモーターをモニターするため *Hes1p-venus* ベクターを、*pCAG-mCherry* ベクターと共に P5 のマウス小脳 GCPs に *in vivo* EP 法で遺伝子導入した。そして、P6 において、マウスをサンプリング、小脳切片を作成し、培地に Notch inhibitor である RO4929097 (Luistro et al., 2009) を加えた群と加えていない群の 2 条件に分けて 8 時間培養し、タイムラプス撮影を行った (Fig. 4C)。本実験において、*pHes1-d2GFP* ベクターではなく、*Hes1p-venus* ベクターを用いたのは、タイムラプス撮影に際し

て、より強い蛍光シグナルが必要であったためである (Kohyama et al., 2005)。8 時間の撮影の結果、RO4929097 を加えていない群においては、*venus*、*mCherry* 共に大きなシグナルの減少が見られなかったのに対し、加えた群においては、*venus* のシグナルのみ、顕著に減少することが確認された (Fig. 4C, D)。この結果は、EGL で確認された *Hes1* プロモーター活性が、*Notch* シグナルに制御されていることを示すものであると考えられる。

Notch レセプターのうち、*Notch1* と *Notch2* の高い発現が GCP 様細胞 (Fig. 3C) と EGL (Fig. 3E, F) において確認されたので、私は EGL における *Hes1* プロモーター活性がどちらの *Notch* レセプターによって制御されているかを調べることを試みた。私は、*Notch1*、*Notch2* の sh-RNA ベクターを、*pHes1-d2GFP* 及び *pCAG-mCherry* ベクターと共に、P6 マウスの小脳 GCPs に *in vivo* EP 法で導入した。その 2 日後に小脳を固定、サンプリングし、*mCherry* 陽性細胞のうち、*GFP* 陽性である細胞の割合を計測した (Fig. 4E)。その結果、*Notch1* の発現抑制 (Knockdown, KD) ベクターを導入したサンプルでは、コントロールとして *Scramble* 配列を導入したサンプルと比較して、*GFP* 陽性細胞の割合に差がなかった (Fig. 4E, F)。しかし、*Notch2* の KD ベクターを導入したサンプルは、コントロールと比較して、有意に *GFP* 陽性細胞の割合が減少していた (Fig. 4E, F)。このことから、生後小脳発生時の EGL においては、*Notch2* の下流で *Hes1* が活性化される *Notch* シグナルが存在することがわかった。

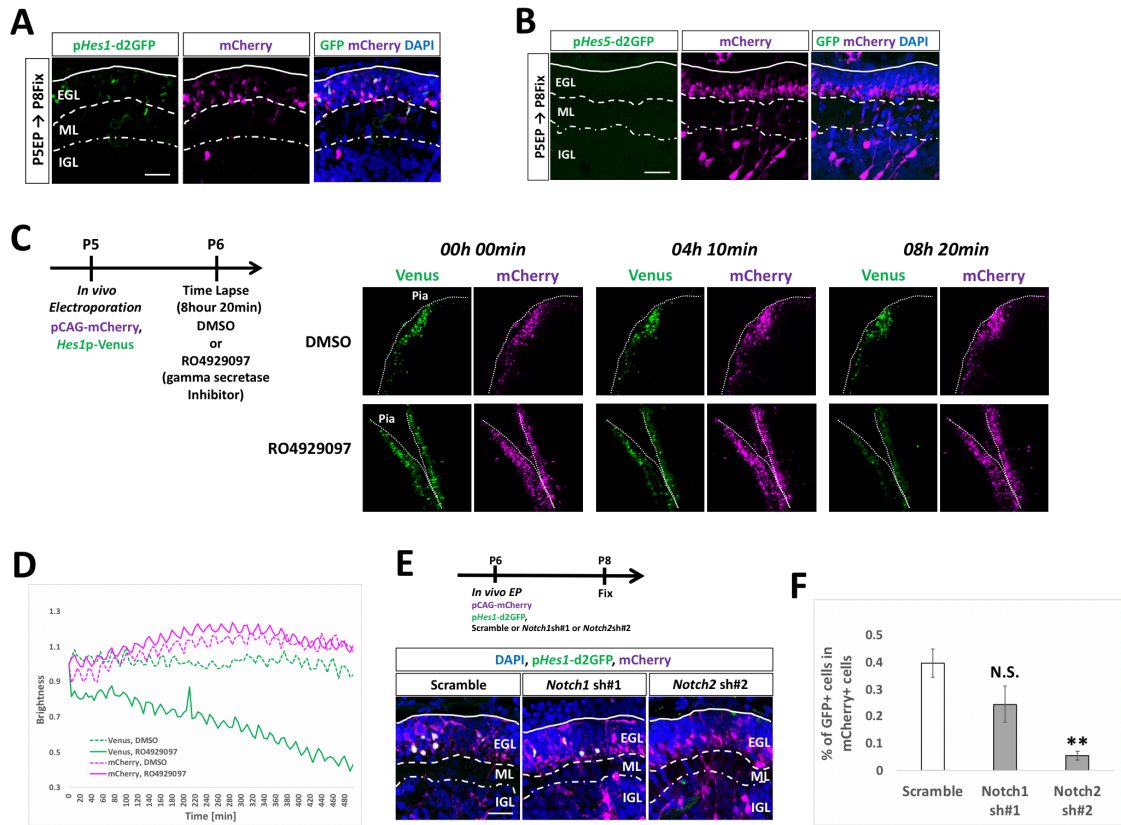


Fig. 4. GCPs における *Hes1* プロモーター活性は、Notch 阻害剤と *Notch2* 遺伝子の発現抑制によって抑制される

(A, B) *Hes1* と *Hes5* の小脳 GCPs におけるプロモーター活性を調べるために、*pHes1-d2GFP* ベクター(A)と *pHes5-d2GFP* ベクター(B)を、*pCAG-mCherry* ベクターと共に P5 のマウス小脳 GCPs に *in vivo* EP 法で遺伝子導入した。EGL においては、*Hes1* プロモーター活性のみ確認された(A, B)。

(C, D) P5 のマウス小脳 GCPs に *Hes1p-Venus* ベクターと *pCAG-mCherry* ベクターを *in vivo* EP 法で遺伝子導入し、24 時間後に小脳切片培養とタイムラプス撮影を行なった(C)。タイムラプス撮影は Notch インヒビターである RO4929097 か DMSO を加えた状態で、8 時間 20 分行なわれた。RO4929097 を添加した切片でのみ、Venus の蛍光輝度の低下が観察された(C, D)。Scale bars: A, 80 μ m。

(E, F) P6 のマウス小脳 GCPs に対して、*pHes1-d2GFP* と *pCAG-mCherry* ベクターを *Notch1* または *Notch2* KD ベクターと共に *in vivo* EP 法で遺伝子導入し、P8 で固定した。コントロールと比較して、*Notch1* を KD した切片では、mCherry 陽性細胞中の GFP 陽性細胞の割合には差がなかった。しかし、*Notch2* を KD した切片では、mCherry 陽性細胞中の GFP 陽性細胞の割合が大きく減少した。マウス個体数: *Notch1* sh#1 4 個体、*Notch2* sh#2 4 個体。グラフは平均値に標準誤差のエラーバーをつけた。統計処理は t 検定で行なっており、**は p 値が 0.01 以下であることを示している。Scale bars: E, 30 μ m。(Adachi et al., *eNeuro*, 2021) より引用。

3.3 *oEGL* の GCPs には、Notch シグナルが ON の細胞集団と、OFF の細胞集団が存在す

る

私は *pHes1-d2GFP* ベクターを *pCAG-mCherry* ベクターと同時に P5 マウスの小脳 GCPs に *in vivo* EP 法で導入し、P8 で固定したサンプルの EGL を KI67 で免疫染色した。その結果、遺伝子導入された細胞(mCherry 陽性細胞)のうち、GFP が陽性である細胞は、GFP 陰性である細胞と比べて、より未分化性に富んだ細胞(KI67 陽性細胞、GCPs)であることがわかった(Fig. 5A, B)。更に、同じ実験において、私は遺伝子導入された GCPs(mCherry 陽性かつ KI67 陽性細胞)における GFP の蛍光輝度を定量した。その結果、興味深いことに、遺伝子導入された GCPs における GFP の蛍光輝度は、明確に双方向性の分布を示すことがわかった(Fig. 5C-E)。mCherry の蛍光輝度は単方向性の分布を示すことも確認した(Fig. 5E)。この結果から、oEGL の GCPs には *Notch2-Hes1* シグナルが活性である集団と、不活性である集団の二群が存在することがわかった。

次に、私は P7 のマウス小脳から単離した GCPs を用いて、Smart-seq 法によるシングルセル RNA-seq (scRNA-seq)を行った。合計で 109 個の細胞で RNA-seq を行うことに成功し、得られた遺伝子発現データを、Seurat ソフトウェアを用いて二次元マトリクスに次元圧縮し、無作為分類によって 3 つのクラスターを得た(Fig. 6A, クラスター0,1,2)。それぞれのクラスターにおいて強く発現している遺伝子を調べた結果、GCP マーカーと GC マーカーは、それぞれクラスター0 と 1/2 に偏って発現していることがわかった(Fig. 6B, C)。GCPs における *Notch* シグナルは *Notch2* 依存的であることがわかっている(Fig. 4E, F)、私は次に、クラスター0 における *Notch2* の発現を解析した。その結果、クラスター0 を構成す

る 44 の細胞のうち、29 の細胞が *Notch2* 陽性であり、15 の細胞が陰性であることがわかった(Fig. 6D)。そこで、私はクラスター0 の *Notch2* 陽性、陰性細胞群を発現遺伝子変動 (Differential expressed genes, DEG) 解析にかけることで、変動する発現遺伝子を解析し、ヒートマップに出力した(Fig. 6F)。DEG 解析は DESeq2 ソフトウェア(Love et al., 2014)を用い、その結果 582 の遺伝子が *Notch2* 陽性細胞において発現上昇していて、74 の遺伝子が発現低下していることがわかった(Fig. 6F)。この結果は、*Notch2* 陽性細胞群と陰性細胞群が明確に異なる性質を持つ細胞集団であることを示している。また、この DEG 解析結果において、*Jag1* や *Hes1* の発現変動は見られていない。そもそも *Jag1* や *Hes1* の発現は GCPs の定量 PCR によっては検出されていたが(Fig. 3C)、scRNA-seq 解析においては、少数の細胞において弱い発現のみ確認される結果となっていた (Fig. 6E)。これは、scRNA-seq 解析における検出深度限界が原因ではないかと考えられる。

これまでの結果から、GCP 様の細胞集団であるクラスター0 は、*Notch2* の発現の有無によって、二つの別の細胞集団に分けられることがわかった。そこで私は、次に gene set enrichment analysis (GSEA)を行うことで、それぞれの細胞集団が Notch シグナルの有無によって分類されているのかどうかを解明することを試みた。私は、本実験で検出された 656 の変動遺伝子と、Molecular Signatures Database v7.1 にデポジットされていた “REACTOME_SIGNALING_BY_NOTCH” (M10189, Signaling by NOTCH)に記録されていた Notch シグナル応答性の遺伝子群を用いて、GSEA を行った。その結果、私の実験で検出された *Notch2* 陽性/陰性細胞で発現変動していた遺伝子群は、Notch シグナル ON 細胞

において、発現上昇/低下している遺伝子群と近似することがわかった(Fig. 6G)。次に、私は、gene ontology (GO)解析を行うことで、本実験で確認された Notch-ON GCP 集団と Notch-OFF GCP 集団において変動している遺伝子群が、どのような性質を持った遺伝子群かを同定することを試みた(Fig. 6H, I)。その結果、クラスター0の Notch-ON GCP 集団において発現が上昇していた遺伝子群は、細胞周期を進行させるものや未分化性に関与する遺伝子が多く含まれており(Fig. 6H)、Notch-OFF GCP 集団において発現が上昇していた遺伝子群は細胞移動を含む分化に関与する遺伝子が含まれていることがわかった(Fig. 6I)。これらの結果は、Notch-ON GCPs はより分裂能が高く未分化性を保った細胞集団で、それに対して Notch-OFF GCPs は、より分化に近い細胞集団であることを示していると考えられる。

