

みにれびゅう

## 成体神経幹細胞の未分化性維持機構と発生起源について

今泉 結, 川口 大地, 古舘 昌平, 後藤 由季子

### 1. はじめに

我々哺乳類の脳では、脳発生が完了した後も生涯にわたってニューロンが新生される<sup>1)</sup>。このニューロン新生を担うのは成体神経幹細胞と呼ばれる細胞であり、側脳室周囲の脳室下帯と海馬の歯状回顆粒細胞下帯の少なくとも2か所に存在する(図1A)。それぞれの場所で産み出されたニューロンは移動したのちに、嗅球、海馬の神経回路へと組み込まれ再編成される。そして、嗅覚や空間関連の学習、記憶、本能行動の調節、ストレスからの回復、脳組織の損傷応答などに貢献することが、これまでマウスを用いた実験の報告などにより明らかにされてきた。これら成体のニューロン新生が異常になると、ヒトの場合でも記憶障害やうつ病などの精神疾患の原因となる可能性も指摘されている。このように、成体のニューロン新生は脳の正常な機能にとって、非常に重要であることが示唆されてきたにも関わらず、生涯という長期間にわたってニューロン新生を可能にしている機構に関しては近年に至るまで未解明なところが多かった。成体神経幹細胞はどのようにその数を保ち未分化性を保持しているのだろうか？そもそも成体神経幹細胞はどのようにして産み出されるのだろうか？

本稿では、最近の知見によって明らかにされてきた成体神経幹細胞の維持機構・発生起源を中心に概説する。

### 2. 成体神経幹細胞の未分化性維持機構

胎生期の神経系前駆細胞は、多数のニューロンとグリア細胞を短期的に産み出し脊髄や脳を形成する。これらの細胞は出生後グリア細胞を産み終わった後にやがて消滅する。一方、脳室下帯と海馬歯状回に存在する成体神経幹細胞は、未分化性を維持しながら一部が活性化し、ニューロ

ンやグリア細胞を生涯にわたって産み出し続ける。ではこれら成体神経幹細胞は長期間にわたってどのように未分化性を維持しているのだろうか？

従来の知見によりこの長期間にわたる未分化性の維持には、細胞内外のさまざまな因子が重要な役割を果たすことが明らかにされてきた<sup>1,2)</sup>。細胞内因子としては細胞周期抑制遺伝子、転写因子、エピジェネティック制御因子があげられる。成体神経幹細胞は、他の多くの組織幹細胞と同様、細胞周期のG0/G1期(静止期)にあり、まれにしか分裂しない。そして「分裂回数を減らし静止期にとどめておくことが成体神経幹細胞の枯渇を防ぎ、長期的な維持を可能にしている」と考えられている。このことはp21, p57を含む細胞周期抑制遺伝子が海馬あるいは側脳室下帯の成体神経幹細胞で高発現しており、それらを欠損させると、成体神経幹細胞は一過的に増殖し活性化したあと早期枯渇するという知見からも支持されている<sup>3,4)</sup>。一方、転写因子であるSox2, TLX, Id1なども成体神経幹細胞の増殖能の保持や未分化状態の維持に貢献する<sup>5-7)</sup>。たとえばShhの制御領域に直接結合するSox2を成体となった後に欠損させると、静止期、分裂中、または分化途中にある海馬成体神経幹細胞がすべて減少した<sup>5)</sup>。そのためSox2は成体神経幹細胞の維持に必須であることが示唆されている。さらにMbd1などのDNAメチル化制御因子や、Bmi1などのポリコム群因子も成体神経幹細胞の運命制御を行うと考えられている。

成体造血幹細胞や、皮膚や腸管における幹細胞においては周辺の特異な微小環境(ニッチ)からのシグナルによって未分化性が保たれることが知られている。成体神経幹細胞にも同様のニッチがあり、脳室下帯においては、上衣細胞、アストロサイト、成体神経幹細胞の子孫細胞(一過的増殖細胞、ニューロブラスト)、血管内皮細胞などのさまざまな細胞との接触を介し運命制御を受けることが示唆されてきた(図1A)。また、成体神経幹細胞ではNotch, Shh, Wnt, BMPなどのシグナル経路が活性化しており、協調しあって分化状態を制御することが知られている<sup>1,2)</sup>。たとえばNotchシグナルの細胞内伝達因子であるRbpjのコンディショナルノックアウトマウスにおいては成体神経幹細胞が減少するため、成体神経幹細胞の維持にはNotchシグナルが必須であることが示唆されている<sup>8,9)</sup>。ではどのような分子メカニズムによってニッチからシグナルを受け取

