

神経幹細胞を形成するメカニズム

Molecular mechanisms that underlie neural stem cell formation

(日本発生生物学会推薦)

代表研究者 東京大学 多羽田哲也 University of Tokyo Tetsuya TABATA

In the visual system, precise topographic mapping of photoreceptor neurons to their targets in the brain, retinotopic mapping, is necessary for the correct interpretation of visual information received in the retina. During development of *Drosophila*, photoreceptor cells (R cells) project axons to the optic lobe in the brain. Axons of R1-R6 terminate in the first ganglion, lamina and axons of R7 and R8 terminate in medulla. Both medulla and lamina neurons derive from neuroepithelial (NE) cells of the developing optic lobe. Medulla neurons derive from neuroblasts (NBs) on the medial side of the NE sheet; lamina neurons derive directly from the lateral side of the NE sheet without formation of NBs. NB cells develop sequentially in a spatially defined manner, and that lethal of scute (*l(1)sc*), one of the proneural genes, signals the transition of NE cells to NBs. *l(1)sc* expression is transient, progressing in a synchronized and ordered “proneural wave” that sweeps toward more lateral NE cells in the optic lobe. We found that JAK/STAT and EGF signals function in opposite directions to regulate the proneural wave progression. These findings suggest the regulatory basis for the formation of a precise topographic map in the visual system.

研究目的

脳などの中枢神経に存在する様々な神経細胞は胚期に、神経幹細胞とよばれる細胞群から生まれる。従来、神経幹細胞が上皮性の前駆細胞から生じる機構は、確率論的に制御されていると考えられてきた。しかしながら、ショウジョウバエ脳の視覚中枢では、神経幹細胞が上皮組織から時空間的に規則正しく同調して生じることを見出した。上皮から神経芽細胞にいたる発生の時間的進行が発生進度の異なる細胞の連続した配列として空間的に配置されており、この系を研究することにより、上皮細胞から神経幹細胞、神経母細胞が形成される個々のステップを詳細に研究することが可能になる。今までの研究から、上皮細胞が proneural 遺伝子を一過性に発現し神経幹細胞となることがわかっている。proneural 遺伝子の発現が発生に伴って移動していくことから、これを proneural wave と名付けた。本研究では proneural wave が進行するメカニズムを明らかにし、従来考えられていた確率論的な機構を検証し直し、神経幹細胞が生まれる諸過程を明らかにする。

研究経過

神経細胞の形成——ショウジョウバエをモデルとして

非常に多岐にわたる種類の神経細胞が生成される仕組みは発生生物学の主要課題を解くモデルである。上皮細胞から神経幹細胞、さらには神経芽細胞が形成され、不等分裂によりそれ自身と神経細胞を産み出す一連のメカニズムはショウジョウバエ胚の中枢あるいは感覚器の分化をモデルとして、盛んに研究され、大きな成果を挙げている。これらの研究は哺乳類を含む他の生物における神経形成研究の基盤としてクラシックであると同時に、現在も日々深化した研究が展開されている。しかし、神経発生の最初のステップである神経を産み出す細胞が上皮細胞群から選り出される仕組みは良く理解されていない。上皮の中から神経芽細胞になるコンピテンスを持った細胞集団が生じ、その中の細胞間で確率論的に生じるゆらぎを増幅することで、神経発身に運命づけられた細胞がNotchシグナルによる側方抑制メカニズムにより形成されると説明されてきた。

新たなモデルの提唱——視覚中枢における神経形成——Proneural waveの発見

私たちは、ショウジョウバエ脳の視覚系（メダラ神経節）の形成を調べている過程で、上記とは異なる様式で神経細胞が形成されることを見出した。この系ではまず視葉とよばれる領域で対称分裂により皮質に一層の神経上皮細胞が増殖する。その過程で、上皮の最も近位の細胞から一細胞ずつ順にメダラ神経を生み出す神経芽細胞に分化していく（ちなみに神経上皮細胞シートは反対側である、最も遠位の細胞は視神経の投射を受けて、第1の視覚中枢であるラミナ神経に分化する）（Figure 1.）。すなわち、神経芽細胞の形成は確率論的ではなく、決定論的に起こることである。この系を用いることにより神経形成の最初のステップを精度高く解析することが可能となった。この過程を詳細に観察すると、上皮細胞が神経芽細胞に分化することに先立って一過性にproneural遺伝子lethal of scute (*l(1)sc*)を発現することを見出した。この遺伝子の発現は神経上皮細胞を近位から遠位に向けて波のように伝播していくので、Proneural waveと名付けた。神経幹細胞の今日的定義に従えば、proneural waveを発現する細胞が神経幹細胞というべきかもしれないが、この細胞は分裂することなく神経芽細胞へ分化するらしい。そういう意味では増殖期にある神経上皮細胞が幹細胞といえるであろう。あるいは本実験系においては神経芽細胞も神経幹細胞といえるのかもしれない。本研究ではProneural wave すなわち*l(1)sc*の発現をマーカーとして神経芽細胞を形成するメカニズムを明らかにする。