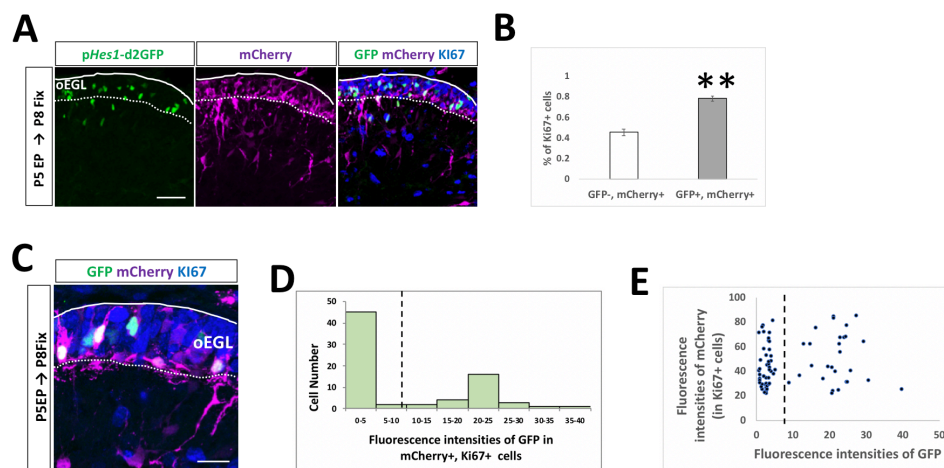
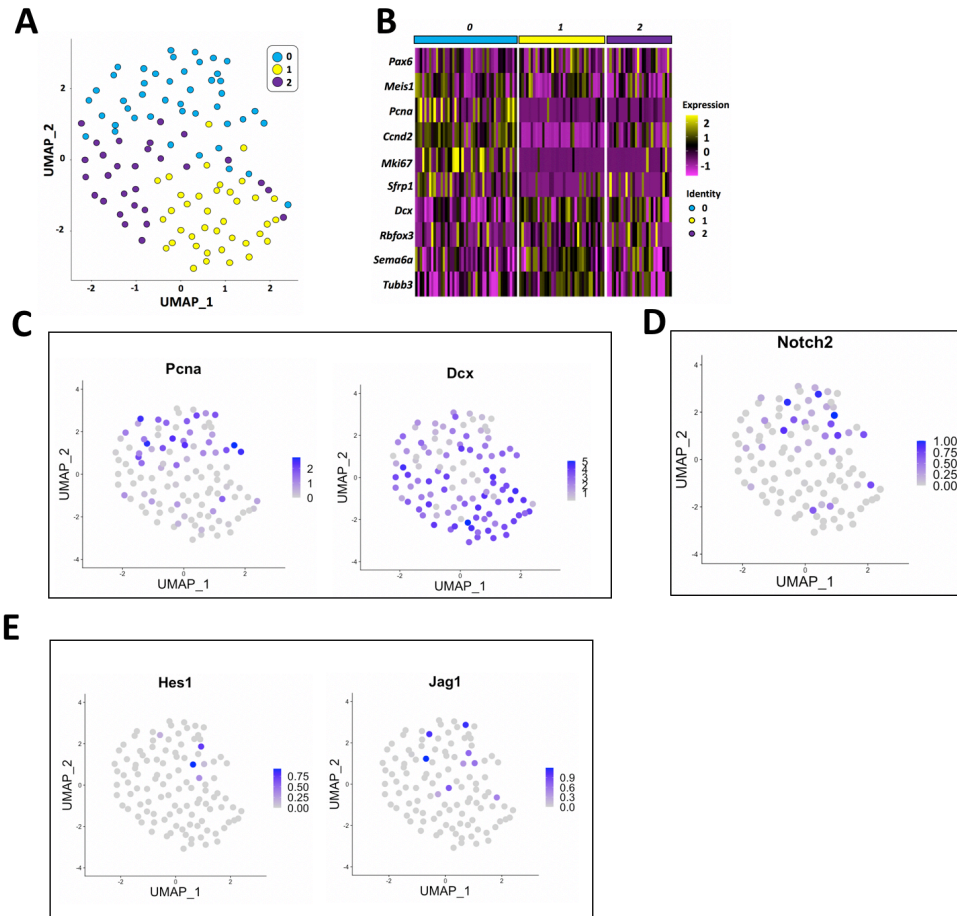


Fig. 5. GCPs は Notch シグナル活性の有無によって、*in vivo* で二群に分けられる

(A-E) pHes1-d2GFP ベクターと pCAG-mCherry ベクターを P5 のマウス小脳 GCPs に *in vivo* EP 法で遺伝子導入し、2日後に固定し、Ki67 で免疫染色を行った。GCPs と GCs における Hes1 プロモーター活性の強度差を比較した結果、Hes1 プロモーター活性は GCs よりも GCPs において高いことがわかった(A, B)。また、oEGL の遺伝子導入された GCPs (Ki67 陽性かつ mCherry 陽性細胞)における GFP 陽性細胞の割合を計測した結果、GCPs は Hes1 プロモーター活性強度に関して、二峰性を示す細胞集団であることがわかった(C-E)。破線は視

認できるレベルの輝度を表している(D, E)。マウス個体数 : Fig. 2B の解析に使用した個体は 3 個体、Fig. 2D, E の解析に使用した個体数は 4 個体。グラフは平均値に標準偏差のエラーバーをつけた。統計処理は t 検定で行なっており、**は p 値が 0.01 以下であることを示している。Scale bars: A, 45 μ m, C, 20 μ m。 (Adachi et al., *eNeuro*, 2021) より引用。



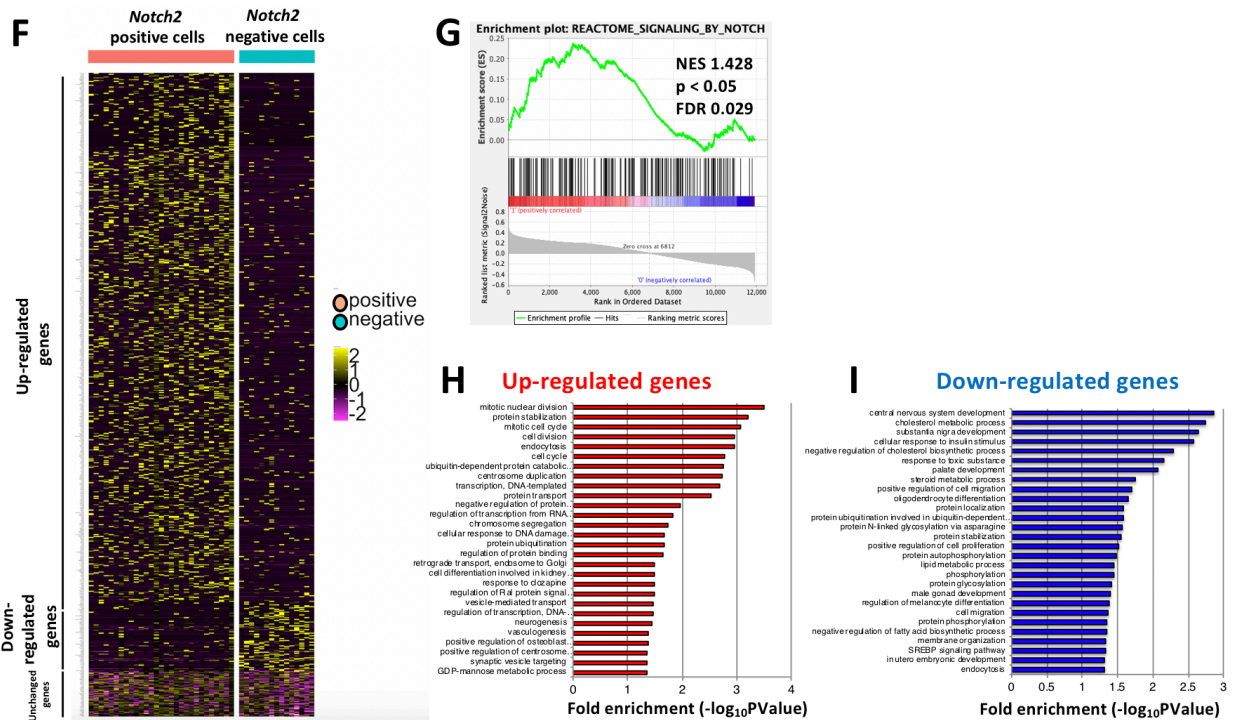


Fig. 6. GCPs は Notch シグナル活性の有無によって、*in silico* で二群に分けられる

(A) P7 のマウス小脳から単離した 109 の GCPs を scRNA-seq (Smart-seq) によって解析した。Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) により次元を圧縮し、その結果 3 つのクラスターが確認された(クラスター 0, 1, 2)。

(B) それぞれのクラスターにおける GC lineage マーカー(*Pax6*, *Meis1*)、GCP マーカー(*Pcna*, *Ccnd2*, *Mki67*, *Sfrp1*)、GC マーカー(*Dcx*, *Rbfox3*, *Sema6a*, *Tubb3*) の発現をヒートマップに表した。それぞれのクラスターの遺伝子発現は、クラスター 0 が GCPs に相当し、クラスター 1 と 2 が GCs に相当することを示している。

(C-E) それぞれの遺伝子のそれぞれの細胞における発現強度を、UMAP により次元圧縮した形で図示した。GCPs のマーカーである *Pcna* は主にクラスター 0 に発現しており、GCs のマーカーとして知られる *Dcx* はクラスター 1 と 2 において強く発現していた(C)。Notch2、*Hes1*、*Jag1* の発現も同様に UMAP により次元圧縮した形で図示した(D, E)。

(F) P7 のマウス小脳から単離し、シングルセル RNA-seq によって解析された GCPs は、Notch2 陽性細胞と陰性細胞の二群に分けられることがわかった。Notch2 陽性細胞と陰性細胞間における 656 の発現が変動している遺伝子を、ヒートマップによって図示した。582 の遺伝子は Notch2 陽性細胞において発現が上昇しており、逆に 74 の遺伝子は低下していた。

(G) Notch2 陽性細胞において発現が上昇している遺伝子群と低下している遺伝子群を、Gene set enrichment analysis (GSEA) によって「REACTOME_SIGNALING_BY_NOTCH」データセットと比較した。NES, normalized enrichment score; FDR, false discovery rate.

(H, I) Notch2 陽性細胞において発現が上昇している 582 の遺伝子(H)と、低下している 74 の遺伝子(I)について Gene ontology analysis を行なった。(Adachi et al., *eNeuro*, 2021) より引用。

3.4 Notch2-Hes1 依存的 Notch シグナルは、GCPs の未分化性と分裂能を保つ働きを持つ

これまで、私の所属するグループと他グループの先行研究によって、*in vivo* EP による生後マウスの小脳 GCPs への遺伝子導入法が確立されてきた(Owa et al., 2018; Chang et al., 2019)。しかしながら、遺伝子導入された細胞が、正常の GCPs と同様に分化するかどうかということについて明確に確認した仕事は存在しなかった。そこで、私は、*in vivo* EP によって遺伝子導入された細胞の分化と移動の動態を、より詳細に解析した(Fig. S1)。P5 のマウス小脳 GCPs に、核局在する GFP (pCAG-H2B-GFP) を *in vivo* EP 法で導入し、P6、P7、P8、P9、P12 のそれぞれの日齢で固定した(Fig. S1A, B)。この手法によって、遺伝子導入時には脳表面に局在していた GFP 陽性細胞が、通常の GCPs と同様に、発生が進むにつれて内側の IGL に向けて移動していくことが観察された (Fig. S1A-D)。また、未分化な GCPs のマーカーである ATOH1、KI67 陽性細胞の割合も、日にちが経過するにつれて、緩やかに減少し、GCs へと分化していくことが確認された(Fig. S1E, F)。

そこで私は、*in vivo* EP 法による遺伝子導入によって、*Notch1,2* と *Hes1,5* の発現強度を変化させることによって、GCPs の分化度合いにどのような影響が出るかを調べた(Fig. 7, S2)。まず私は、*Notch1* と *Notch2* の sh-RNA ベクターを、pCAG-H2B-GFP と共に、P6 小脳 GCPs に導入し、3 日後に固定し、ATOH1 と KI67 で免疫染色を行なった(Fig. 7A-C)。その結果、*Notch1* を KD した GCPs の分化度合いは、Control と比較して差は確認されなかったが、*Notch2* を KD した場合には、ATOH1 陽性、KI67 陽性 GCPs が著しく減少することがわかった(Fig. 7A-C)。この結果は、*Notch1* ではなく、*Notch2* が GCPs の未分化性を保

つために、GCPs 内において自律的に機能していることを示唆している。次に、私は同様の実験を *Hes1* の過剰発現(Over-expression, OE)ベクター(Fig. 7D-F)と KD ベクター(Fig. 7G-I)を用いて行なった。それぞれ、P6 のマウスに遺伝子を導入し、P8 と P9 で固定を行ない、*ATOH1* と *KI67* で免疫染色を行なった(Fig. 7D, G)。その結果、*HES1* の過剰発現によって、*ATOH1* 陽性、*KI67* 陽性 GCPs の数は有意に上昇し(Fig. 7D-F)、発現抑制によって、有意に減少することがわかった(Fig. 7G-I)。このことから、*Hes1* も *Notch2* と同様に、その発現によって自律的に GCPs の未分化性を保つことに寄与することが示唆された。一方で、*Hes5* の KD ベクターの導入では GCPs の分化度合いには影響がないこともわかった(Fig. S2)。これは、*Hes5* が GCPs の分化度合いの制御には関与していないことを示唆しており、その結果は、GCPs 様細胞において、*Hes5* の発現が *Hes1* と比較して低かったこととも合致するものであると考えられる(Fig. 3C)。また、*HES5* の過剰発現を GCPs において行なった場合、*HES1* の過剰発現実験の結果と同様に、GCPs の未分化性が上昇することもわかった(Fig. S2A,B)。しかし、KD 実験において表現型が確認されなかったことから、内在性の *HES5* による GCPs の分化状態の制御機構は、通常時には機能しないシグナル経路なのではないかと考えられる。これらの結果から、GCPs における *Notch2-Hes1* 依存的 *Notch* シグナルは、GCPs の未分化性、増殖能を自律的に保つシグナルとして機能していることがわかった。

