

発生期および成体脳における神経幹細胞の制御メカニズム

今吉 格

1. はじめに

複雑かつ精緻な哺乳類の脳神経系が再現性よく発生するためには、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトなどの脳を構成する細胞が、神経幹細胞から秩序立って産生される必要がある。また、近年、ヒトを含めた哺乳類の成体の脳においても神経幹細胞が存在し、ニューロンの新生が一生継続していることが明らかになった。すなわち、神経幹細胞は、発生期から成体に至るまで脳の中に存在し続け、脳の形成と可塑性の維持に必須の役割を担っている。時々刻々と進行する発生期における脳形成過程や、生後脳・成体脳における神経幹細胞の長期維持、および継続的なニューロン新生を実現するには、神経幹細胞はきわめて厳密なメカニズムによって制御されていると考えられる。本稿では、神経幹細胞の維持・増殖・分化を制御するメカニズムについて最新の知見を紹介するとともに、生後脳・成体脳でのニューロン新生の生理的意義についても取り上げる。

2. 発生期脳における神経幹細胞の制御機構

1) 神経幹細胞と脳の発生

神経幹細胞は、自己複製を行うことができ、かつ脳を構成する主要な3種類の細胞であるニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを生み出す多分化能を持つ細胞である¹⁾。胎児期の脳発生過程初期では、神経幹細胞は神経上皮細胞として存在し、ニューロンやグリア細胞に分化することなく、対称分裂により自己複製を繰り返す。その後、神経幹細胞は放射状グリアと呼ばれる形態をとり、ニューロンを産生するようになる。ニューロン産生期における神経幹細胞の多くは非対称分裂を行い、自己複製を行

いつつ、直接もしくは中間的な前駆細胞を介して、ニューロンを継続的に産生する。胎児期の後期になると、神経幹細胞はニューロン産生を終え、代わりにアストロサイトやオリゴデンドロサイトというグリア細胞を産生する。神経幹細胞の多くは生後脳においてアストロサイトに分化し、その多くが消失すると考えられているが、側脳室周囲や海馬・歯状回といった特定の領域では神経幹細胞が成体脳まで維持され、嗅球や歯状回のニューロンを新生し続けることが知られている²⁾。

2) bHLH型転写因子による神経幹細胞の自己複製と分化制御機構

神経幹細胞の自己複製と細胞分化はbHLH (basic helix-loop-helix) 型転写因子によって制御されていることが知られている³⁾。脳の発生過程において、神経幹細胞の未分化性の維持とアストロサイト分化を制御するHes1/5、ニューロン分化を制御するNeurog1/2やAscl1、オリゴデンドロサイト分化を制御するOlig1/2などのbHLH型転写因子が重要な働きを担っていることが報告されている。これらのbHLH型転写因子の遺伝子ノックアウトマウスや強制発現実験から、bHLH型転写因子が神経幹細胞の自己複製と細胞分化に必須の役割を担っていることは明らかになっていた。しかしながら、神経幹細胞が自己複製能(分化することなく、自分のコピーを作ることができる)と、多分化能(さまざまな細胞に分化できる)というまったく異なる能力をどのようなメカニズムで同時に保持しているのかは不明であった。また、神経幹細胞が細胞分化を行う際に、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトという3種類の選択肢の中から、どのように一つの選択肢を選んで分化していく(細胞分化運命決定)のかについても十分な説明はなされていなかった。そこで、筆者らのグループは、神経幹細胞におけるbHLH型転写因子の発現ダイナミクスを詳細に解析し直し、自己複製能と多分化能の両立という神経幹細胞を幹細胞たらしめている根幹のメカニズムについて検証を行った⁴⁾。

3) 神経幹細胞の自己複製とbHLH型転写因子のオシレーション

神経幹細胞は脳から取り出して*in vitro*で培養することが可能である⁵⁾。筆者らは、NS cellと呼ばれる神経幹細胞

京都大学白眉センター・ウイルス研究所 (〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町53 京都大学ウイルス研究所増殖制御学分野)

Regulation of neural stem cells in the developing and adult brain
Itaru Imayoshi (The Hakubi Center, Institute for Virus Research, Kyoto University, Institute for Virus Research, Kyoto University, Shogoin-Kawahara 53, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870245