東京大学大学院薬学系研究科分子生物学教室(〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1 薬学部本館3階333-338号室)

Embryonic origin of adult neural stem cells

Yui Imaizumi, Daichi Kawaguchi, Shohei Furutachi and Yukiko Gotoh (Laboratory of Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Main Bldg. 3F No. 333-338, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)  
DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.88{F\_PAGE4ケタ}

© 2016 公益社団法人日本生化学会

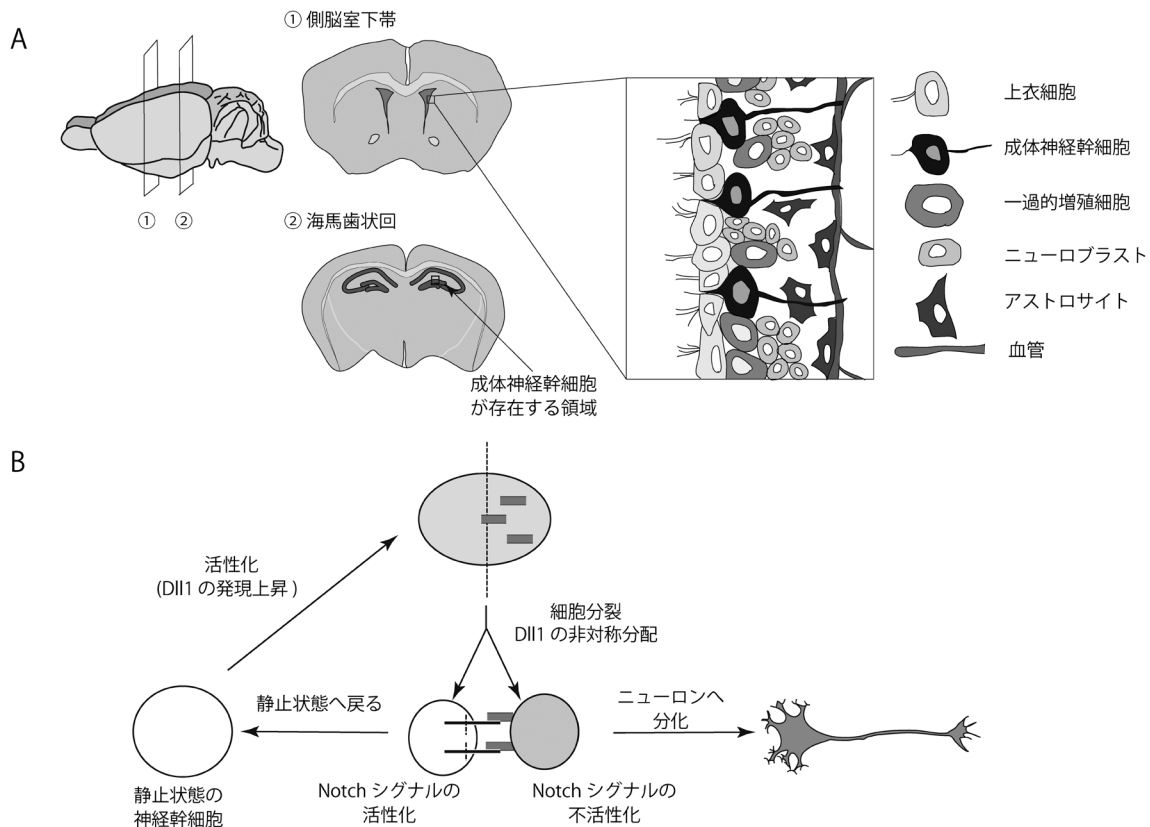


図1 成体神経幹細胞の分化制御に関わるニッチとDII1の非対称分配

(A)成体神経幹細胞の存在する領域とニッチ。マウスにおける成体神経幹細胞は、側脳室付近の脳室下帯と海馬の歯状回顆粒細胞下帯に存在する。成体神経幹細胞の周囲には、自身の子孫細胞である一過的増殖細胞・ニューロプラストや、上皮細胞、アストロサイトなどによって形成されたニッチが存在する。これらの細胞群との細胞間相互作用や分泌因子などにより幹細胞の維持・分化が制御されている。(B)DII1の非対称分配を介した成体神経幹細胞の分化制御。成体神経幹細胞の分裂が活性化すると、DII1の発現が上昇する。続いて細胞分裂の際、DII1は娘細胞に非対称分配される。DII1を受け継いだ娘細胞はニューロンへ分化し、受け継がなかった娘細胞は、受け継いだ娘細胞からのDII1シグナルを受けてNotchが活性化し再び未分化・静止状態へと戻る。

