

タイトル	ショウジョウバエ胚発生後の中枢神経系グリア細胞の増殖における prospero 遺伝子の役割 Role of prospero in post-embryonic glial cell proliferation in Drosophila CNS
所属・氏名	School of Biosciences, University of Birmingham Kentaro KATO
派遣期間	2006年2月26日～2009年12月31日 February 26, 2006 – December 31, 2009
研究機関	School of Biosciences, University of Birmingham Edgbaston, Birmingham B15 2TT, West Midlands, United Kingdom
研究指導者	Alicia Hidalgo

Summary

In the embryonic central nervous system of *Drosophila*, there is a glial population that is maintained in a proliferative state. This implies that these glial cells may proliferate for post-embryonic restructuring processes, and/or more intriguingly for the adjustment against small neuronal lesion caused by environmental/genetic/stochastic condition, and contributes to the neuronal homeostasis. This glial population expresses prospero. Our project has revealed that pros-positive glial cells rarely divide during post embryonic larval life. The glial cells, however, proliferate upon stab-injury. By in vivo genetic manipulation in glial cells and stab-injury paradigm, we found that the two positive feed back loops involving prospero, with Notch and Eiger/TNF signaling, enable the glial cells to be proliferative, respond to injury signals, and limit proliferation after the response. Time-lapse analysis showed that there is a tendency of neuropile repair, and involvement of glial cells in the process. Consistent with this, increasing the number of glial cells by genetics revealed that the glial cells are protective, and may be positively involved in neuronal repair. Our finding revealed the molecular basis of glial repair response which is favorable for neuropile repair.

脳には大きく分けて二種類の細胞集団が存在する。一つは神経回路の主体である神経細胞であり、もう一方はそれ以外の細胞であるグリア細胞である。それぞれがお互いに制御しあうことにより、適切な数、時期、場所に分布し、確実な神経構造と神経機能を実現する。このような仕組みは、発生過程のみならず成体において中枢神経系が損傷を受けた際にも見いだすことができる。中枢神経系が損傷をうけるとグリア細胞が細胞増殖をはじめ、オリゴデンドロサイト前駆体の増殖によって、限定的ではあるが損傷によって脱ミエリン化した神経線維が再ミエリン化し、機能回復に貢献する。損傷応答は、組織内の環境の変化を検知し構造や機能の恒常性を維持する機構を反映していると、とらえることができる。

損傷時にグリア細胞が増殖するためには、(1) 増殖能を維持、(2) 損傷を検知、増殖開始、(3) 増殖を停止、を制御する仕組みが必要である。増殖能を持ちつつ普段は増殖しない、引き起こされた増殖はいつかは停止し、がん化しない、というこれらの機能は独立的な仕組みによって付与されているとは考えにくく、有機的に制御されていると予想されるが、現在までのところ、その分子基盤については明らかでない点が多い。

ショウジョウバエはさまざまな遺伝学的な操作がおこなえ、複数の遺伝子の連携を解析しやすいモデル動物である。さまざまな生命現象の基本的な分子基盤は種を超えて保存されていることが多く、ショウジョウバエをもちいた研究はヒトを含む脊椎動物の理解に大きく貢献している。派遣先研究室である Hidalgo 研究室では、ショウジョウバエ胚において転写因子である Prospero (pros) がグリア細胞の増殖能にかかわることを報告した。胚発生後期において Pros 陽性のグリア細胞は細胞周期の G1 期で停止している。これらのグリア細胞が、胚発生以後において再び増殖を開始する可能性、さらに環境、遺伝的、確率的要因によって神経障害や微細な神経系の発生異常が生じた場合には、これらの細胞が増殖することによって構造と機能の恒常性へ貢献する可能性がかんがられる。我々はこれまでに別個に、それぞれ(1) 成虫脳における損傷は TNF/Eiger を介在としてグリア細胞の増殖を引き起こす、(2) Notch が胚におけるグリア細胞の増殖能に関与する事を明らかにしてきた。

そこで、本研究では、これらの知見をふまえて胚発生以後のグリア細胞の増殖の制御について、pros 遺伝子と Notch、TNF/Eiger の関与を主眼に次に示す点について解析した。(1) 胚発生以後にグリア細胞は増殖するのか、(2) 損傷に応答してグリア細胞は増殖するのか、(3) グリア細胞の増殖の分子基