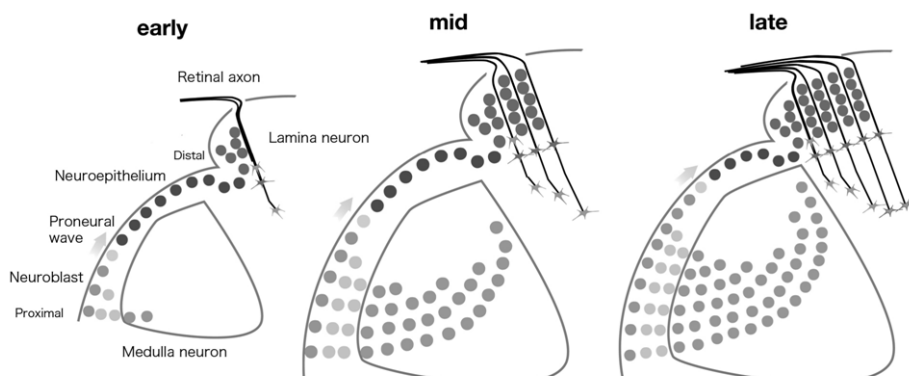


Figure 1. proneural wave sweeps toward more lateral neuroepithelium and induces transition from neuroepithelium to neuroblast in the medulla development Schematics of the horizontal section of the developing optic lobe in the early, middle and late third instar larvae. Proneural wave, retinal axons, lamina neurons, medulla neuroblasts and medulla neurons are shown.

Proneural wave を負に制御する JAK/STAT シグナル

Proneural wave の進行の機構を明らかにする目的で、視葉に発現する遺伝子のお探索を行い、神経上皮の最も遠位で発現する遺伝子 Unpaired (Upd) を見出した。Upd は JAK/STAT シグナルのリガンドである。JAK/STAT シグナルは様々な系で、細胞の分化、増殖を制御するシグナルとして知られている。STAT 結合領域をタンデムにつないだリポーター遺伝子の発現を指標にすると、JAK/STAT 活性は遠位側で強く近位側（メダラ神経芽細胞形成が開始する部位）では弱いことが示唆された。

JAK/STAT シグナルの変異を観察すると、メダラ神経芽細胞とラミナ神経がほとんどなく、少数のメダラ神経が観察されるのみであった。神経上皮細胞が十分に増殖しなかったためと思われる。この表現型をさらに詳細に観察するために JAK/STAT シグナルの機能喪失変異クローンを作成すると proneural wave の進行が速くなることが観察された。逆に機能獲得変異クローンでは proneural wave の進行が遅くなることを見出した。リガンドである Upd を異所的に発現することによっても proneural wave の進行の遅滞が観察された。これらの変異の表現型と活性の勾配から、JAK/STAT シグナルは proneural wave の進行を負に制御しており、神経上皮の増殖と相まって勾配に従って徐々に proneural wave が遠位側に動いていき、神経上皮を神経芽細胞にリクルートしていくと考えられる (Figure 2.)。

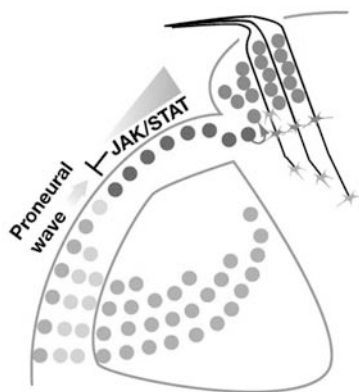


Figure 2. JAK/STAT signal antagonizes proneural wave progression

Schematics of the horizontal section of the developing optic lobe as in Figure 1. JAK/STAT signaling is activated in the neuroepithelial cells and its activation is high in the lateral and low in the medial side of neuroepithelial. As the neuroepithelial cells proliferate, the source of the Upd ligand moves laterally and so on the activation of the JAK/STAT signaling. Medial neuroepithelial cells freed from negative regulation of JAK/STAT signaling express L(1)sc and proneural wave moves laterally.