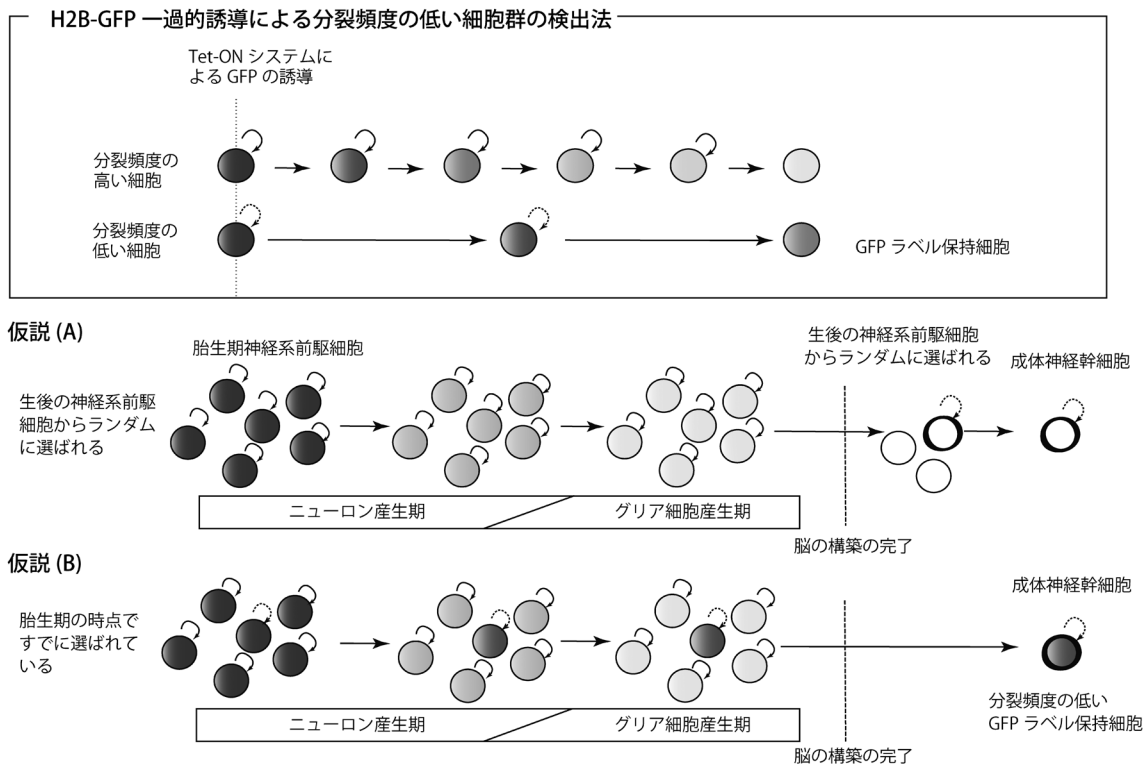
り未分化な状態を維持しているのだろうか。著者らは細胞分裂が活性化した成体神経幹細胞がNotchシグナルのリガンドの一つであるDII1を発現し、ニッチとなって成体神経幹細胞を静止状態にとどめておく可能性があることを明らかにした<sup>10)</sup>。DII1は活性化した神経幹細胞や一過的増殖細胞において発現が高く、それらの細胞は休止状態にある未分化な成体神経幹細胞の近くに存在していた。DII1のコンディショナルノックアウトを行うとNotchシグナルの活性化が阻害され、脳室下帯における未分化な成体神経幹細胞の数が減少した。さらに成体神経幹細胞を培養しDII1を蛍光標識によって可視化しライブイメージングを行ったところ、驚くべきことにDII1は細胞分裂の際に非対称に分配されることを見いだした。さらに分裂後、DII1を受け継がなかった細胞が再び成体神経幹細胞の分子マーカーであるGFAP (glial fibrillary acidic protein)を発現するようになっていた。これらの結果より、DII1を受け継いだ娘細胞は分化し、一方受け継がなかった娘細胞はDII1が提示さ