© 2015 公益社団法人日本生化学会

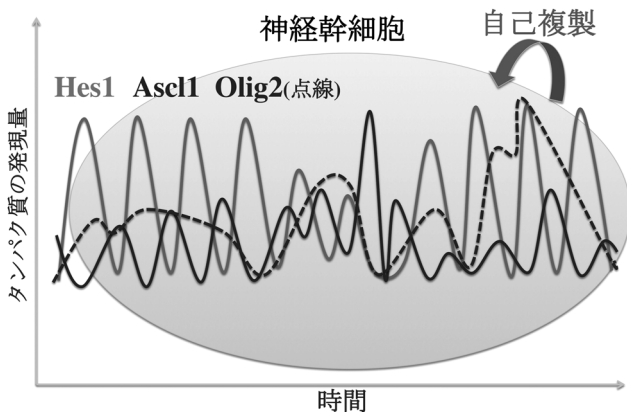


図1 自己複製する神経幹細胞において、Hes1, Ascl1, および Olig2の発現はオシレーション（振動）する。

を純度よく単層培養する手法を用いて、bHLH型転写因子の神経幹細胞の発現ダイナミクスを詳細に観察した⁴⁾。NS cellにおいては、bHLH型転写因子であるHes1, Ascl1およびOlig2が発現している。ホタルの発光タンパク質であるルシフェラーゼとbHLH型転写因子の融合タンパク質が発現するような遺伝子改変マウスを作製した。これらの遺伝子改変マウスからNS cellを培養し、bHLH型転写因子の発現ダイナミクスを解析した。Hes1, Ascl1, Olig2の3種類のbHLH因子について、ルシフェラーゼとの融合タンパク質の発現ダイナミクスを観察・解析することに成功した。

その結果、神経幹細胞においてHes1, Ascl1タンパク質は2~3時間周期で、Olig2タンパク質は5~8時間周期で振動発現（オシレーション）していることが明らかになった（図1）。さらに、Hes1, Ascl1, Olig2のいずれかを欠損した神経幹細胞では細胞増殖が減少していたことから、bHLH型転写因子が発現振動を繰り返すことによって神経幹細胞の細胞分裂を促進することが示唆された。

4) 神経幹細胞の細胞分化とbHLH型転写因子の蓄積発現

次に、神経幹細胞に細胞分化を誘導して、Hes1, Ascl1およびOlig2タンパク質の発現ダイナミクスをリアルタイムイメージングにて解析した。その結果、ニューロン分化の際にはAscl1の発現が、アストロサイト分化の際にはHes1の発現が、オリゴデンドロサイト分化の際にはOlig2の発現がそれぞれ蓄積することが明らかになった。神経幹細胞からどれかのセルタイプに分化運命決定が行われる際には、発現振動（オシレーション）を繰り返していたHes1, Ascl1およびOlig2タンパク質のどれか1種類の発現レベルが上昇して蓄積し、他の2種類のタンパク質の発現が消失した⁴⁾。これらのルシフェラーゼとbHLH因子の融合タンパク質の発現ダイナミクスの観察結果から、Hes1, Ascl1およびOlig2などの細胞分化決定因子は、神経幹細胞にもすでに発現しており、発現振動を繰り返すことで神経幹細胞

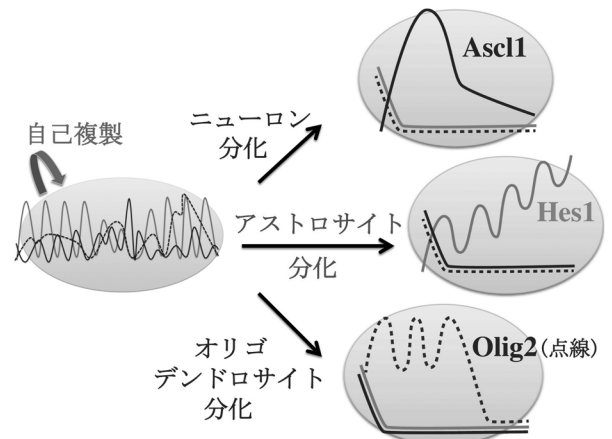


図2 神経幹細胞から分化運命決定が行われる際には、発現振動を繰り返していたHes1, Ascl1, Olig2タンパク質のどれか1種類の発現レベルが上昇し、他の2種類のタンパク質の発現が消失する。