Proneural wave を正に制御する EGF シグナル

JAK/STAT シグナルによる負の制御だけで proneural wave の進行は説明できるであろうか。私たちは正のシグナルの存在の可能性を探るうちに EGF シグナルが有力な候補であることを見出した。EGF シグナルの直接のターゲットである Pointed が proneural wave で特異的に発現していることから、そこで EGF シグナルが活性化されることが示された。このシグナル

の主たるリガンドと思われる Spitz は神経上皮全体で発現している。Spitz は不活性な前駆体として発現し、Rhomboïd による切断を受けて初めて活性のあるリガンドとなるため、Rhomboïd の発現制御が重要である。抗体染色の結果、Rhomboïd は proneural wave で発現していること、この Rhomboïd の発現は EGF シグナルに依存していることがわかった。そこで、以下の仮説が考えられた。Proneural wave では Rhomboïd が発現し、そこで Spitz を活性化する。活性型 Spitz は分泌され隣の上皮細胞にシグナルを送るとそれは l(1)sc を発現し、神経芽細胞となる。同時に、Rhomboïd の発現も誘導するので、EGF シグナルの連鎖が起こり proneural wave が進行していく (Figure 3.)。この仮説を証明するために EGF 受容体の変異クローンを作成したところ、細胞自律的に l(1)sc も神経芽細胞のマーカーの発現もみられなかった。また異所的に活性型受容体や活性型 Spitz を発現させたところ、その場に神経芽細胞の分化が誘導された。また、RNA 干渉法により、Spitz や Rhomboïd の発現をノックダウンすると神経芽細胞の形成が阻害された。以上のことから EGF シグナルが proneural wave 進行の正のシグナルであると考えられるが、機能喪失型変異クローン作成による確認実験の結果を待つ最終結論にしたいと思っている。

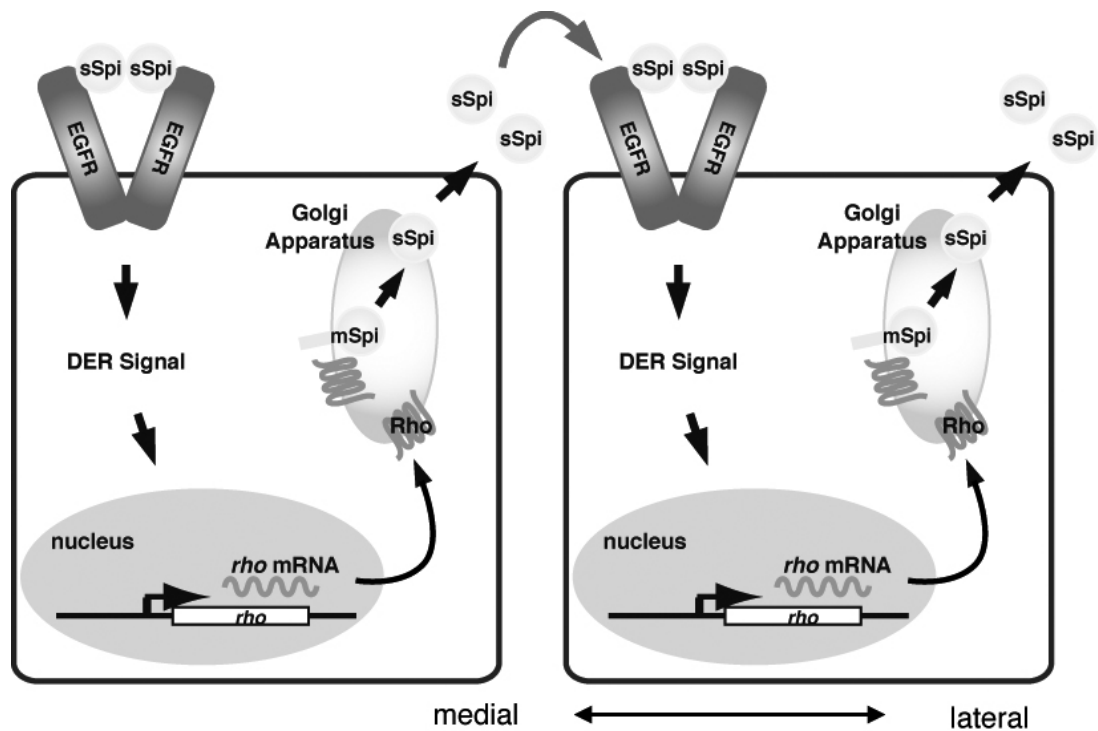


Figure 3. EGF signal progresses proneural wave

Rhomboïd in the cells at proneural wave processes Spitz, which then activates EGF signal in the neighboring cells. This inductive mechanism progresses proneural wave.