れてNotchシグナルが活性化し、未分化な成体神経幹細胞に戻るといったメカニズムが示唆された(図1B)。この機構は、成体神経幹細胞の数を適切に保ち、必要な数のニューロンを産み出すのに非常に重要な役割を果たしていると考えられる。

### 3. 成体神経幹細胞の発生源

ではこれらの成体神経幹細胞はどのような細胞系譜から生まれるのだろうか? Mercleらの報告によると、生後0日目の神経系前駆細胞にGFP (green fluorescent protein)を発現するアデノウイルスを感染させると、生後33, 45, 90日目において一部のGFP陽性細胞が成体脳室下帯の神経幹細胞になることから、生後神経系前駆細胞の一部の系譜が成体神経幹細胞になると考えられてきた<sup>11)</sup>。

では、成体神経幹細胞を形成する具体的な分子は何だろうか? いまだほとんど不明であるが、いくつかの報告



**図2** 細胞分裂頻度の違いを利用した成体神経幹細胞の起源細胞の同定

H2B-GFPを一過的に発現誘導させた細胞は分裂するたびにGFPが希釈され、蛍光強度が低くなる。これにより、分裂回数の少ない細胞をGFPラベル保持細胞として標識することができる。これまで成体神経幹細胞は、生後において分裂活性の高い神経系前駆細胞の中からランダムに選ばれて形成されたのち、分裂活性が低くなると考えられてきた（仮説A）。しかし、分裂頻度が低いという性質をもつ神経系前駆細胞が胎生期の時点ですでに選ばれており（起源細胞）、その細胞系譜が成体神経幹細胞になるという可能性も考えられる（仮説B）。仮説Bが少なくとも一部の系で正しいことが立証された（本文参照）。

がなされている。たとえばLiらの報告によるとHhシグナルの下流の因子であるGli1が胎生17日目の腹側海馬の脳室付近で発現し、それらGli1を発現する細胞群が背側の海馬へと移動し、成体神経幹細胞となることが示された<sup>12)</sup>。また、側脳室下帯においても、胎生12日目にAxin2というWnt/ $\beta$ カテニン下流の遺伝子を発現する細胞群が内側壁に存在し、それらが後に脳室下帯の成体神経幹細胞様の性質を持つようになることが観察されている<sup>13)</sup>。これらを示した実験では、注目する遺伝子が一過的に発現する細胞を永続標識し、それらがどのような細胞となるか時期を追って追跡する、いわゆるfate-mappingを行っている。さらに、Axin2やGli1を条件的に遺伝子破壊した場合にそれぞれ内側壁の脳室下帯と海馬の成体神経幹細胞の形成が著しく阻害されたことから、これらの遺伝子が成体神経幹細胞の形成の一部を担う因子である可能性が示された。

このようにこれまでの知見から、一部の胎生期神経系前駆細胞において、特定のシグナル経路が活性化することで成体神経幹細胞の形成に寄与する可能性が示唆されてきた。では将来成体神経幹細胞となる胎生期神経系前駆細胞はどのようなタイミング・どのようなメカニズムで形

成されるのだろうか？ これまで成体神経幹細胞は生後にランダムに選ばれると考えられてきた（図2、仮説A）。しかし、ほとんどの胎生期神経系前駆細胞は発生が進むとニューロンへの分化能を失いグリア細胞のみを産生するようになるが、成体神経幹細胞はニューロンとグリア細胞のどちらも産生する能力を維持し続ける。また、胎生期という限られた時間の中で脳を構築する必要のある胎生期神経系前駆細胞は非常に分裂頻度が高い一方で、成体神経幹細胞は静止期にとどまっておりに非常にゆっくりと分裂する。そのため著者らは、成体神経幹細胞となる起源細胞は、胎生期からすでに脳を構築する神経系前駆細胞とは異なる系譜にあるのではないかと考えた。さらに、そのような起源細胞は脳の構築を担う神経系前駆細胞よりも分裂頻度の低い静止状態にあるのではないかと仮説を立てた（図2、仮説B）。そこで、分裂頻度を調べるためにH2B-GFP（ヒストンH2BとGFPの融合タンパク質）がTet-ONシステムにより一過的に発現誘導される系を用いた（図2）。発現誘導された細胞は、分裂のたびにGFPのタンパク質量が約半分に希釈されるため、GFPの強度によって分裂の回数を推測することができる。胎生9日目にGFPの発現を誘導し