の増殖を促進すると考えられた。一方、細胞分化誘導時にはどれか1種類のbHLH因子の発現が上昇・蓄積し、細胞分化を促進することが明らかになった。神経幹細胞は、複数の細胞分化決定因子を発現振動させることで、多分化能を備えつつも未分化性を保持して自身のコピーを作る（自己複製する）と考えられた⁶⁾（図2）。

5) Ascl1の発現ダイナミクスの光操作と神経幹細胞制御

これまでの実験結果を考えると、神経幹細胞の増殖活性化や、特定の種類の細胞への分化誘導は、bHLH型転写因子の発現ダイナミクスの変化によって制御されている可能性が示唆された。たとえば、Ascl1は発現振動すると神経幹細胞の増殖を活性化し、蓄積発現するとニューロン分化を誘導すると考えられた。そこで、光応答性の転写因子であるGAVPOのコドンをもとにしたhGAVPOを用いて、光照射依存的にAscl1の発現ダイナミクスを人工的にコントロールできる実験系を新たに開発した⁴⁾。3時間ごとに青色光を神経幹細胞に照射することでAscl1の発現振動を、30分ごとに青色光を照射することでAscl1の蓄積発現を人為的に誘導することが可能になった。

実際に、神経幹細胞に青色光照射を行い、Ascl1の3時間周期の発現振動を誘導したところ、細胞増殖（自己複製）が促進された。一方、Ascl1の蓄積発現を誘導したところ、ニューロン分化が誘導された。これらの実験結果は、発生期の脳内の神経幹細胞においても、bHLH型転写因子の発現ダイナミクスが積極的に分化運命決定を制御していることを示唆しており、今後の詳細な解析が期待される。

3. 生後脳・成体脳における神経幹細胞の制御機構

1) 生後脳・成体脳神経幹細胞とニューロン新生

脳を構成する細胞の産生が終わると、多くの神経幹細胞はアストロサイトに分化して消失すると考えられている。しかし、側脳室周囲や海馬の歯状回といった特定の領域では神経幹細胞が出生後も維持され、嗅球や歯状回のニューロンを新生し続けることが知られている(図3)。これらの生後脳・成体脳神経幹細胞の起源については不明な点が多く、胎児期にニューロンやグリア細胞を産生していた神経幹細胞の一部が維持されているのか、それとも、成体脳神経幹細胞は胎児期の発生脳では違った形で特別に保持されているのかなど、不明な点が多く、今後の詳細な解析が期待される²⁾。

側脳室周囲の脳室下帯と呼ばれる領域では、多数の神経幹細胞が存在していることが知られている⁷⁾。それらの多くは休眠状態として存在していると考えられるが、一部は活性化して新しいニューロンを産生している。側脳室周囲の脳室下帯で生まれた新生ニューロンは、脳の前方へと向かって細胞移動し、匂い情報を制御する脳部位である嗅球の抑制性インターニューロンになることが知られている。

また、海馬の歯状回の顆粒細胞下帯と呼ばれる領域にも神経幹細胞が存在し、ニューロン新生が続いていることが知られている⁷⁾。マウスやラットなどのげっ歯類においては、側脳室周囲の脳室下帯に比べて、歯状回の顆粒細胞下帯では神経幹細胞の数も産生される新生ニューロンの数も少ない。しかし、歯状回の顆粒細胞下帯で産生されるニューロンは興奮性の主要ニューロンであり、側脳室周囲-嗅球におけるニューロン新生とは異なった機能的意義を持っていると考えられる。また、海馬の歯状回において

