

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	間瀬 俊
論文題目	マウス神経幹細胞Radial glial cellの維持と 姉妹細胞の非対称性を生むNotchの活性化機構		
(論文内容の要旨)			
<p>マウスの大脳背側の神経発生では、神経幹細胞が対称分裂で増殖し、その後非対称分裂によって神経細胞を生み出す。未分化性を維持しながら非対称分裂を継続するためには、その間途切れることなく神経幹細胞が周囲の細胞から Notch シグナルを受容する必要がある。神経幹細胞は <i>Notch1</i>, <i>Notch2</i>, <i>Notch3</i> の 3 つの Notch シグナルの受容体遺伝子を発現するが、ホモログごとの役割は不明な点が多い。また、Notch は大脳背側の主なリガンド Delta-like1(Dll1)で活性化されるが、形態が異なる姉妹細胞間で、非対称に Notch が活性化される仕組みや、Notch シグナルの活性化部位については未だ定説がない。</p> <p>第一部では、神経幹細胞で発現する Notch1 と Notch2 が主要な Notch シグナルの受容体であることを示した。本研究では発生期の大脳背側で特異的に <i>Notch1</i>, <i>Notch2</i> またはその両方の活性を失ったノックアウトマウスを作出し、<i>Notch1</i> および <i>Notch2</i> が神経幹細胞の維持と神経発生に与える影響を解析した。その結果、神経発生初期から中期にかけて神経幹細胞の維持に主要な役割を果たすのは <i>Notch1</i> であるが、神経発生後期には <i>Notch2</i> の発現が増加することで、両者が未分化性維持に同等の役割を発揮することを明らかにした。</p> <p>第二部では、神経幹細胞が脳室帯より基底膜側で周辺の細胞から Notch シグナルを受容し得ることを示した。Notch はリガンドとの結合がトリガーとなって、酵素的な切断を受ける結果、活性化型の細胞内ドメインは主に核に移行し、転写因子として働く。古典的なモデルでは、Notch は脳室面に近い接着帯周辺で活性化されると考えられてきた。本研究では活性化型 Notch が脳室帯より基底膜側に伸びる神経幹細胞の放射状繊維に広く分布することを発見した。この活性化型 Notch は、Notch の切断酵素の活性を阻害すると消失した。一方、Dll1 は神経細胞へ分化する初期段階の細胞で強く発現し、野生型マウスでは脳室帯内の細胞質で主に観察される。<i>Notch1/2</i> ダブルノックアウトマウスを観察したところ、Dll1 が脳室帯内側の細胞膜と思われる領域に分布した。これは野生型マウスの神経前駆細胞では、母細胞から持ち越した Notch1 と Notch2 が同一細胞上の Dll1 を cis-inhibition することで、脳室帯内側に分布する Dll1 は Notch シグナル伝達への寄与が小さい可能性が示唆された。さらに <i>Notch1</i> ノックアウトマウスでは、脳室帯より基底膜側の神経前駆細胞で Dll1 が細胞膜と思われる領域に局在した。神経幹細胞の一部に Notch1 を発現させると、この Dll1 の局在は隣接細胞から消失することから、野生型では神経前駆細胞に隣接する細胞の Notch の活性化 (<i>trans-activation</i>) に使われていることが示唆された。さらに、脳室帯より基底膜側で生じる Notch-Dll1 の <i>trans-activation</i> が、神経幹細胞の未分化性維持に十分であることも示した。これらのことから、脳室帯の Notch シグナルだけでなく、脳室帯から神経層へ移動する神経前駆細胞の Dll1 による Notch 活性化が、神経幹細胞の維持に重要であることが示唆された。</p> <p>本研究は、第一部で <i>Notch1</i> および <i>Notch2</i> の発現量の経時変化が、大脳背側の神経幹細胞の未分化性維持に果たす役割を明らかにし、第二部では、新たな Notch 活性化空間を発見したことで、大脳背側の発生における Notch シグナルの動態と神経幹細胞の形態の機能的必然性を説明する新たな時空間的モデルを提示した。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

哺乳類の脳新皮質は、その発生過程においては、比較的少数の幹細胞から出発するが、膨大な細胞数と複雑性を持つ高度に組織化した器官へと成熟し、哺乳類の脳機能を支える中枢となる。同時に、脳組織の機能構造の発生・発達メカニズムを解明するモデルとして、とりわけ、遺伝学的解析の発達したマウスの大脳新皮質の発生は典型的なモデルとして研究されてきた。神経幹細胞(radial glial cell)の未分化性の維持にはNotchシグナルの活性化を必要とし、その時空間的な厳密な制御は、大脳新皮質を構成する多様な神経細胞の形成において、必須の役割を担っていることが知られている。しかし、主に発現する3種類のシグナル受容体Notch (Notch1, Notch2, Notch3)の役割、それぞれの寄与の経時的な変化等の知見は乏しかった。本学位論文第一部では、*Notch1*, *Notch2*およびその二重変異マウスを用い、その経時的な表現型、及び、遺伝子発現パターンの変化の解析結果から、神経幹細胞の未分化性の維持において、神経産生初期には*Notch1*が主要な役割を果たすものの、発生後期には、*Notch2*の発現上昇により、両者がほぼ同等の比重を占めるに至ることを明らかにした。

本学位論文の第二部では、著しく伸長した上皮形態を持つ神経幹細胞の中で、どの部位がNotchシグナルの伝達を担っているかという困難な問題に取り組んだ。これまでの主要な説は、先端側の細胞接着帯で主にNotchシグナルが活性化されるものとされてきたが、申請者は、脳室帯に存在する幹細胞の細胞体から、基底膜側に伸展した放射状線維の細胞内領域にも、Notch細胞質ドメイン(NICD)、すなわち、活性化型NICDが存在することを発見した。この観察結果を出発点に、*Notch1*, *2*およびその二重変異体におけるDelta-like-1 (Dll1)リガンドの分布の変化等を詳細に解析し、また幹細胞の未分化性維持には脳室帯より基底膜側のNotch活性化が十分であること強く示唆するデータを得た。本研究ではこれらの結果を総合し、神経幹細胞の未分化性の維持には、基底膜側の放射状線維でのNotchの活性化が重要な役割を担っていることを提案している。

本研究は膨大な遺伝学的な解析と組織染色を駆使し、神経幹細胞の形態的な知見を組み入れた新しい視点から、大脳新皮質発生期の幹細胞の自己複製の研究を展開したもので、博士論文には、生命科学に関する高度で幅広い学識、専攻分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見および概念が示されており、論理的かつ一貫性をもって記述されている。以上の評価に基づき、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。2021年2月8日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日：2021年 3月 31日