た1日後では、未分化な神経系前駆細胞におけるGFP強度は一様に高く、均一にラベルされることを確認した。一方、興味深いことにGFPの発現誘導から6日目において、大半の神経系前駆細胞ではGFPが検出されない程度まで希釈された（この実験系ではH2B-GFPは約9回の分裂で検出限界を下回る）にも関わらず、GFP強度を高いレベルで保持した少数の細胞集団が存在することがわかった。それら少数の未分化な細胞群は他の前駆細胞と比較してきわめて分裂頻度が低いことが示唆される。それらGFP強度の高い細胞群は、胎生13日目から15日目に出現し、将来成体神経幹細胞の存在する側脳室の脳室下帯に局在していた。そして驚くべきことに、生後28日目となってもGFP強度の高い細胞は側脳室の脳室下帯に存在し、成体神経幹細胞の形態を示しマーカーを発現することがわかった。すなわち、胎生13日目から出現するGFP保持細胞はほとんど分裂を介さずに成体神経幹細胞様の性質を示す細胞となる可能性が示された。一方、成体脳室下帯神経幹細胞の約7割がH2B-GFPを高発現で保持していたことから、これら成体神経幹細胞の多くが胎生期の早い段階からゆっくりと分裂する特別な性質を持った細胞群に由来する可能性が示唆された<sup>14)</sup>。

それでは、ゆっくりと分裂する胎生期神経系前駆細胞ではどのように分裂が抑制されているのだろうか？ 著者らは近年、海馬あるいは脳室下帯における成体神経幹細胞において、細胞周期抑制因子であるp57 (Cdkn1c) が高発現し、未分化性や静止期の維持に重要な役割を担うことを見いだしている<sup>3)</sup>。そのため、胎生期においてゆっくりと分裂する細胞群も、すばやく分裂する細胞集団よりp57の発現が高いのではないかと考え、検証を行った結果、H2B-GFPを高レベルで保持している細胞群において、p57が高発現していることを見いだした。さらに、p57を破壊すると成体神経幹細胞の発生が阻害された。これにより、p57の発現上昇により分裂が抑制されることが成体神経幹細胞の発生あるいは維持に必要な可能性が示唆された。一方、ウイルスを用いた過剰発現の系によってp57を高発現させた細胞群は、より脳室下帯の成体神経幹細胞様の未分化細胞になりやすいことが明らかとなった。すなわち、p57を高発現し分裂頻度の低い胎生期神経系前駆細胞から成体神経幹細胞が作り出される可能性が示された。

また、別のグループによっても上記の可能性を支持する結果が報告された<sup>15)</sup>。Fuentelbaらの報告によれば、胎生14日目あるいは16日目にプロモデオキシウリジン (BrdU) を投与し、生後の側脳室下帯の染色を行うと、胎生12日目、17日目にBrdUを投与した場合に比べ、BrdUの染色強度が高くhGFAP陽性の成体神経幹細胞様の性質を示す細胞が多数存在していた。さらに彼らは、胎生期にGFPを発現するウイルスを用いて胎生期神経系前駆細胞をラベル

し、生後にBrdUを用いて新生されたニューロンのラベルを行った。すると嗅球においてGFPとBrdUの両方を保持している細胞数は、胎生13日目あるいは15日目にGFPラベルした場合の方が胎生12日目あるいは17日目にラベルした場合よりも多かった。これらの結果は、ゆっくりと分裂する胎生期神経系前駆細胞が胎生14日目に存在し、胎生15日目前後に生まれた神経系前駆細胞がほとんど分裂を介さずに成体神経幹細胞となり、実際に嗅球のニューロンを産生する可能性をさらに支持している。

これらの報告から、将来成体神経幹細胞となる細胞は「生後に選ばれる」のではなく「胎生期からすでに選ばれている」、さらにそれらは「ゆっくりと分裂する性質を持つ」であろうことが強く示唆されている。