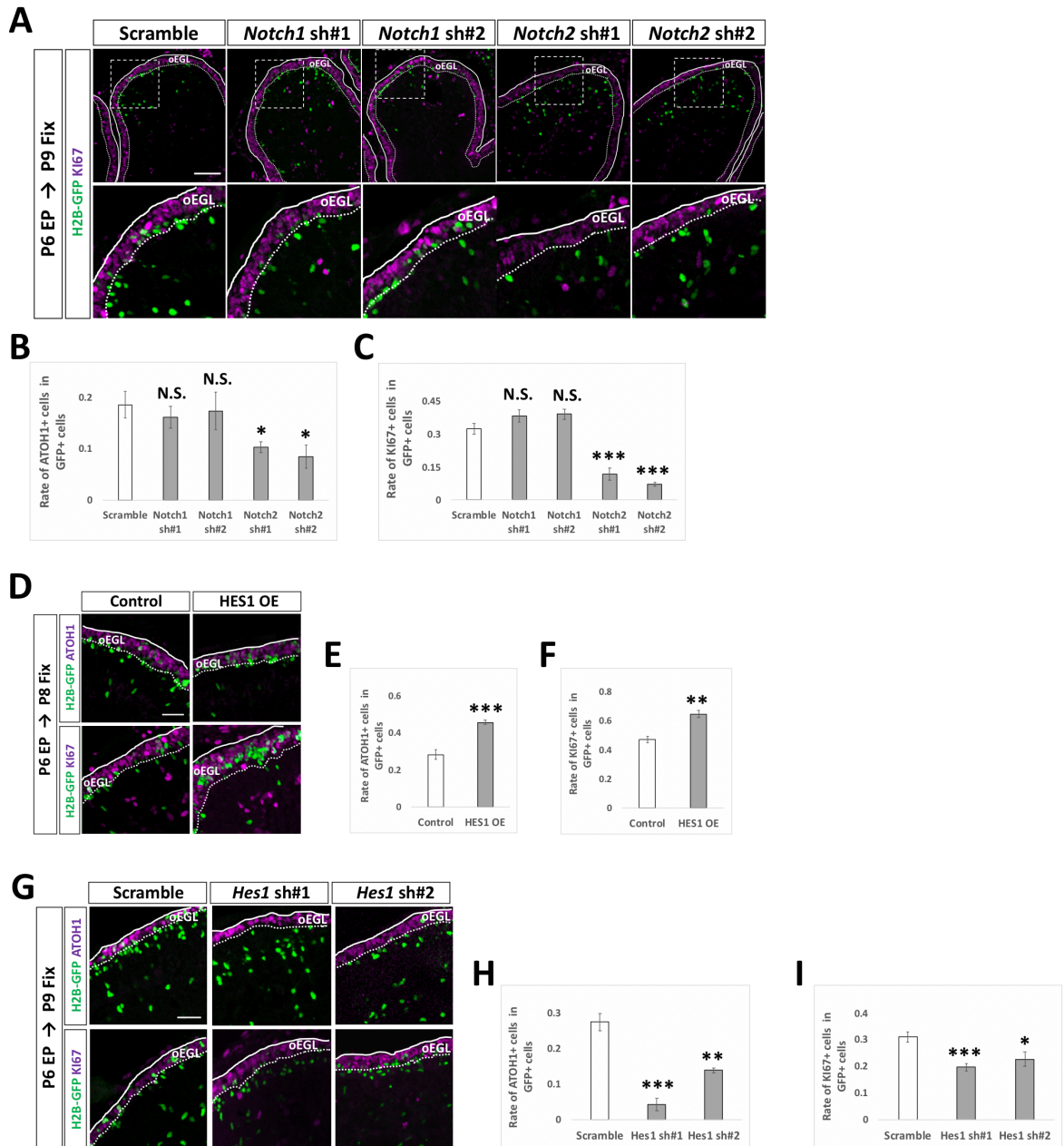


Fig. 7. NOTCH2 と HES1 は GCPs の未分化性と増殖性を保つ傾向がある

(A-C) *Notch1,2* の KD ベクターと pCAG-H2B-GFP ベクターを P6 のマウス小脳に *in vivo* EP 法で導入した(A)。遺伝子導入された細胞の分化度合いは、ATOH1 タンパク質と Ki67 タンパク質の発現によって評価した(B, C)。マウス個体数 : *Notch1,2* sh#1 4 個体、*Notch1,2* sh#2 5 個体。グラフは平均値に標準誤差のエラーバーをつけた。統計処理は t 検定で行なっており、*は p 値が 0.05 以下であること、***は p 値が 0.001 以下であることを示している。Scale bars: A, 80 μ m and 30 μ m。

(D-I) P6 のマウス小脳に対して、HES1 の過剰発現ベクター(D-F)と、KD ベクター(G-I)を pCAG-H2B-GFP ベクターとともに遺伝子導入し、分化度合いへの影響を調べた。遺伝子導入された細胞の分化度合いは、ATOH1 タンパク質と Ki67 タンパク質の発現によって評価した(E, F, H, I)。pCAG-empty ベクター(D-F)と、scrambled shRNA(Scramble)ベクター(G-I)をそれぞれコントロールとして使用した。マウス個体数 : (D-F) 5 個体、(G-I) 4

個体。グラフは平均値に標準誤差のエラーバーをつけた。統計処理は t 検定で行なっており、*は p 値が 0.05 以下であること、**は p 値が 0.01 以下であること、***は p 値が 0.001 以下であることを示している。Scale bars: D, G 30 μ m。 (Adachi et al., *eNeuro*, 2021) より引用。

3.5 JAG1 は、発現する GCP の周辺 GCPs における Notch シグナルを、非自律的に活性化させる

私は、*Jag1* がその他の Notch リガンド *Jag2*, *Dll1,3,4* と比較すると、GCP 様細胞において強く発現していることを既に発見している (Fig. 3C)。また、*in vivo* でも、JAG1 が oEGL において強く発現していることも示している (Fig. 3G)。そこで、私は *Jag1* の過剰発現と発現抑制実験を *Notch1,2*, *Hes1,5* と同様に行うことによって、*Jag1* の GCPs の分化度合いへの影響を調べた。その結果、JAG1 の過剰発現によって GCPs の分化度合いは低下し (Fig. 8A-C)、発現抑制によって上昇することがわかった (Fig. 8D-F)。この結果から、*Jag1* は *Notch2* や *Hes1* とは逆に、発現している細胞を自律的に分化に誘導する性質を持つことがわかった。

多くの組織において、JAG1 が Notch リガンドとして働き、周辺細胞の Notch レセプターと結合することで、周辺細胞の Notch シグナルを活性化させることがわかっている (Gomi et al., 2016)。加えて、私は既に、GCPs における Notch シグナルを *pHes1-d2-GFP* によって可視化することができることを示している (Fig. 4A, E, 5A, C)。そこで、私は、JAG1 が GCPs においても周辺 GCPs の Notch シグナルを活性化させるかどうかを確かめるため、次のような実験を行なった。まず、私は Control ベクターないしは JAG1 過剰発現ベクター

を、核に局在する BFP(pCAG-H2B-BFP)ベクターと共に、P6 のマウス GCPs に *in vivo* EP 法で導入した。次に、6 時間経過した時点で、*pHes1-d2GFP* と *pCAG-mCherry* を再び *in vivo* EP 法によって同じ小葉に導入し、2 日後に固定した(Fig. 9A)。本実験の条件においては、mCherry 陽性細胞のうち、2 割から 3 割程度の細胞が BFP 陽性となり、すなわち、一度目と二度目の両方の遺伝子導入によってラベリングされる(Fig. 9A, B)。しかし、Control と JAG1 過剰発現サンプルの間で、二度の遺伝子導入の両方でラベリングされた GCPs の割合には差が見られなかった(Fig. 9A, B)。私は、二度目の遺伝子導入でラベリングされた mCherry 陽性細胞のうち、GFP 陽性細胞の割合を計測した。ここで、一度目の遺伝子導入でもラベリングされている BFP 陽性細胞は、解析から除外した。その結果、一度目の遺伝子導入で JAG1 を過剰発現した場合、mCherry 陽性細胞の中での GFP 陽性細胞の割合は、Control と比較して、著しく上昇しているという結果が得られた(Fig. 9A, C)。この結果は、GCPs における JAG1 の発現が、その GCPs の周辺に局在する GCPs の中の Notch シグナル活性を上昇させうることを示唆する結果である。

次に、私は、*Jag1* の発現抑制による非自律的な GCPs の分化度合いへの影響を調べるために、*in vivo* EP 法と腹腔への EdU 投与を組み合わせた実験を行なった。まず、私は、P5 の小脳 GCPs に対して、*Jag1* の KD ベクターと、*pCAG-H2B-GFP* ベクターを *in vivo* EP 法によって遺伝子導入した。同時に、私はマウスの腹腔に EdU を注射し、その 2 日後に固定、免疫染色を行なった(Fig. 9D)。この実験においては、EdU 陽性かつ GFP 陰性である細胞は、JAG1 の発現抑制が起こっていない、腹腔注射時に GCPs であった細胞とみなすこ

とができる。また、*in vivo*EP によって遺伝子導入がなされた GFP 陽性細胞は EGL において密に局在するため(Fig. 9D)、遺伝子導入がなされた小葉と同じ葉に位置する多くの Edu 陽性かつ GFP 陰性である細胞は、遺伝子導入がなされ *Jag1* の発現が抑制された GCPs の周辺に局在していた GCPs の子孫である可能性が高いと考えられる。Fig. 8D-F の結果と同様に、*Jag1* の発現が抑制された GCPs (GFP 陽性細胞)は未分化性が上昇することが確認された(Fig. 9D, E)。また、興味深いことに、*in vivo*EP 法によって遺伝子導入がなされた小葉における Edu 陽性かつ GFP 陰性である細胞の未分化性は、逆に低下することがわかった(Fig. 9D, F)。この結果は、*Jag1* の発現抑制は、抑制された GCPs の未分化性を自律的に上昇させるだけでなく、周辺に局在する GCPs の未分化性を非自律的に低下させることを示唆する結果であると考えられる(Fig. 9D, F)。JAG1 を過剰発現した GCPs の周辺に局在する GCPs において Notch シグナルが活性化することは既にわかっているので(Fig. 9A, C)、GCPs に発現する JAG1 は、周辺に局在する GCPs の未分化性を、NOTCH2-HES1 依存的な Notch シグナルを介して保っている可能性は十分にあると考えられる(Fig. 10E)。

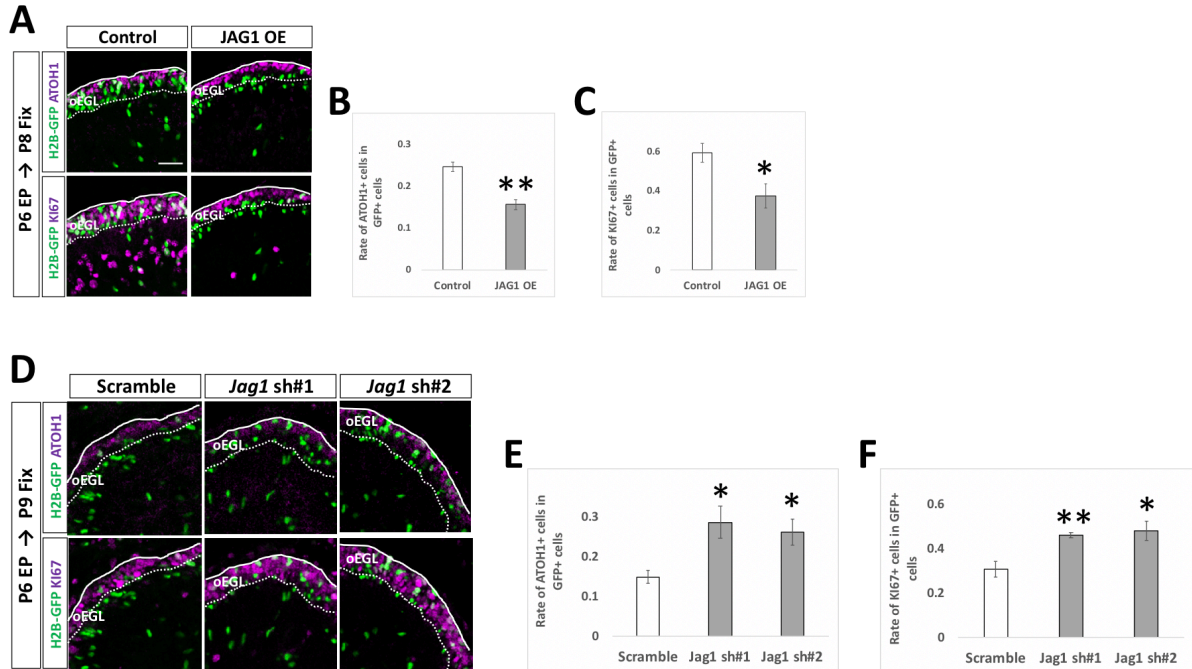


Fig. 8. GCPs に発現する JAG1 は自律的に GCPs の分化を促進する

(A-F) P6 のマウス小脳に対して、JAG1 の過剰発現ベクター(A-C)と、KD ベクター(D-F)を pCAG-H2B-GFP ベクターとともに遺伝子導入し、分化度合いへの影響を調べた。遺伝子導入された細胞の分化度合いは、ATOH1 タンパク質と Ki67 タンパク質の発現によって評価した(B, C, E, F)。pCAG-empty ベクター(A-C)と、Scramble ベクター(D-F)をそれぞれコントロールとして使用した。マウス個体数 : (A-C) 4 個体、(D-F) 5 個体。グラフは平均値に標準誤差のエラーバーをつけた。統計処理は t 検定で行なっており、*は p 値が 0.05 以下であること、**は p 値が 0.01 以下であることを示している。Scale bars: A, D 30 μ m。 (Adachi et al., *eNeuro*, 2021) より引用。