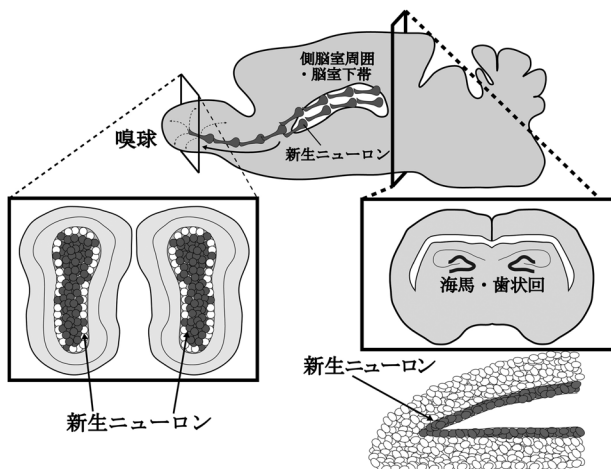


図3 成体脳におけるニューロン新生

側脳室周囲・脳室下帯および海馬・歯状回の顆粒細胞下帯には神経幹細胞が存在し、それぞれ嗅球と歯状回のニューロンを産生している。

は、加齢とともにニューロン新生が著しく減少することが知られており、ニューロン新生の破綻とさまざまな神経疾患との関係についても活発に議論が行われている。

2) 成体脳神経幹細胞の分化制御メカニズム

生後脳・成体脳の神経幹細胞の細胞増殖・分化については、胎児発生期と類似の制御メカニズムが寄与していることが知られているが、成体脳神経幹細胞の多くは休眠状態で存在していると考えられることから、休眠状態の維持や、休眠状態からの活性化については独特の制御機構が存在すると考えられる。

Notch/Hes シグナルは胎児発生期の神経幹細胞の分化抑制と維持に必須な役割を果たしており、Notch シグナルが遮断されると神経幹細胞のニューロンへの分化が過剰に亢進し、神経幹細胞の維持ができなくなることがわかっている。筆者らは、成体脳神経幹細胞における Notch シグナルの役割を明らかにするため、Notch シグナルの細胞内伝達因子である RBPj の遺伝子を、成体脳神経幹細胞特異的にコンディショナルノックアウトし解析を行った⁸⁾。その結果、RBPj が欠損して Notch シグナルが遮断されると、生後脳・成体脳に存在する神経幹細胞は一過性増殖細胞へと分化が進行し、神経幹細胞が枯渇し、最終的にはニューロン新生が起こらなくなってしまうことが明らかになった。したがって、Notch シグナルは、一過性増殖細胞への分化を抑制することで、神経幹細胞を長期的に維持し、新生ニューロンが長期にわたって維持されることに必須であると考えられる。また、Notch の下流エフェクターである Hes 遺伝子ファミリーのコンディショナルノックアウトマウスや、Notch 受容体や Notch リガンドの欠損によっても同様の表現型が観察されており、Notch/Hes シグナルは成体脳においても神経幹細胞の維持に中心的役割を担っていると考えられる。

また、Notch シグナルだけでなく、IGF, PDGF, TGF, SHH, Wnt, BMP, EGF, FGF, Slit, レチノイン酸シグナル経路などを含めて多くの細胞シグナル経路が成体脳神経幹細胞の増殖・分化制御に複合的に関与していることが報告されている⁹⁾。また、Ascl1 や Olig2 などの他の bHLH 型転写因子についても、生後脳や成体脳におけるニューロン新生やグリア細胞産生において必須の役割を担っていることが報告されている^{10, 11)}。胎児脳だけでなく、生後脳や成体脳においても、bHLH 型転写因子のダイナミックな発現動態の変化による神経幹細胞制御は重要な働きをしていると予想され、今後、成体脳神経幹細胞の休眠状態との関連などについても詳細な解析が期待される。

3) ニューロン新生と高次脳機構

成体脳で新たに産生されたニューロンは高次脳機能に対

してどのような役割を担っているのでしょうか？嗅球と海馬の両者において、神経幹細胞から産生された新生ニューロンは、樹状突起や軸索を進展させ、シナプス形成を行い、既存の神経回路に組み込まれることが示されている⁹⁾。新生ニューロンは既存のニューロンに比べて、外部刺激に対する応答性が高いことや、LTP (long-term potentiation, 長期増強) 形成の閾値が低いなど、独特な性質も報告されている。また、放射線照射や細胞増殖阻害剤投与、もしくは遺伝子改変マウスを用いて、成体脳ニューロン新生を阻害したげっ歯類においては、嗅覚関連記憶、空間記憶や恐怖条件づけの異常が報告されている^{12~14)}。特に、海馬・歯状回との関連が深いとされているパターン分離 (pattern separation) や、記憶の忘却・消去についても、ニューロン新生との関係が報告されている¹⁵⁾。

また、生後発達期のニューロン新生の異常が、さまざまな発達障害や精神疾患の原因の一端になっているという可能性も示唆されている。その他にも、さまざまな神経変性疾患の病態との関連についても報告されているが、これらの神経疾患とニューロン新生の異常との関係については、今後の厳密な解析が求められている。