#### 4. おわりに

成体神経幹細胞は海馬歯状回と側脳室の脳室下帯で生涯ニューロンを産み出し続け、脳機能に重要な役割を果たしている。著者らや他グループの報告により、胎生期の時点ですでに将来成体神経幹細胞となる「起源細胞」が選ばれることが示唆されており、さらにそれらは脳を構築する神経系前駆細胞よりも、ゆっくりと分裂することが明らかとなってきた。では胎生期の起源細胞はどのように選ばれどのように振る舞うのだろうか？ 細胞周期抑制遺伝子の他にも起源細胞を産み出すシグナルが存在するのだろうか？ 神経幹細胞の未分化性を維持するメカニズムと、起源細胞を産み出すメカニズムには何らかの関わりがあるのだろうか？ たとえば神経幹細胞の運命制御を行うニッチを、起源細胞が自ら形成する能力を持つならば非常に興味深い。このように、成体神経幹細胞の形成過程にはさまざまな課題が残されている。これら起源細胞への理解を深めることによって、成体神経幹細胞の本質、ひいてはうつ病などの成体ニューロン神経異常を伴う精神疾患のメカニズムの解明へつなげることが期待される。

#### 文 献

- 1) Bond, A.-M., Ming, G., & Song, H. (2015) *Cell Stem Cell*, **17**, 385-395.
- 2) Urbán, N. & Guillemot, F. (2014) *Front. Cell. Neurosci.*, **8**, 396.
- 3) Furutachi, S., Matsumoto, A., Nakayama, K., & Gotoh, Y. (2013) *EMBO J.*, **32**, 970-981.
- 4) Kippin, T.-E., Martens, D.-J., & van der Kooy, D. (2005) *Genes Dev.*, **19**, 756-767.
- 5) Facaro, R., Valotta, M., Ferri, A.-L.M., Latorre, E., Mariani, J., Giachino, C., Lancini, C., Tosetti, V., Ottolenghi, S., Taylor, V., & Nicolis, S.-K. (2009) *Nat. Neurosci.*, **12**, 1248-1256.
- 6) Qu, Q., Sun, G., Li, W., Yang, S., Ye, P., Zhao, C., Yu, R.-T., Gage, F.-H., Evans, R.-M., & Shi, Y. (2010) *Nat. Cell Biol.*, **12**, 31-40, 1-9.

- 
- 7) Benezra, R. & Nam, H. (2009) *Cell Stem Cell*, **5**, 515–526.
- 8) Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K., & Kageyama, R. (2010) *J. Neurosci.*, **30**, 3489–3498.
- 9) Ehm, O., Göritz, C., Covic, M., Schäffner, I., Schwarz, T.-J., Karaca, E., Kempkes, B., Kremmer, E., Pfrieger, F.-W., Espinosa, L., Bigas, A., Giachino, C., Taylor, V., Frisén, J., & Lie, D.-C. (2010) *J. Neurosci.*, **30**, 13794–13807.
- 10) Kawaguchi, D., Furutachi, S., Kawai, H., Hozumi, K., & Gotoh, Y. (2013) *Nat. Commun.*, **4**, 1880.
- 11) Merkle, F.-T., Tramontin, A.-D., Garcia-Verdugo, J.-M., & Alvarez-Buylla, A. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17528–17532.
- 12) Li, G., Fang, L., Fernández, G., & Pleasure, S. (2013) *Neuron*, **78**, 658–672.
- 13) Bowman, A.-N., Amerongen, R., Palmer, T.-D., & Nusse, R. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 7324–7329.
- 14) Furutachi, S., Miya, H., Watanabe, T., Kawai, H., Yamasaki, N., Harada, Y., Imayoshi, I., Nelson, M., Nakayama, K.I., Hirabayashi, Y., & Gotoh, Y. (2015) *Nat. Neurosci.*, **18**, 657–665.
- 15) Fuentealba, L.-C., Rompani, S.-B., Parraguez, J.-I., Obernier, K., Romero, R., Cepko, C.-L., & Alvarez-Buylla, A. (2015) *Cell*, **161**, 1644–1655.

## 著者寸描

---

### ●今泉 結 (いまいずみ ゆい)

東京大学大学院薬学系研究科分子生物学教室修士2年。

■略歴 1991年大阪府に生まれる。2015年京都大学理学部卒業。同年から東京大学薬学系研究科分子生物学教室に所属。

■研究テーマと抱負 複雑な脳の形成は、いかなるメカニズムが可能にしているのか？ ゲノムインプリンティングによる遺伝子発現制御という観点から解明したい。

■趣味 スポーツ・ピアノ。