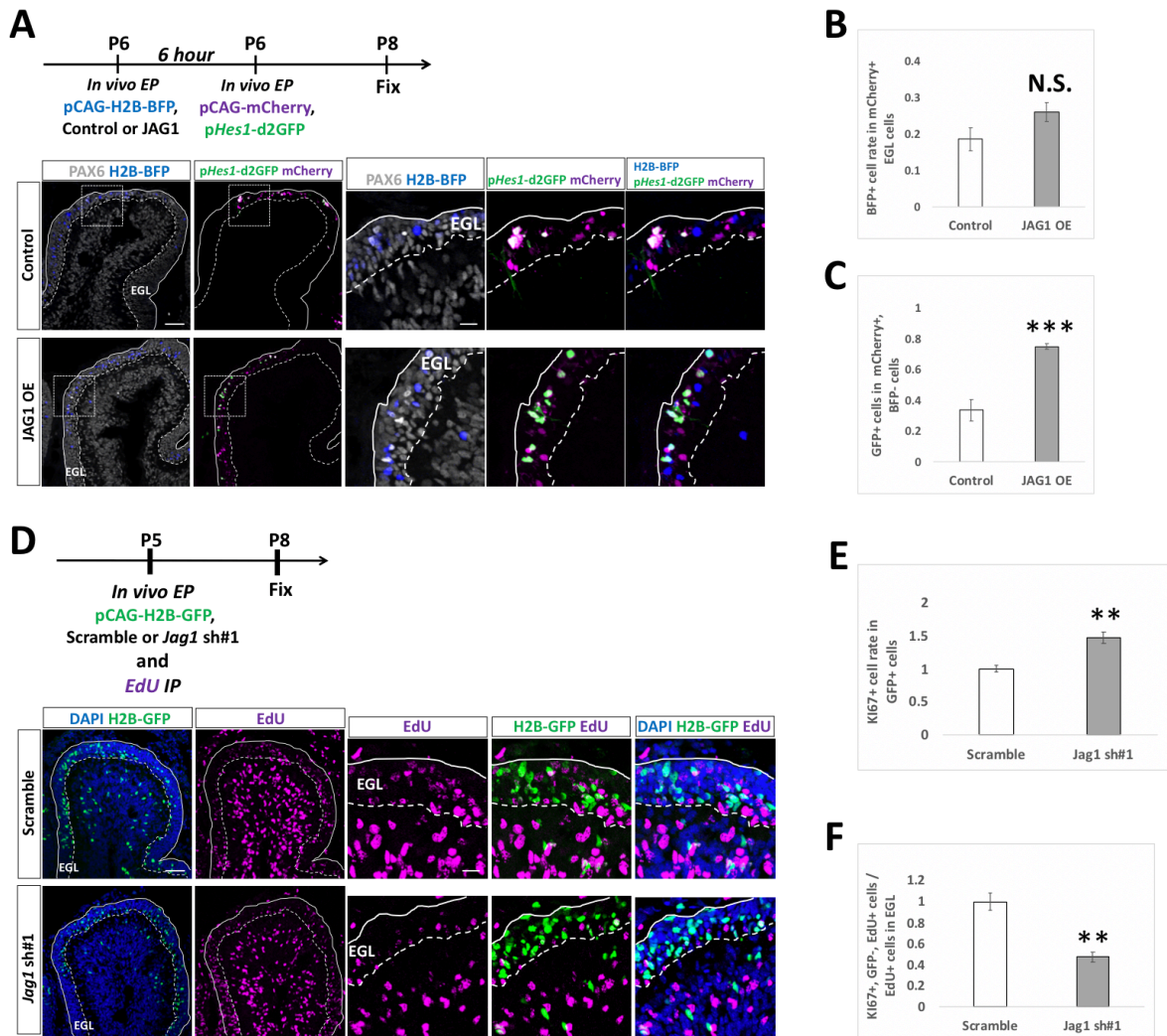


Fig. 9. GCPs に発現する JAG1 は非自律的に周辺に局在する GCPs において Notch シグナルを活性化させ、分化を抑制する

(A-C) P6 のマウス小脳に対して、6 時間のインターバルを空けて二度の電気穿孔法による遺伝子導入を行なった(A)。一度目の遺伝子導入では、pCAG-H2B-BFP ベクターと共に、pCAG-empty ベクター、あるいは pCAG-JAG1 ベクターを導入した。二度目の遺伝子導入では、pHes1-d2GFP ベクターを pCAG-mCherry ベクターと共に導入した。二つの遺伝子導入両方によってラベリングされた細胞(mCherry 陽性細胞中の BFP 陽性細胞)は 20-30%程度であり、この数値は Control と JAG1 OE の間で差がなかった(A, B)。mCherry 陽性細胞中の GFP 陽性細胞の割合は、JAG1 を過剰発現したマウスにおいて、著しく上昇していた(A, C)。Fig. 5C の解析からは、BFP と mCherry の両方が陽性である細胞は除外した。マウス個体数: 4 個体。グラフは平均値に標準誤差のエラーバーをつけた。統計処理は t 検定で行なっており、***は p 値が 0.001 以下であることを示している。Scale bars: A, 80 μ m, 30 μ m。

(D-F) P5 のマウス小脳に対して、Scramble ベクター、または Jag1KD ベクターを pCAG-H2B-GFP ベクターと共に遺伝子導入を行なった。同時に、EdU の腹腔内投与を行ない、3 日後に固定した(D)。この実験において、GFP 陽性細胞は Jag1 の発現が抑制された細胞であり、EdU 陽性かつ GFP 陰性細胞は、Jag1 の発現が抑制された細胞の近傍に存在していた GCPs であると考えられる。Jag1 KD マウスにおいては、未分化な GFP 陽性細胞

胞は増加していた(D, E)。逆に、EdU 陽性かつ GFP 陰性である細胞の未分化性は低下していることがわかった(D, F)。マウス個体数: 5 個体。グラフは平均値に標準誤差のエラーバーをつけた。統計処理は t 検定で行なっており、**は p 値が 0.01 以下であることを示している。Scale bars: A, 80 μ m, 30 μ m。 (Adachi et al., *eNeuro*, 2021) より引用。

3.6 HES1 は NEUROD1 の発現を低下させる

発生期の小脳において、GCPs の GCs への分化には転写因子 NEUROD1 が必要であることは既に知られている(Pan et al., 2009)。加えて、私の実験から、*in vivo* EP 法による *NeuroD1* の過剰発現によって GCPs の未分化性が低下し、発現抑制によって、未分化性が上昇することがわかった(Fig. S3)。これらの結果から、転写因子 NEUROD1 は GCPs から GCs への分化を促進する働きを持つことがわかる。そこで、小脳 GCPs において、Notch シグナルと NEUROD1 の発現の相関を調べるために、私は P6 のマウス小脳 GCPs に HES1 配列と GFP 配列が結合したベクター(pCAG-HES1-fusion-GFP)を導入し、4 日後に固定、NEUROD1 抗体を用いての免疫染色を行なった。その結果、HES1 が過剰発現された GFP 陽性細胞では、NEUROD1 の輝度が著しく減少していることがわかった(Fig. 10A, B)。また、*Hes1* が抑制された GCPs においては、NEUROD1 の輝度は逆に上昇することがわかった(Fig. 10C, D)。これらの結果から、HES1 による GCPs の未分化性、増殖能の維持は、NEUROD1 の発現抑制によってなされている可能性が示唆された(Fig. 10E)。

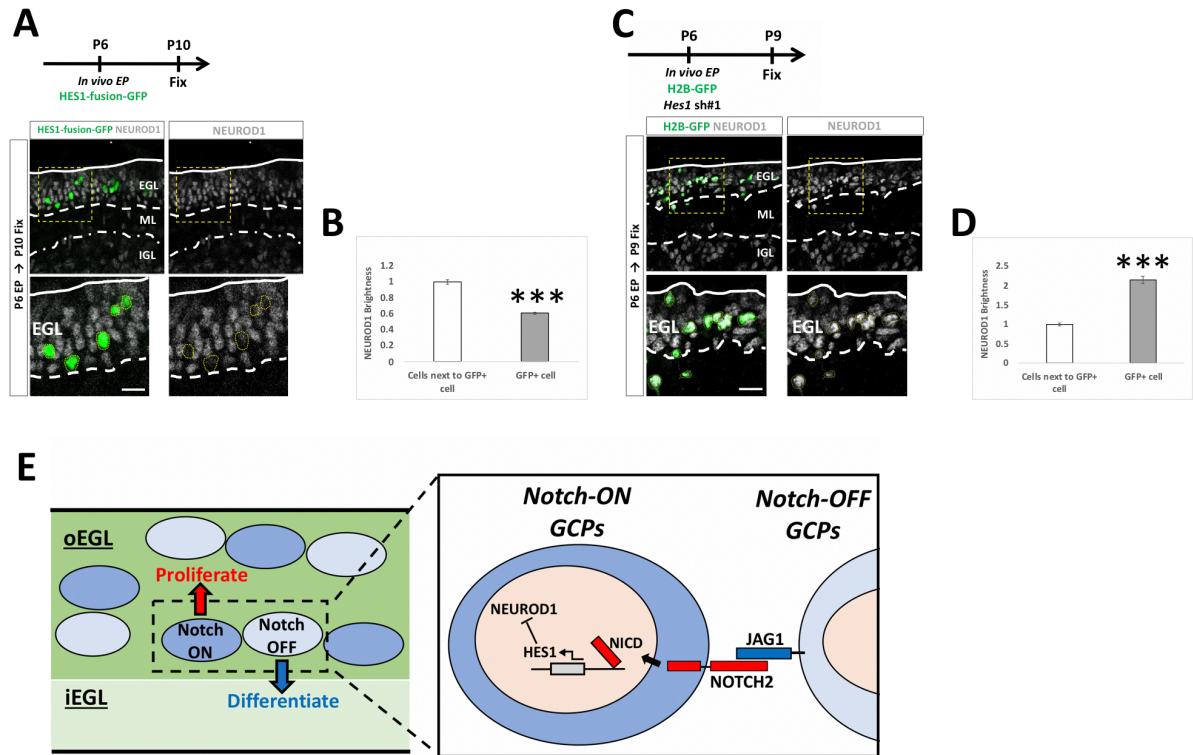


Fig. 10. GCP lineage において、HES1 は NEUROD1 の発現を抑制する

(A, B) P6 のマウス小脳に HES1-fusion-GFP を *in vivo* EP 法で遺伝子導入し、4 日後に固定した(A)。

NEUROD1 抗体で免疫染色を行い、GFP 陽性細胞と隣接する陰性細胞における NEUROD1 タンパク質の輝度を計測した。マウス個体数: 4 個体。グラフは平均値に標準誤差のエラーバーをつけた。統計処理は t 検定で行なっており、***は p 値が 0.001 以下であることを示している。Scale bars: A, 30 μ m, 10 μ m。

(C, D) P6 のマウス小脳に *Hes1* KD ベクターと pCAG-H2B-GFP ベクターと共に遺伝子導入し、3 日後に固定した(B)。NEUROD1 抗体で免疫染色を行い、GFP 陽性細胞と隣接する陰性細胞における NEUROD1 タンパク質の輝度を計測した。マウス個体数: 4 個体。グラフは平均値に標準誤差のエラーバーをつけた。統計処理は t 検定で行なっており、***は p 値が 0.001 以下であることを示している。Scale bars: A, 30 μ m, 10 μ m。

(E) GCPs 間における Notch シグナルのモデル図。小脳発生期の EGL では、Notch シグナルが ON(signal receiving) であるか OFF(signal sending) であるかによって、GCPs が二種類のグループに分けられる。Signal-sending GCPs に発現する JAG1 が、signal-receiving GCPs に発現する NOTCH2 と結合し、gamma secretase によって Notch intracellular domain (NICD) が切り出され、*Hes1* の発現が signal-receiving GCPs において活性化する。HES1 は NEUROD1 の発現を抑制し、GCPs を未分化で分裂能の高い状態に維持する機能を担っている。Signal-sending GCPs では HES1 の発現は低いために、GCs への分化が促される。(Adachi et al., *eNeuro*, 2021) より引用。