4) 脳神経系の再生医療実現に向けて

ヒトを含めた哺乳類の成体脳においても、ニューロンのもとになる神経幹細胞が残存しており、継続的に新しいニューロンが産生され、神経回路に組み込まれ続けるという現象は、驚きを持って迎えられた。それとともに、内在性神経幹細胞を用いた脳神経系の再生医療の実現にむけてさまざまな期待が寄せられている。また、ES細胞やiPS細胞、あるいはそれらから分化させたニューロンを移植する手法についても、さまざまな可能性が検討されている。しかしながら、他の臓器の再生医療とは異なり、脳神経系の再生医療は単純に組織構築が回復することが最終目的ではなく、人格・思考や記憶や学習なども含めた機能的な回復をもって実現となる。このようなきわめてハードルの高い問題を前にして、正常な脳で起こっているニューロン新生や、成体脳神経幹細胞の制御機構の解明を目指した基礎研

究は、将来の脳神経系の再生医療の実現に向けての重要な知見を提供できる可能性があると期待される。

謝辞

本稿にて紹介している筆者らの研究内容は、京都大学ウイルス研究所・影山龍一郎教授の研究室にて実施されたものです。長年にわたるご指導と共同研究に深く感謝致します。

文 献

- 1) Okano, H. & Temple, S. (2009) *Curr. Opin. Neurobiol.*, **19**, 112–119.
- 2) Kriegstein, A. & Alvarez-Buylla, A. (2009) *Annu. Rev. Neurosci.*, **32**, 149–184.
- 3) Imayoshi, I. & Kageyama, R. (2014) *Neuron*, **82**, 9–23.
- 4) Imayoshi, I., Isomura, A., Harima, Y., Kawaguchi, K., Kori, H., Miyachi, H., Fujiwara, T., Ishidate, F., & Kageyama, R. (2013) *Science*, **342**, 1203–1208.
- 5) Conti, L., Pollard, S.M., Gorba, T., Reitano, E., Toselli, M., Biella, G., Sun, Y., Sanzone, S., Ying, Q.L., Cattaneo, E., & Smith, A. (2005) *PLoS Biol.*, **3**, e283.
- 6) Imayoshi, I. & Kageyama, R. (2014) *Trends Neurosci.*, **37**, 531–538.
- 7) Imayoshi, I., Sakamoto, M., & Kageyama, R. (2011) *Front Neurosci.*, **5**, 64.
- 8) Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K., & Kageyama, R. (2010) *J. Neurosci.*, **30**, 3489–3498.
- 9) Ming, G.L. & Song, H. (2011) *Neuron*, **70**, 687–702.
- 10) Urbán, N. & Guillemot, F. (2014) *Front. Cell. Neurosci.*, **8**, 396.
- 11) Freeman, M.R. & Rowitch, D.H. (2013) *Neuron*, **80**, 613–623.
- 12) Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itoharu, S., & Kageyama, R. (2008) *Nat. Neurosci.*, **11**, 1153–1161.
- 13) Sakamoto, M., Imayoshi, I., Ohtsuka, T., Yamaguchi, M., Mori, K., & Kageyama, R. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 8479–8484.
- 14) Sakamoto, M., Ieki, N., Miyoshi, G., Mochimaru, D., Miyachi, H., Imura, T., Yamaguchi, M., Fishell, G., Mori, K., Kageyama, R., & Imayoshi, I. (2014) *J. Neurosci.*, **34**, 5788–5799.
- 15) Aimone, J.B., Deng, W., & Gage, F.H. (2011) *Neuron*, **70**, 589–596.

著者寸描

●今吉 格 (いまよし いたる)



京都大学白眉センター・ウイルス研究所 特定准教授。生命科学博士 (京都大学)。

■略歴 1980年宮城県に生る。2003年大阪大学工学部卒業。08年京都大学大学院生命科学研究所博士課程修了。07年日本学術振興会特別研究員 (DC2)。08年日本学術振興会特別研究員 (PD)。09年JST さきがけ研究者。11年京都大学白眉センター「白眉研究者」(特定准教授)。14年JST さきがけ研究者。

■研究テーマと抱負 脳神経系が再現性良く発達するための設計図と、大人の脳が持つ可塑性について。

■ウェブサイト http://imayoshi.web.fc2.com/Itaru_Imayoshi_Ph.D./_Home.html

■趣味 釣り。