盤、(4) グリア細胞の神経系修復における役割。本研究は、一般的なショウジョウバエ遺伝学、免疫抗体染色法、in situ hybridization 法、共焦点顕微鏡、統計学に加え、新しく確立した組織培養をもちいた中枢神経系への損傷モデルと、派遣先研究室におけるイメージ解析の専門家と共同で開発した組織内のグリア細胞の自動定量化ソフトウェアをもちいて遂行した。グリア細胞の数の客観的な定量と遺伝学的解析(遺伝子変異体、GAL4-UAS による遺伝子の異所的過剰発現とこれらの組み合わせ)により、損傷によるグリア細胞の増殖、それぞれの遺伝子の増殖における役割を検討することが可能となった。さらにこれに共焦点顕微鏡をもちいた Time-lapse 解析を組み合わせ、損傷におけるグリア細胞の挙動と神経再生の有無を検討した。

幼虫期後期において Pros 陽性グリア細胞が増殖するのかどうかを細胞周期の M 期に特異的なマーカーと細胞分裂した細胞を低い頻度で標識することのできる遺伝学的なトリックである MARCM 法によって検討した。その結果、Pros 陽性グリア細胞は幼虫期においてはほとんど分裂しないことが明らかになった。しかしながら、このグリア細胞は損傷に応答して増殖した。このグリア細胞の増殖能、損傷応答能、増殖停止は Prospero を中心とした Notch シグナルと TNF/Eiger シグナルとの二つの正のフィードバックループという転写因子ネットワークによって制御されていた。Prospero と Notch はお互いの発現を誘導する一方、機能的にはお互いに細胞周期に対して拮抗する作用を持っており、このバランスによりグリア細胞は細胞周期の途中である G1 期で停止していると考えられる。損傷をうけると、TNF/Eiger シグナルにより、このバランスが正の方向に傾き増殖が引き起こされると考察される。Prospero と Notch シグナルの関係同様、Prospero と TNF/Eiger シグナルはお互いに正に制御する一方で、機能的には細胞周期に対して拮抗する作用をもっていた。これにより損傷に応答して細胞増殖できる一方で、増殖は継続せずに限定されると考えられる。

次に、Time-lapse 解析をしたところ、損傷直後より損傷が神経束にひろがった後、ある程度の回復をみせた。この際に、グリア突起が損傷部を占め、その後に傷が閉じる様子が観察された。より詳細な解析のため一部の神経束のみを標識、観察したところ、低い頻度ではあるが、切断された神経束の再伸長、再線維束形成が観察された。遺伝学手法によってあらかじめグリア細胞の数を増やすと傷の拡大が限定される

一方、グリア細胞の増殖を抑制すると傷がさらに拡大した。これらの結果は、グリア細胞は損傷において保護的に作用すること、神経系修復に何らかの役割を持っていることを示唆している。

以上のことから、Pros 陽性グリア細胞は環境に応じて調整的に増殖することが明らかになり、神経構造と機能の恒常性に貢献している可能性が示唆された。本派遣研究によって、このグリア細胞の増殖を制御する分子基盤である転写因子ネットワークを明らかにすることができた。関与する分子の類似性から考えると、この分子基盤は脊椎動物における損傷応答にも保存されている可能性が高く、脊椎動物における理解にも貢献するものと考えられる。

これらの成果は以下の論文として、投稿準備中である。

K. Kato, M.G. Forero, J.C. Fenton, S. Fennell and A. Hidalgo

The glial regenerative response to central nervous system injury is enabled by Pros-Notch and Pros-NFkappa B feedback facilitating axonal repair

M.G. Forero, K. Kato and A. Hidalgo

New automatic method for counting larval glial cells in Drosophila

学会発表(ポスター)

K. Kato, M.G Forero, J.C. Fenton, A. Hidalgo

The glial regenerative response to CNS injury is enabled by Prospero-Notch and Prospero-NFkappa B feed-back. Neurobiology of Drosophila. Cold spring harbor, USA. 2009.09.29-10.03

K. Kato, M.G Forero, J.C. Fenton, A. Hidalgo

A gene regulatory network involving prospero, Notch, TNF and NFkB underlies a glial-repair-response to CNS injury. 9th European Meeting on glial cells in Health and Disease (Paris, France) 2009.09.06-12

K. Kato, M.G Forero, S.M. Gómez, S. Powell, J.C. Fenton, A. Hidalgo

Gial proliferation in Drosophila larvae. 12th European Drosophila Neurobiology Conference (Würzburg, Germany) 2008.09.06-09.10