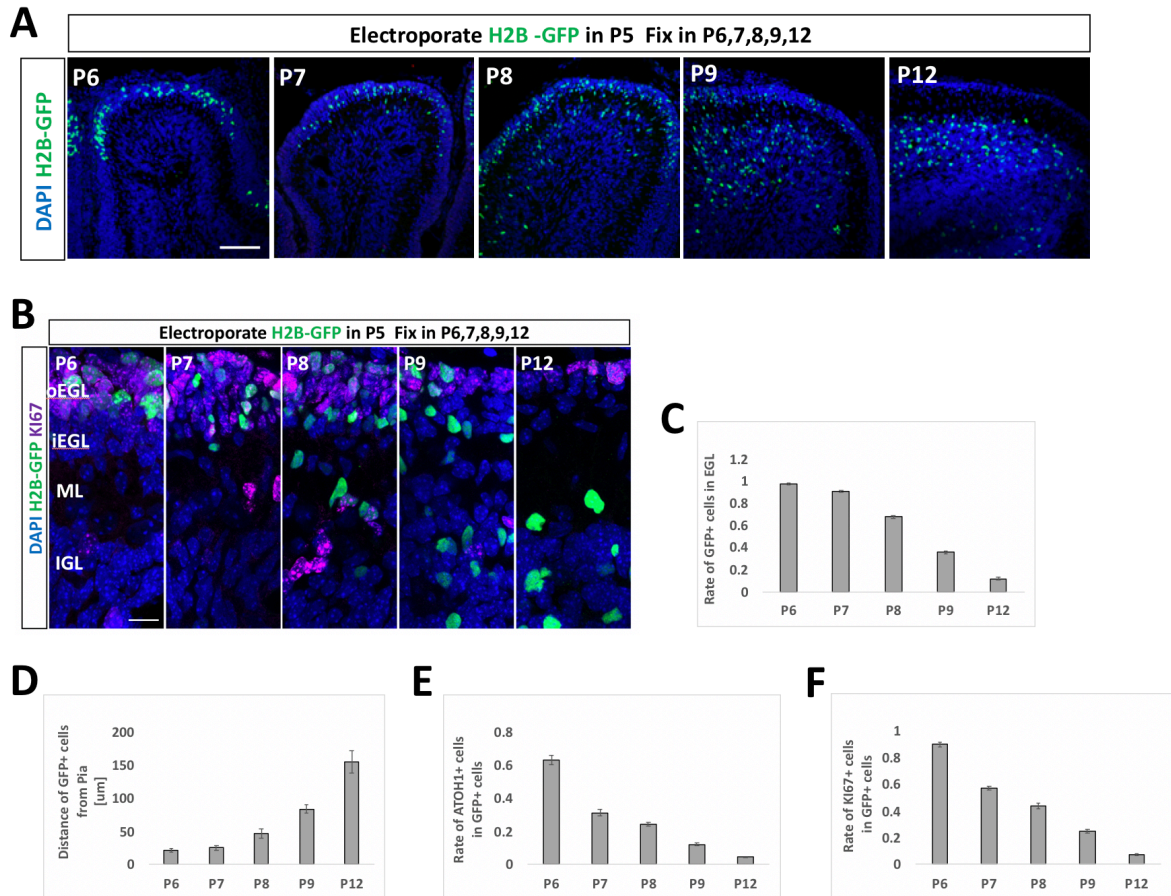


Fig. S1. *In vivo* EP 法により遺伝子導入された GCPs の動態

(A-F) P5 のマウス小脳に、pCAG-H2B-GFP ベクターを *in vivo* EP 法で遺伝子導入した。遺伝子導入されたマウスをいくつかの日齢(P6、P7、P8、P9、P12)に分けて固定し(A、B)、*in vivo* EP 法により遺伝子導入された GC lineage が、正常な GC lineage と同様に、EGL から IGL へと移動をするかどうかを調べた(C、D)。また、遺伝子導入された GC lineage が正常に分化するかどうかを調べるために、GFP 陽性細胞の ATOH1 陽性細胞割合(E)と、KI67 陽性細胞割合(F)も計測した。私の実験条件においては、*in vivo* EP 法による遺伝子導入では遺伝子は小葉の IV/V 葉か VI 葉に主に導入されるので、本研究における全ての解析は、小葉の IV/V 葉と VI 葉において行なっている。Scale bars: A, 80 μm , B, 15 μm 。(Adachi et al., *eNeuro*, 2021) より引用。

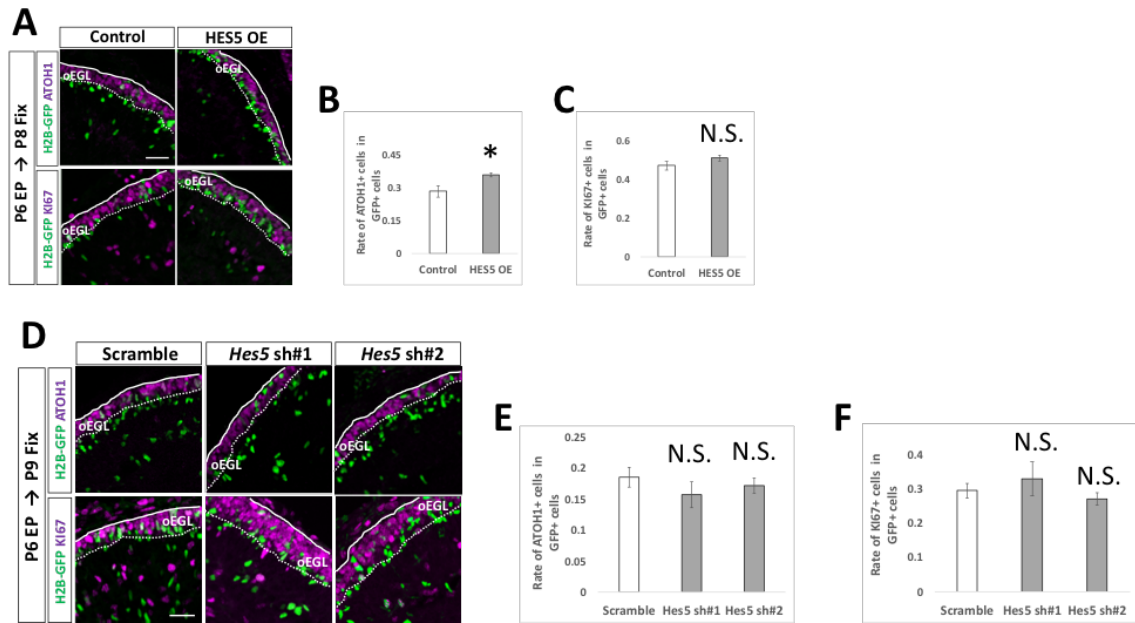


Fig. S2. 内在性の HES5 は GCPs の分化制御には影響を及ぼしていない

(A-F) P6 のマウス小脳に対して、HES5 の過剰発現ベクター(A-C)と、KD ベクター(D-F)を pCAG-H2B-GFP ベクターとともに遺伝子導入し、分化度合いへの影響を調べた。遺伝子導入された細胞の分化度合いは、ATOH1 タンパク質と Ki67 タンパク質の発現によって評価した(B, C, E, F)。pCAG-empty ベクター(A-C)と、Scramble ベクター(D-F)をそれぞれコントロールとして使用した。マウス個体数 : (A-C) 5 個体、(D-F) 4 個体。グラフは平均値に標準誤差のエラーバーをつけた。統計処理は t 検定で行なっており、*は p 値が 0.05 以下であることを示している。Scale bars: A, D 30 μ m。(Adachi et al., *eNeuro*, 2021) より引用。

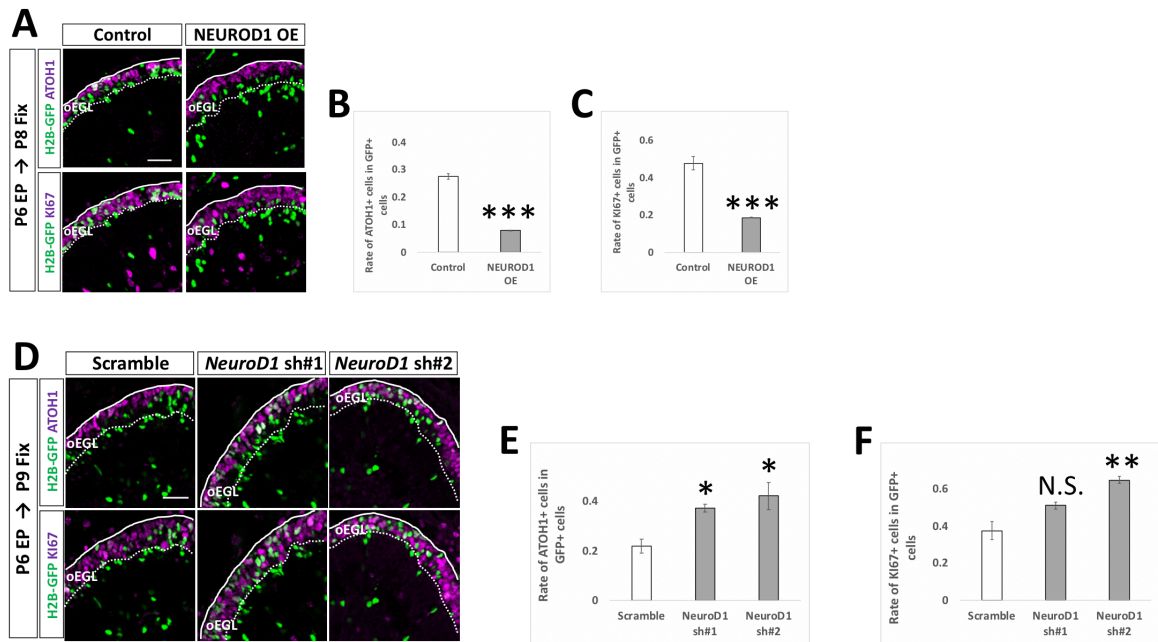


Fig. S3. NEUROD1 は GCPs から GCs への分化を促進する

(A-F) P6 のマウス小脳に対して、NEUROD1 の過剰発現ベクター(A-C)と、KD ベクター(D-F)を pCAG-H2B-GFP ベクターとともに遺伝子導入し、分化度合いへの影響を調べた。遺伝子導入された細胞の分化度合いは、ATOH1 タンパク質と Ki67 タンパク質の発現によって評価した(B, C, E, F)。pCAG-empty ベクター(A-C)と、Scramble ベクター(D-F)をそれぞれコントロールとして使用した。マウス個体数 : (A-F) 4 個体。グラフは平均値に標準誤差のエラーバーをつけた。統計処理は t 検定で行なっており、*は p 値が 0.05 以下であること、**は p 値が 0.01 以下であること、***は p 値が 0.001 以下であることを示している。Scale bars: A, D 30 μ m。(Adachi et al., *eNeuro*, 2021) より引用。

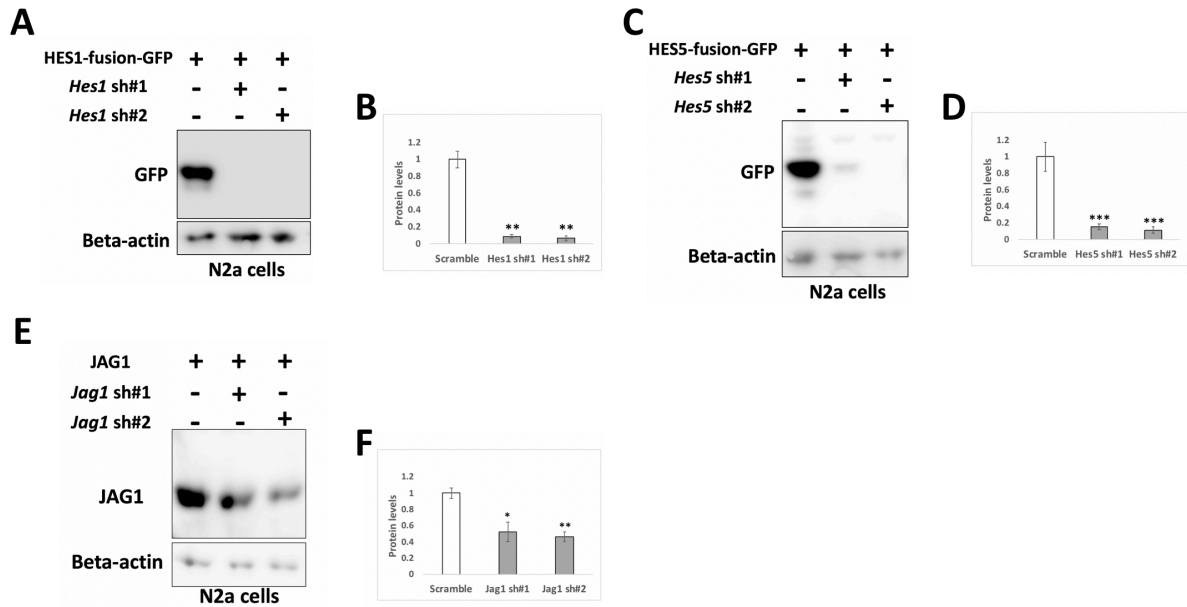


Fig. S4. 発現抑制ベクターの効果チェック

(A-D) *Hes1* (A, B)、*Hes5* (C, D) KD ベクターの効果チェックを、*in vitro*で行なった。CAG-HES1-fusion-GFP ベクター(A, B)、または、HES5-fusion-GFP ベクター(C, D)を、*Hes1* KD ベクター(A, B)または、*Hes5* KD ベクター(C, D)と共に Neuro2a 細胞にトランスフェクションさせ、GFP のタンパク質レベルをウェスタンブロッティングによって計測した。Beta-actin タンパク質の発現を、内在性コントロールとして使用した。Sample numbers: N=3。

(E, F) *Jag1* KD ベクターの効果チェックを、*in vitro*で行なった。pCAG-JAG1 ベクターと共に、*Jag1* KD ベクターを Neuro2a 細胞にトランスフェクションさせ、JAG1 タンパク質レベルをウェスタンブロッティングによって計測した。Beta-actin タンパク質の発現を、内在性コントロールとして使用した。Sample numbers: N=3。
(Adachi et al., *eNeuro*, 2021) より引用。

4. 考察

4.1 マウス小脳 GCPs/GCs における Notch 関連遺伝子、タンパク質の発現解析について

これまでの研究から、Notch 関連遺伝子やタンパク質が生後小脳に発現していることは、RT-PCR(Solecki et al., 2001)、*in situ* ハイブリダイゼーション(Tanaka et al., 1999; Irvin et al., 2001; Solecki et al., 2001; Stump et al., 2002; Irvin et al., 2004; Eiraku et al., 2005)、そして、免疫染色法(Tanaka et al., 2003)などの実験によって示されてきた。しかしながら、先行研究のうちいくつかのデータは互いに相反する結果となっており(Stump et al., 2002; Irvin et al., 2004; Eiraku et al., 2005)、どの Notch 関連遺伝子やタンパク質が小脳 GC lineage において発現しているのか、明確な結論は得られていなかった。本研究において私は、GC lineage の分化度合いによって、Notch 関連遺伝子の発現が変化しているのではないかと仮定し、GCPs と GCs に分けた状態での Notch 関連遺伝子、タンパク質の発現チェックを試みた。私は先行研究を参考に、GCP 様細胞、GC 様細胞の回収に成功し(Kutscher et al., 2020)、RT-PCR と免疫染色法によって、GCPs においては *Notch1*、*2*、*Hes1*、*Jag1* が強く発現しており、GCs においては、*Notch2*、*Hes5*、*Jag2* が強く発現していることを示した。この GCPs と GCs における Notch 関連遺伝子の発現の差は、先行研究におけるこれまでの相反する結果の一部を説明するものとなっていると考える。