考察

正確な視覚系神経回路の形成

私たちが正確に外界を認識するためには眼の光受容細胞の2次元の配列が、視神経の脳への投射およびそこでのシナプスの形成の際に正確にその相対位置を保っている必要がある。これは retinotopic map とよばれ、神経回路形成の良いモデルとして研究されてきた。ショウジョウ

バエの視覚中枢には最も外側のラミナ神経節とその内側にメダラ神経節があり、それぞれに視神経が直接投射することから、光受容細胞とそれぞれの神経節の神経の数と位置は正確に対応づけるメカニズムがあるはずである。ラミナ神経の分化は投射してくる視神経（光受容細胞の軸索）によってもたらされるヘッジホッグシグナルによって誘導される。ショウジョウバエの光受容細胞の分化は後部から前部に向かって時間とともに規則正しく進行する。先に成熟した後部の光受容細胞からの軸索がラミナ領域に到達すると、そこにラミナ神経の分化を誘導する。この場合、視神経はシナプスを形成する相手の分化をその場で自ら誘導することになり、効率のよい正確な神経回路形成が可能であると思われる。一方メダラ神経の形成には視神経の入力は不要であり、どのようにして正確な回路を形成するか不明である。

STAT の大きな変異クローンができると、メダラ神経が過剰に形成され、本来ラミナができるはずの場所にまで浸食していく。ラミナとメダラは一続きの共通の神経上皮から分化するので、両者の形成は共通のリソースを取り合うことになり、そのためにメダラ神経の形成はラミナ神経の形成とバランスが取れており、ひいては視神経との対応がとれ、retinotopic map 形成に寄与しているのではないかと考えられる。JAK/STAT シグナルのリガンドである Upd がラミナ領域に隣接した上皮で発現していることがこの調節に意味を持っているかもしれない。

シグナル間の相互作用

相反する JAK/STAT シグナルと EGF シグナルはお互いにどのように作用するであろうか。両シグナルの構成的活性型変異因子を異所的に同じ細胞で発現させると proneural wave の遅滞が起こり JAK/STAT シグナルが下流にあることが示された。EGF シグナルは JAK/STAT シグナルを抑えることによって proneural wave を進行させるようであるが、JAK/STAT シグナルの下流因子を同定しないと結論は出せない。Notch シグナルも重要な因子であり、解析を進めているがまだ結論を出すにいたっていない。この三者の相互作用を明らかにすることで、proneural wave 進行のメカニズムの全貌を解明できるであろう (Figure 4.)。

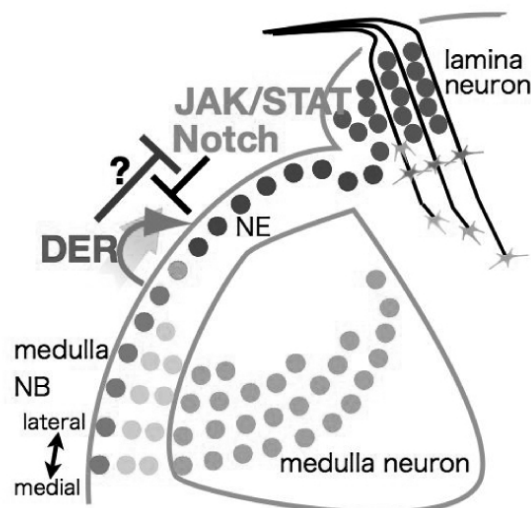


Figure 4. JAK/STAT, EGF and Notch signal may interact and regulate progression of proneural wave

Schematics of the horizontal section of the developing optic lobe as in Figure 1.

EGF signal progresses proneural wave and JAK/STAT and Notch antagonize it.

主な口頭発表

Tetsuya Tabata

Cellular and molecular mechanisms underlying neural circuit formation in *Drosophila* visual system

Gradients and signaling: from chemotaxis to development

OIST, Okinawa, Japan, 11/17-21, 2008

Tetsuya Tabata

Visual system development of *Drosophila*

Frontiers in Developmental Biology, Giens, France, 9/13-17, 2008

Tetsuya Tabata

The life of medulla neurons in the *Drosophila* visual center

Gordon Research Conference, Visual system development, Salve Regina University, New Port, RI, U. S. A. 8/10-15, 2008

Tetsuya Tabata

Neurogenesis in the *Drosophila* visual center.

Progress in Developmental Biology, Swiss-Japanese seminar, Arosa, Swiss, 1/6-9, 2008