4.2 マウス小脳における Notch 関連遺伝子の発現抑制、過剰発現実験について

複数の先行研究において、Notch 関連遺伝子がノックアウト(Knockout, KO)されたマウス

を用いた、Notch 遺伝子の生後小脳における機能解析結果が既に報告されている(Eiraku et al., 2005; Weller et al., 2006; Komine et al., 2007; Hiraoka et al., 2013)。GFAP-Cre マウスとそれぞれの flox マウスを掛け合わせることで、アストロサイト由来の *Notch1*、*2*、*RBP-J*、そして、*Dll1* を KO した研究では、GC lineage における表現型は確認されなかったが、バーグマングリア(Bergmann glias, BGs)の異所性、形態の乱れが確認された (Komine et al., 2007; Hiraoka et al., 2013)。En2-Cre マウスと *Jag1*-flox マウスの掛け合わせによって作られた、小脳全体において *Jag1* が KO されたマウスでは、同様に BGs の異所性と形態異常が確認され、更に、GCs の移動の遅れが確認され、P20 まで EGL が異常に残存するという結果が見られた(Weller et al., 2006)。しかしながら、*Jag1* 遺伝子は BGs と GC lineage、その両方に発現することが知られているので、BGs と GC lineage、どちらにおける *Jag1* の欠失が上述の表現型の原因となったかどうかは明らかではなかった(Weller et al., 2006)。本研究において、私は、*in vivo* EP 法を用いた GC lineage に対してのみの発現抑制実験を行うことで、GCPs に発現する *Jag1* 遺伝子が自律的に GCPs の分化に影響を及ぼすことを明確に示した。この結果は Weller らの論文で示された *Jag1* KO マウスの表現型のうち、少なくとも GC lineage の分化異常の一部に関しては、BGs ではなく、GCPs に発現する *Jag1* 遺伝子の欠損が関与していた可能性を示唆するものであると考える。

Eiraku らのグループは、non-canonical な Notch シグナルのリガンドである *Dner* を KO し、発生期の小脳の表現型を調べている(Eiraku et al., 2005, Eiraku et al., 2002)。Dner はブルキンエ細胞(Purkinje Cells, PCs)と iEGL の GCs に発現することが既に知られている膜タ

ンパク質である(Eiraku et al., 2005, Eiraku et al., 2002)。Dner KO マウスにおいては、BGs の異所性、形態の乱れが確認され、更に GC の分化・移動の遅延も確認された。筆者らは Dner KO マウスで見られた表現型について、PCs の DNER と BGs の NOTCH1 との間の Notch シグナルが制御する発生機構が乱れた結果であると結論づけている(Eiraku et al., 2005)。しかしながら、Dner 遺伝子は iEGL の GCs においても発現が確認されている為、GCs に発現する Dner が KO マウスで見られた GCs の表現型を自律的に制御し、BGs の形態や細胞体の位置を非自律的に制御している可能性も、十分にあると考えられる。

Solecki らによる GCPs/GCs 培養実験(*in vitro*)と小脳切片培養実験(*ex vivo*)では、NOTCH2 と HES1 の過剰発現によって、GCs の突起伸長が阻害されることがわかっている(Solecki et al., 2001)。この仕事は NOTCH2 と HES1 が GCs の分化度合いに影響を及ぼしうることを示した重要な仕事であるが、GC lineage における内在性の Notch 関連遺伝子がどのような機能を持つかは示せていない。また、*in vitro* と *ex vivo* のみの研究であったために、*in vivo* の GC lineage の発生において、Notch シグナルが重要であるかどうか議論されていなかった(Solecki et al., 2001)。

上述の通り、これまでの先行研究で見られた Notch 関連遺伝子の KO 実験の全ては、Notch 関連遺伝子を GCPs 特異的に欠損させた実験ではなかった。その為、得られた表現型が GCPs 由来の Notch 関連遺伝子が欠失した結果なのかそれともそれ以外の細胞の Notch 関連遺伝子が欠失した結果なのかどうか、判別することができなかった。本研究は、GCPs 由来の Notch 関連遺伝子を特異的に欠損させた初めての仕事であり、その結果、*in vivo* のマ

ウス小脳において、内在性の Notch 関連遺伝子が自律的に GCPs の分化状態を制御していることを証明した。更に、本研究では、一部の GCPs における遺伝子の発現のみを変化させる *in vivo* EP 法という技術の特性を利用し、隣接する GCPs において Notch 関連遺伝子の発現を異なるものにさせることに成功した(Fig. 9)。その結果、私は同種の GCPs 同士による Notch シグナルが、GCPs の分化度合いを制御していることを示した。これは、KO マウスを用いた研究では、発見できなかった結果であると考ええる。

4.3 マウス小脳 GCPs における Notch シグナルの発現振動について

初期のマウスの神経発生においては、*Hes1* は *Ascl1*(Achaete-Scute Family bHLH Transcription Factor 1)や *Ngn2*(Neurogenin 2)などの proneural 遺伝子の発現を抑制することによって、神経前駆細胞(neural progenitor cells, NPCs)の未分化性を保つことが知られている(Kageyama et al., 2007)。マウスの腹側終脳(ventral telencephalon)の NPCs においては、その発生過程において転写因子 *Hes1*、*Ascl1*、*Olig2* の発現が相互に抑制し合う形で振動することがわかっており、一度その揺らぎが偏り、発現する転写因子が固定されると、細胞の運命がアストロサイト、神経細胞、そして、オリゴデンドロサイトのいずれかに決定することが知られている(Imayoshi et al., 2013)。この転写因子の相互抑制的な発現振動は、単一の細胞集団の中に微細な相違を形成し、結果的に、異なる細胞集団の形成を導いていく分子機構であると考えられる。本研究では、小脳 GCPs の発生を制御する *Hes1* を介した Notch シグナルが、振動しているかどうかは示すことができていないが、腹側終脳の NPCs での

Hes1 の発現と同様に、振動している可能性は十分にあると考える。また、*Hes1* 同様に、*Notch2* 遺伝子の発現も振動していて、本研究で定義づけた二つのサブグループが、GCPs の遷移する二状態を切り取っただけの結果である可能性も十分に存在すると考える。しかしながら、*pHes1-d2GFP* ベクターで確認した *Hes1* のプロモーター活性が明確に GCPs を二峰性の集団に分離しており、中間値を示す GCPs が少なかったことから、発現の振動は存在しないか、あるいはたとえ振動していたとしても、Notch シグナルの ON から OFF、あるいは OFF から ON への遷移は、非常に早い速度で起こっているのではないかと考えられる。加えて、IGL に局在する成熟した GCs においては、*Hes1* プロモーター活性が確認できないことから、*Hes1* を介した Notch シグナルは、少なくとも GCs へと分化した段階で、OFF の状態に固定されるのではないかと考えられる。

4.4 Notch シグナルとその他のシグナル系間におけるクロストークについて

小脳 GCPs の発生は様々なシグナル経路によって厳密に制御されており、それぞれのシグナル経路が互いに相互作用し合うことにより、適切なタイミングでの分裂分化が成されていることが既に分かっている (Klein et al., 2001, Rios et al., 2004, Wang et al., 2019)。

分化した GCs から放出される BMP シグナルのリガンド BMP2 は、その発現によって GCPs の分裂能を低下させることが知られているが、この機能は、SHH シグナルを抑制する *Ptch1* の発現を上昇させ、エフェクターである *Smo*、*Gli1* の発現を低下させ、SHH シグナルの抑制を介して行われていることが *in vitro* で示されている (Rios et al., 2004)。WNT シ

グナルのリガンドである WNT3 もまた、non-canonical な下流である ERK1/2 の活性化を介して、SHH シグナルのエフェクターである *Gli1*、*2* の発現を低下させることがわかっている (Anne et al., 2013)。しかしながら、WNT3 は *Ptch1* や GCPs の未分化性の維持において重要な転写因子 *Atoh1* の発現も低下させる事が知られており、WNT3 による GCPs の分化誘導が、SHH シグナルを抑制した結果起こっているものかどうかは示されていない。また、WNT3 の発現は、GCPs において BMP リガンドの発現の低下も促進することから、WNT3 による SHH シグナルの抑制、GCPs の分化誘導制御は、BMP シグナルを介したものではないこともわかっている (Anne et al., 2013)。SDF-1a/CXCR4 シグナルは逆に、SHH シグナルを抑制する cAMP、PKA の発現を抑制することとで、SHH シグナルを亢進させ、GCPs の未分化性を保つ事がわかっている (Klein et al., 2001)。

以上のように、多くのシグナル経路間によるクロストークによって GCPs の分裂分化のバランスが制御されていることが知られており、その制御の多くが、SHH シグナルを基軸としたものである事がわかっている。Solecki らは、GCPs culture に対して SHH を添加し 18 時間培養すると、Notch シグナルのエフェクターである *Hes1* の転写量が増大することを示している (Solecki et al., 2001)。Solecki らはこの結果を踏まえて、Notch シグナルのみならず、SHH シグナルによっても *Hes1* を制御する機構が存在すると仮説を提示しているが、この結果は 18 時間という長時間の培養を経た後の解析結果であり、SHH 添加の結果、GCPs の未分化性が上昇して、結果的に Notch シグナルが活性化されたという間接的な上昇を見ている可能性を否定できていない。GCPs の発生制御機構において、Notch シグナル

の関与したクロストークに関しては、これまでほとんど報告がない状況であったと言える。

本研究において私は、GCPs の未分化性を制御する新たな制御機構として、GCPs 同士における JAG1 と NOTCH2 を介した Notch シグナルが存在することを示唆した。NOTCH2 と HES1 の下流で転写因子 NEUROD1 の発現が抑制されることは示したが、その他のシグナル経路とのクロストークに関しては、示唆する結果を得られていない。Notch シグナルがその下流において、GCPs の未分化性、分裂能の維持に寄与するシグナル(SHH シグナル、SDF-1/CXCR4 シグナル)を活性化させる機能を持つのか、あるいは、GCPs の分化を促進させるシグナル(BMP シグナル、WNT シグナル)を抑制させる機能を持つのか、今後の研究が待たれる。

4.5 SHH 型髄芽腫の形成、進展における Notch シグナルの寄与について

最も代表的な小児脳腫瘍の一つである SHH 型の髄芽腫(SHH subgroup medulloblastoma, SHH-MB)は、小脳の GC-lineage を原発として形成される脳腫瘍であることが知られている(Goodrich et al., 1997)。Eberhart らのグループは、ヒト髄芽腫サンプルにおいて、正常な小児脳と比較して *Notch1* 遺伝子の発現には差がないが、*Notch2* 遺伝子の発現は上昇していることを示している(Fan et al.,2004)。彼らはまた、*Notch2* が、SHH-MB 由来の培養細胞である DAOY の分裂能の維持に寄与していることも示している(Fan et al.,2004)。これらの観察結果は、少なくともその一部は、私が発見した GCPs の未分化性を保つ JAG1-NOTCH2-HES1 経路が、SHH-MB の形成、進展に関与している可能性を示唆する結果であ

ると考える。本研究は正常な小脳の発生における **Notch** シグナルの機能を解明したが、髄芽腫の形成、進展メカニズムの解明と、新たな治療ターゲットの発見にも、寄与する可能性は十分にあると考える。

5. 総括

Notch シグナルは脊椎、無脊椎動物問わず、様々な生物の組織の発生を制御する最も重要な分子機構の一つであると考えられている (Andersson et al., 2012)。Notch シグナルは小脳 GCPs の発生にも関与すると考えられてきたが (Solecki et al., 2001, Wang et al., 2019)、関連遺伝子の発現パターンや、その内在的な機能でさえ、未解明な点が多かった。本研究は、小脳 GCPs における Notch シグナルによる分化制御機構の詳細を、初めて示した仕事であると考えている。私は本研究には、少なくとも以下の 7 つの新規性が存在すると考えている。

- (1) これまで GC lineage における発現に対立する論文 (Stump et al., 2002; Irvin et al., 2004; Eiraku et al., 2005) が存在した Notch 関連遺伝子の発現について、GCPs 様細胞と GCs 様細胞を切り分けて解析したことで、明確に GCPs において発現する Notch 関連遺伝子 (*Notch1,2, Jag1, Hes1*) を同定したこと
- (2) 小脳発生において Notch シグナルを初めて *in vivo* で可視化したこと
- (3) これまで一様と思われていた EGL の GCPs が、Notch シグナルが ON であり、より未分化な性質を持つ細胞集団と、シグナルが OFF であり分化傾向のある細胞集団の二集団に分けられると示したこと
- (4) 先行研究において、小脳切片培養を用いた *ex vivo* における HES1 の過剰発現実験は行われていたが (Solecki et al., 2001)、それに対して、本研究では *in vivo* のマウスを用いて、HES1, 5, JAG1 などの Notch 関連遺伝子の過剰発現実験を行い、その機能を追求したこと

(5) 発現抑制ベクターを用いた機能喪失実験を、Notch 関連遺伝子について行うことで、

GCPs の内在性の Notch 関連遺伝子の機能を *in vivo* で初めて示したこと

(6) GCPs における Notch 関連遺伝子の機能を、cell-autonomous なものと、cell-non-

autonomous なものに初めて切り分け、GCPs 同士における Notch シグナルの存在を示したこと

(7) 転写因子 NEUROD1 の発現が HES1 によって抑制され、GCPs から GCs への適切な文

化タイミングが Notch シグナルによって制御されていることを示したこと

本研究における新規発見が、今後多くの神経発生、神経発生異常研究の一助となってくれることを期待したい。

また、本研究では小脳 GCPs における Notch シグナルの働きに関して、少なくとも以下の3点について、深めることができなかったと考えている。

(1) GCPs における転写因子 *Hes1* の発現は、マウスの腹側終脳(ventral telencephalon)の

NPCs における発現(Imayoshi et al., 2013)と同様に振動しているのか？もし、振動しているとするならば、NPCs における発現と同様に、他の転写因子と相互に抑制し合う形で振動しているのか？そして、その振動は、細胞の運命決定と共に、やがて収束していくのか？

(2) GCPs における Notch シグナルの発現は、GCPs の発生を制御するその他のシグナル

系、特に SHH シグナルとどのように相互作用(クロストーク)しているのか？Notch シグナルによる GCPs の未分化性の制御機構は、SHH シグナルが入っていない状態でも機

能しうる強力なシグナルなのか？

- (3) GCPs における Notch シグナルは、GCPs の発生異常由来の SHH 型髄芽腫、及びその他の発生異常疾患の形成にどれほど関与しているのか？ Notch シグナル関連遺伝子が、その発生異常疾患に対する分子標的薬となる可能性はあるのか？

本研究においては深められなかった以上の 3 点だが、神経発生、神経発生異常研究を進める上で、非常に重要で興味深い点だと考える。今後の更なる研究において、これらの疑問が解明されることを期待したい。

謝辞

本研究に関して、終始ご指導ご鞭撻を頂きました本学 井上貴文教授、国立精神・神経医療研究センター、病態生化学研究部星野幹雄部長、宮下聡先生に深く御礼申し上げます。また、博士論文を審査して頂きます本学大島登志男先生、仙波憲太郎先生、花嶋かりな先生に感謝致します。本研究を実施するにあたって必要不可欠であった3つのベクター(*pHes1-d2GFP*, *pHes5-d2GFP*, *Hes1p-venus*)をくださった京都大学の影山龍一郎先生、今吉格先生、山田真弓先生、論文執筆にあたって文章校閲を行ってくださった Ruth Yu 先生、そして、惜しみない協力と活発な議論をして頂きました早稲田大学、国立精神・神経医療研究センターの諸先生方、職員の方、先輩方、および、同期と後輩に、心からの御礼を申し上げます。

参考文献

- T. Adachi, S. Miyashita, M. Yamashita, M. Shimoda, K. Okonechnikov, L. Chavez, M. Kool, S. M. Pfister, T. Inoue, D. Kawauchi, M. Hoshino, Notch signaling between cerebellar granule cell progenitors, *eNeuro*, ENEURO.0468-20.2021. (2021).
- S. Anders, P. T. Pyl, W. Huber, HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data, *Bioinformatics*, 31: 166–169. (2015).
- E. R. Andersson, R. Sandberg, U. Lendahl, Notch signaling: simplicity in design, versatility in function, *Development*, 138: 3593–3612. (2011).
- M. K. Anna, D. C. Michael, H. R. David, N-myc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors, *Development*, 130: 15–28. (2003).
- M. A. Basson, R. J. Wingate, Congenital hypoplasia of the cerebellum: developmental causes and behavioral consequences, *Front Neuroanat*, 7-29. (2013).
- J. A. Campos-Ortega, V. Hartenstein, The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. (1985).
- CH. Chang, M. Zanini, H. Shirvani, JS. Cheng, H. Yu, CH. Feng, AL. Mercier, SY. Hung, A. Forget, CH. Wang, SM. Cigna, IL. Lu, WY. Chen, S. Leboucher, WJ Wang, M. Ruat, N. Spassky, JW. Tsai, O Ayrault, Atoh1 Controls Primary Cilia Formation to Allow for SHH-Triggered Granule Neuron Progenitor Proliferation, *Dev Cell*, 48: 184-199. (2019).
- A. Chenn, C. A. Walsh, Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors, *Science*, 297: 365–369. (2002).
- V. Chizhikov, K. J. Millen, Development and malformations of the cerebellum in mice. *Mol Genet Metab*, 80: 54–65. (2003).
- J. P. Concordet, K. E. Lewis, J. W. Moore, L. V. Goodrich, R. L. Johnson, M. P. Scott, P. W. Ingham, Spatial regulation of a zebrafish patched homologue reflects the roles of sonic hedgehog and protein kinase A in neural tube and somite patterning, *Development*, 122: 2835–2846. (1996).
- N. Dahmane, A. R. Altaba, Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum, *Development*, 126: 3089–3100. (1999).
- A. Dobin, C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, T. R. Gingeras, STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinformatics*, 29: 15–21. (2013).
- M. Eiraku, Y. Hirata, H. Takeshima, T. Hirano, M. Kengaku, Delta/Notch-like Epidermal Growth Factor (EGF)-related Receptor, a Novel EGF-like Repeat-containing Protein Targeted to Dendrites of Developing and Adult Central Nervous System Neurons, *J Biol Chem*, 277: 25400–25407. (2002).

- M. Eiraku, A. Tohgo, K. Ono, M. Kaneko, K. Fujishima, T. Hirano, M. Kengaku, DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development, *Nat Neurosci*, 8: 873–880. (2005).
- D. J. Epstein, E. Marti, M. P. Scott, A. P. McMahon, Antagonizing cAMP-dependent protein kinase A in the dorsal CNS activates a conserved Sonic hedgehog signaling pathway. *Development*, 122: 2885–2894. (1996).
- X. Fan, I. Mikolaenko, I. Elhassan, X. Z. Ni, Y. Wang, D. Ball, D. J. Brat, A. Perry, C. G. Eberhart, Notch1 and Notch2 Have Opposite Effects on Embryonal Brain Tumor Growth, *Cancer Res*, 64: 7787–7793. (2004).
- K. Gomi, M. R. Staudt, J. Salit, R. J. Kaner, J. Heldrich, A. M. Rogalski, V. Arbelaez, R. G. Crystal, M. S. Walters, JAG1-Mediated Notch Signaling Regulates Secretory Cell Differentiation of the Human Airway Epithelium, *Stem Cell Rev*, 12: 454–463. (2016).
- L. V. Goodrich, L. Milenković, K. M. Higgins, M. P. Scott, Altered Neural Cell Fates and Medulloblastoma in Mouse Patched Mutants, *Science*, 277: 1109–1113. (1997).
- P. Haldipur, I. Sivaprakasam, V. Periasamy, S. Govindan, S. Mani, Asymmetric cell division of granule neuron progenitors in the external granule layer of the mouse cerebellum, *Biology Open*, 4: 865–872. (2015).
- B. A. Hatton, P. S. Knoepfler, A. M. Kenney, D. H. Rowitch, I. M. D. Alborán, J. M. Olson, R. N. Eisenman, N-myc is an essential downstream effector of Shh signaling during both normal and neoplastic cerebellar growth, *Cancer Res*, 66: 8655–8661. (2006).
- A. Herrera, M. Saade, A. Menendez, E. Marti, S. Pons, Sustained Wnt/ beta-catenin signalling causes neuroepithelial aberrations through the accumulation of aPKC at the apical pole, *Nat Commun*, 5: 4168. (2014).
- Y. Hiraoka, O. Komine, M. Nagaoka, N. Bai, K. Hozumi, K. Tanaka, Delta-like 1 regulates Bergmann glial monolayer formation during cerebellar development, *Mol Brain*, 21: 6–25. (2013).
- M. Hynes, J. A. Porter, C. Chiang, D. Chang, M. Tessier-Lavigne, P. A. Beachy, A. Rosenthal, Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron*, 15: 35–44. (1995).
- I. Imayoshi, A. Isomura, Y. Harima, K. Kawaguchi, H. Kori, H. Miyachi, T. Fujiwara, F. Ishidate, R. Kageyama, Oscillatory Control of Factors Determining Multipotency and Fate in Mouse Neural Progenitors, *Science*, 6: 1203–1208. (2013).
- DK. Irvin, SD. Zurcher, T. Nguyen, G. Weinmaster, HI. Kornblum, Expression patterns of Notch1, Notch2, and Notch3 suggest multiple functional roles for the Notch-DSL signaling system during brain development, *J Comp Neurol*, 23: 167–181. (2001).
- DK. Irvin, I. Nakano, A. Paucar, HI. Kornblum, Patterns of Jagged1, Jagged2, Delta-Like 1 and Delta-Like 3 Expression During Late Embryonic and Postnatal Brain Development Suggest Multiple Functional Roles in Progenitors and Differentiated Cells, *J Neurosci Res*, 75: 330–343. (2004).

- R. Kageyama, T. Ohtsuka, T. Kobayashi, The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis, *Development*, 134: 1243–1251. (2007).
- T. Kawauchi, K. Chihama, Y. Nabeshima, M. Hoshino, Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration, *Nat Cell Biol*, 8: 17–26. (2006).
- D. Kawauchi¹, G. Robinson, T. Uziel, P. Gibson, J. Rehg, C. Gao, D. Finkelstein, C. Qu, S. Pounds, D. W. Ellison, R. J. Gilbertson, M. F. Roussel, A mouse model of the most aggressive subgroup of human medulloblastoma, *Cancer Cell*, 21: 168–180. (2012).
- A. M. Kenney, M. D Cole, D. H Rowitch, Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors, *Development*, 130: 15–28. (2003).
- R. S. Klein, J. B. Rubin, H. D. Gibson, E. N. DeHaan, X. A. Hernandez, R. A. Segal, A. D. Luster, SDF-1 α induces chemotaxis and enhances Sonic hedgehog-induced proliferation of cerebellar granule cells, *Development*, 128: 1971–1981. (2001).
- J. Kohyama, A. Tokunaga, Y. Fujita, H. Miyoshi, T. Nagai, A. Miyawaki, K. Nakao, Y. Matsuzaki, H. Okano, Visualization of spatiotemporal activation of Notch signaling: Live monitoring and significance in neural development, *Dev Biol*, 1: 311–325. (2005).
- O. Komine, M. Nagaoka, K. Watase, DH. Gutmann, K. Tanigaki, T. Honjo, F. Radtke, T. Saito, S. Chiba, K. The monolayer formation of Bergmann glial cells is regulated by Notch/RBP-J signaling. *Dev Biol*, 311: 238–250. (2007).
- L. M. Kutscher, K. Okonechnikov, N. V. Batora, J. Clark, P. B. G. Silva, M. Vouri, S. v. Rijn, L. Sieber, B. Statz, M. D. Gearhart, N. Mack, B. A. Orr, A. Korshunov, A. L. Mercier, O. Ayrault, M. Kool, V. J. Bardwell, S. M. Pfister¹, P. A. Northcott, D. Kawauchi, Functional loss of a non-canonical BCOR-PRC1.1 complex accelerates SHH-driven medulloblastoma formation, *Genes Dev*, 1: 1161–1176. (2020).
- E. P. Lackey, D. H. Heck, R. V. Sillitoe, Recent advances in understanding the mechanisms of cerebellar granule cell development and function and their contribution to behavior, *F1000Res*, 7: 1142. (2018).
- R. Lehmann, F. Jimenez, U. Dietrich, J. A. Campos-Ortega, On the Phenotype and Development of Mutants of Early Neurogenesis in *Drosophila melanogaster*, *Wilehm Roux Arch Dev Biol*, 192: 62–74. (1983).
- K. Leto, M. Arancillo, E. B. Becker, A. Buffo, C. Chiang, B. Ding, W. B. Dobyns, I. Dusart, P. Haldipur, M. E. Hatten, Consensus Paper: Cerebellar Development, *Cerebellum*, 15: 789–828. (2016).
- P. M. Lewis, A. G. Linde, R. Smeyne, A. Kottmann, A. P. McMahon, Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum, *Dev Biol*, 270: 393–410. (2004).

- A. Lorenz, M. Deutschmann, J. Ahlfeld, C. Prix, A. Koch, R. Smits, Severe alterations of cerebellar cortical development after constitutive activation of Wnt signaling in granule neuron precursors, *Mol Cell Biol*, 31: 3326–3338. (2011).
- A. Louvi, S. A. Tsakonas, Notch signaling in vertebrate neural development, *Nat Rev Neurosci*, 7: 93–102. (2006).
- M. I. Love, S. Anders, W. Huber, Differential analysis of count data – the DESeq2 package, *Genome Biol*, 15: 550. (2014).
- L. Luistro, W. He, M. Smith, K. Packman, M. Vilenchik, D. Carvajal, J. Roberts, J. Cai, W. B-Fessler, H. Hilton, M. Linn, A. Flohr, R. J. Røtne, H. Jacobsen, K. Glenn, D. Heimbrook, J. F. Boylan, Preclinical Profile of a Potent γ -Secretase Inhibitor Targeting Notch Signaling with *In vivo* Efficacy and Pharmacodynamic Properties, *Cancer Res*, 69: 7672–7680. (2009).
- Q. Ma, D. Jones, P. R. Borghesani, R. A. Segal, T. Nagasawa, T. Kishimoto, R. T. Bronson, T. A. Springer, Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 9448–9453. (1998).
- S. Mani, S. Radhakrishnan, R. N. Cheramangalam, S. Harka, S. Rajendran, N. Ramanan, Shh-Mediated Increase in β -Catenin Levels Maintains Cerebellar Granule Neuron Progenitors in Proliferation, *Cerebellum*, 5: 645–664. (2020).
- K. McGrath, A. D. Koniski, K. M. Maltby, J. K. McGann, J. Palis, Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4, *Dev Biol*, 213: 442–456. (1999).
- S. Miyashita, T. Adachi, M. Yamashita, T. Sota, M. Hoshino, Dynamics of the cell division orientation of granule cell precursors during cerebellar development, *Mech Dev*, 147: 1–7. (2017).
- S. Miyashita, T. Owa, Y. Seto, M. Yamashita, S. Aida, T. Nishioka, K. Kaibuchi, Y. Kawaguchi, S. Taya, M. Hoshino, CyclinD1 controls development of cerebellar granule cell progenitors through phosphorylation and stabilization of ATOH1, *EMBO J*, in press. (2021).
- N. Moreno, C. Schmidt, J. Ahlfeld, J. Poschl, S. Dittmar, S. M. Pfister, Loss of Smar proteins impairs cerebellar development. *J Neurosci*, 34: 13486–13491. (2014).
- Y. Naito, J. Yoshimura, S. Morishita, K. Ui-Tei, siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect, *BMC Bioinformatics*, 10: 392. (2009).
- T. Ohtsuka, I. Imayoshi, H. Shimojo, E. Nishi, R. Kageyama, S. K. McConnell, Visualization of embryonic neural stem cells using Hes promoters in transgenic mice, *Mol Cell Neurosci*, 31: 109–122. (2006).
- K. Okonechnikov, A. Conesa, F. G. Alcalde, Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data, *Bioinformatics*, 32: 292–294. (2016).

- T. Owa, S. Taya, S. Miyashita, M. Yamashita, T. Adachi, K. Yamada, M. Yokoyama, S. Aida, T. Nishioka, Y. U. Inoue, R. Goitsuka, T. Nakamura, T. Inoue, K. Kaibuchi, M. Hoshino, Meis1 Coordinates Cerebellar Granule Cell Development by Regulating Pax6 Transcription, BMP Signaling and Atoh1 Degradation, *J Neurosci*, 38: 1277–1294. (2018).
- N. Pan, I. Jahan, J. E. Lee, B. Fritsch, 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: 407–428. (2009).
- I. Rios, R. A. Rodríguez, E. Martí, S. Pons, Bmp2 antagonizes sonic hedgehog-mediated proliferation of cerebellar granule neurones through Smad5 signalling, *Development*, 131: 3159–3168. (2004).
- K. Schilling, Moving into shape: cell migration during the development and histogenesis of the cerebellum. *Histochem Cell Biol.* 150: 13–36. (2018).
- Y. Seto, T. Nakatani, N. Masuyama, S. Taya, M. Kumai, Y. Minaki, A. Hamaguchi, Y. U. Inoue, T. Inoue, S. Miyashita, T. Fujiyama, M. Yamada, H. Chapman, K. Campbell, M. A. Magnuson, C. V. Wright, Y. Kawaguchi, K. Ikenaka, H. Takebayashi, S. Ishiwata, Y. Ono, M. Hoshino, Temporal identity transition from Purkinje cell progenitors to GABAergic interneuron progenitors in the cerebellum, *Nat Commun*, 5: 3337. (2014).
- A. Shitamukai, D. Konno, F. Matsuzaki, Oblique Radial Glial Divisions in the Developing Mouse Neocortex Induce Self-Renewing Progenitors outside the Germinal Zone That Resemble Primate Outer Subventricular Zone Progenitors. *J Neurosci*, 31: 3683–3695. (2011).
- R. D. Shiraishi, S. Miyashita, M. Yamashita, T. Adachi, M. M. Shimoda, T. Owa, M. Hoshino, Expression of transcription factors and signaling molecules in the cerebellar granule cell development, *Gene Expr Patterns*, 34: 119068. (2019).
- DJ. Solecki, XL. Liu, T. Tomoda, Y. Fang, ME. Hatten, Activated Notch2 Signaling Inhibits Differentiation of Cerebellar Granule Neuron Precursors by Maintaining Proliferation, *Neuron*, 30: 557–568. (2001).
- T. Stuart, A. Butler, P. Hoffman, M. Stoeckius, P. Smibert, R. Satija, Comprehensive Integration of Single-Cell Data, *Cell*, 177: 1888–1902. (2019).
- G. Stump, A. Durrer, AK. Klein, S. Lütolf, U. Suter, V. Taylor, Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain, *Mech Dev*, 114: 153–159. (2002).
- M. Tanaka, Y. Kadokawa, Y. Hamada, T. Marunouchi, Notch2 expression negatively correlates with glia differentiation in the postnatal mouse brain. *J Neurobiol*, 41: 524–539. (1999).
- M. Tanaka, T. Marunouchi, Immunohistochemical localization of Notch receptors and their ligands in the postnatally developing rat cerebellum, *Neurosci Lett*, 353: 87–90. (2003).
- KC. Thomas, XF. Zheng, F. G. Suarez, JM. Raftery, KGR. Quinlan, N. Yang, KN. North, PJ. Houweling, Evidence based selection of commonly used RT-qPCR reference genes for the analysis of mouse skeletal muscle, *PLoS ONE*, 9: e88653. (2014).

- S. A. Tsakonas, M. D. Rand, R. J. Lake, Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development, *Science*, 284: 770–776. (1999).
- A. R. Ungar, R. T. Moon, Inhibition of protein kinase A phenocopies ectopic expression of hedgehog in the CNS of wild-type and cyclops mutant embryos. *Dev Biol*, 178: 186–191. (1996).
- L. Wang, Y. Liu, Signaling pathways in cerebellar granule cells development, *Am J Stem Cells*, 8: 1–6. (2019).
- M. Weller, N. Krautler, N. Mantei, U. Suter, V. Taylor, *Jagged1* ablation results in cerebellar granule cell migration defects and depletion of Bergmann glia. *Dev Neurosci*, 28: 70–80, (2006).
- R. W. Williams, K. Herrup, The Control of Neuron Number. *Annu Rev Neurosci*, 11: 423–453. (1988).
- G. J. Woodhead, C. A. Mutch, E. C. Olson, A. Chenn, Cell-autonomous beta-catenin signaling regulates cortical precursor proliferation, *J Neurosci*, 26: 12620–12630. (2006).
- M. Yamada, Y. Seto, S. Taya, T. Owa, Y. U. Inoue, T. Inoue, Y. Kawaguchi, Y. Nabeshima, M. Hoshino, Specification of spatial identities of cerebellar neuron progenitors by *ptf1a* and *atoh1* for proper production of GABAergic and glutamatergic neurons, *J Neurosci*, 34: 4786–4800. (2014).
- H. Yang, Q. Zhua, J. Chenga, Y. Wua, M. Fana, J. Zhang, H. Wu, Opposite regulation of Wnt/ β -catenin and Shh signaling pathways by Rack1 controls mammalian cerebellar development, *Proc Natl Acad Sci USA*, 116: 4661–4670. (2019).
- R. Yang, M. Wang, J. Wang, X. Huang, R. Yang, W. Q. Gao, Cell Division Mode Change Mediates the Regulation of Cerebellar Granule Neurogenesis Controlled by the Sonic Hedgehog Signaling, *Stem Cell Reports*, 10: 816–828. (2015).
- H. Zhao, O. Ayrault, F. Zindy, J. H. Kim, M. F. Roussel, Post-transcriptional down-regulation of *Atoh1/ Math1* by bone morphogenic proteins suppresses medulloblastoma development, *Genes Dev*, 22: 722–727. (2008).
- Y. R. Zou, A. H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi, D. R. Littman, Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development, *Nature*, 393: 595–599. (1998).

研究業績

論文

1. **Toma Adachi**, Takashi Hayashi “Evolutionarily conserved phosphorylation and palmitoylation-dependent regulation of dopamine D1-like receptors in vertebrates” *Neurotransmitter*, 3. (2016).
2. Satoshi Miyashita*, **Toma Adachi***, Mariko Yamashita, Takayuki Sota, Mikio Hoshino ***These authors contributed equally.** “Dynamics of the cell division orientation of granule cell precursors during cerebellar development” *Mechanisms of Development*, 147: 1-7. (2017).
3. Tomoo Owa, Shinichiro Taya, Satoshi Miyashita, Mariko Yamashita, **Toma Adachi**, Koyo Yamada, Miwa Yokoyama, Shogo Aida, Tomoki Nishioka, Yukiko U Inoe, Ryo Goitsuka, Takuro Nakamura, Takayoshi Inoue, Kozo Kaibuchi, Mikio Hoshino “Meis1 coordinates cerebellar granule cell development by regulating Pax6 transcription, BMP signaling and Atoh1 degradation” *The Journal of Neuroscience*, 38: 1277–1294. (2018)..
4. Ryo D. Shiraishi, Satoshi Miyashita, Mariko Yamashita, **Toma Adachi**, Mana M. Shimoda, Tomoo Owa, Mikio Hoshino “Expression of transcription factors and signaling molecules in the cerebellar T granule cell development” *Gene Expression Patterns*, 34: 119068. (2019).
5. Mariko Yamashita, Tomoo Owa, Ryo Shiraishi, **Toma Adachi**, Kentaro Ichijo, Shinichiro Taya, Satoshi Miyashita, Mikio Hoshino “The role of SCF^{Skp2} and SCF ^{β -TrCP1/2} in the cerebellar granule cell precursors” *Genes to Cells*, 25: 796-810. (2020).
6. **Toma Adachi**, Satoshi Miyashita, Mariko Yamashita, Mana Shimoda, Konstantin Okonechnikov, Lukas Chavez, Marcel Kool, Stefan M. Pfister, Takafumi Inoue, Daisuke Kawauchi, Mikio Hoshino “Notch signaling between cerebellar granule cell progenitors” *eNeuro*, ENEURO.0468-20.2021. (2021).
7. Tuyu Zheng, David Ghasemi, Konstantin Okonechnikov, Andrey Korshunov, Martin Sill, Kendra Maass, Patricia Benites Goncalves da Silva, Marina Ryzhova, Johannes Gojo, Damian Stichel, Amir Arabzade, Robert Kupp, Julia Benzel, Shinichiro Taya, **Toma Adachi**, Ryo Shiraishi, Nicolas Gerber, Dominik Sturm, Jonas Ecker, Philipp Sievers, Florian Selt, Rebecca Chapman, Christine Haberler, Dominique Figarella-Branger, Guido Reifenberger, Gudrun Fleischhack, Stefan Rutkowski, Andrew Donson, Vijay Ramaswamy, David Capper, David Ellison, Christel Herold-Mende, Ulrich Schueller, Sebastian Brandner, Pablo Hernáiz

Driever, Johan Kros, Matija Snuderl, Till Milde, Richard Grundy, Mikio Hoshino, Stephen Mack, Richard Gilbertson, David Jones, Marcel Kool, Andreas von Deimling, Stefan Pfister, Felix Sahm, Daisuke Kawauchi, Kristian Pajtlar “Cross-species genomics reveals oncogenic dependencies in ZFTA/C11orf95 fusion-positive supratentorial ependymomas” *Cancer Discovery*, in press.

学会発表

1. **Toma Adachi** “Analysis of cleavage plane and daughter cell fate of cerebellar granule cell precursors” 第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学会大会合同年会, 2016.9, 福岡, ポスター発表
2. **Toma Adachi**, “Analysis of cleavage plane and daughter cell fate of cerebellar granule cell precursors” 第 39 回分子生物学会年会, 2016.12, 神奈川, ポスター発表
3. **Toma Adachi**, “Analysis of cleavage plane and daughter cell fate of cerebellar granule cell precursors” 第 10 回神経発生討論会, 2017.3, 宮城, ポスター発表
4. **Toma Adachi**, “Analysis of cleavage plane and daughter cell fate of cerebellar granule cell precursors” 第 40 回日本神経科学大会, 2017.7, 千葉, ポスター発表
5. **Toma Adachi**, “Analysis of cleavage plane and daughter cell fate of cerebellar granule cell precursors” 第 40 回分子生物学会年会, 2017.12, 兵庫, ポスター発表
6. **Toma Adachi**, “小脳顆粒細胞をモデルとした神経前駆細胞の分裂面方向と娘細胞の運命決定メカニズムの解明” 次世代脳プロジェクト冬のシンポジウム 2017, 2017.12, 東京, ポスター発表
7. **Toma Adachi**, “小脳顆粒細胞における分裂面と娘細胞の運命決定メカニズムの解析” 第 41 回分子生物学会年会、2018.11, 神奈川、ポスター発表
8. **Toma Adachi**, “小脳顆粒細胞における分裂面と娘細胞の運命決定メカニズムの解析” 次世代脳冬のシンポジウム 2018、2018.12, 東京、ポスター発表
9. **Toma Adachi**, “生後小脳 EGL における Notch signal による顆粒前駆細胞の未分化性制御機構について” NEURO2019, 2019.7, 新潟、口頭発表
10. **Toma Adachi**, “Notch signaling in the cerebellar granule cell development” Society for Neuroscience 2019, 2019.10、Chicago, ポスター発表

受賞経歴

1. 第 38 回日本生物学的精神医学会、第 59 回日本神経化学会大会合同年会
優秀発表賞 受賞
2. 次世代脳プロジェクト冬のシンポジウム 2017
若手優秀発表賞 受賞
3. 日本学生支援機構 第一種奨学金(大学院修士課程) 特に優れた業績による返還免除(半額)
4. NEURO2019
優秀発表賞

研究費

1. 特別研究員奨励費 **DC1** 2018 年度-2020 年度