

博士論文

静止期成体神経幹細胞の維持における **Notch3** の役割の解析

河合 宏紀

目次

	ページ
略語一覧	2
緒言	4
第一章 序論	5
第二章 材料と実験方法	17
第三章 結果	22
第四章 考察	51
結言	58
参考文献	59
発表論文	65
謝辞	66

略語一覧

ADAM	containing a disintegrin and metalloprotease
aNSC	activated NSC
Ara-C	antimitotic Cytosine β -D-Arabinofuranoside
BMPR	Bone Morphogenetic Protein Receptor
BrdU	Bromodeoxyuridine
BSA	Bovine Serum Albumin
CalB	Calbindin
CR	Calretinin
Dcx	Doublecortin
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGFP	Enhanced GFP
E~	Embryonic day ~
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FGF	Fibroblast Growth Factor
GE	Ganglionic Eminence
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
IdU	Iododeoxyuridine
IRES	Internal Ribosome Entry Site
Lex	LewisX
MAML	Mastermind-like
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NICD	Notch intracellular domain
NSC	Neural Stem Cell

PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyde
PGL	Periglomerular Layer
POMC	Pro-opiomelanocortin
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
qNSC	quiescent NSC
RAM	RBP-jk-associated Molecule
RBP-J	Immunoglobulin Kappa J Region Recombination Signal Binding Protein 1
RFP	Red Fluorescent Protein
RMS	Rostral Migratory Stream
Shh	Sonic Hedgehog
TAD	Transactivation Domain
TBS	Tris-Buffered Saline
TH	Tyrosine Hydroxylase

緒言

哺乳類の脳内には神経幹細胞が存在し、一生にわたってニューロンを産生する。新生ニューロンは記憶・学習や脳損傷の修復に貢献すると考えられている。神経幹細胞は通常静止状態にあり、長期的に維持されているが、適切なタイミングで活性化されて分裂・分化する。この静止状態と活性化状態のバランスが破綻すると、過剰なニューロン産生や、神経幹細胞の枯渇などを招く。Notch シグナルは静止期神経幹細胞の維持と、分裂の促進という重要な機能を果たしているが、いかにしてこの相反する2つの制御を行っているのかは明らかでなかった。ニューロン新生は主に、側脳室の側壁に面した脳室下帯と海馬の歯状回に局限しているが、成体マウスの脳室下帯において近年、Notch 受容体アイソフォームの一つであるNotch1 のノックアウトによって活性化神経幹細胞が減少することが報告された。興味深いことに、このとき静止期神経幹細胞の減少は起こらなかった (Basak et al., 2012)。従って、静止期神経幹細胞の維持には別のNotch 受容体アイソフォームが関与していることが予想されるが、どのNotchアイソフォームが機能しているのかは、不明であった。

脳室下帯の神経幹細胞から産生された未成熟なニューロンは嗅球へと移動し、成熟する。嗅球は多数のニューロンサブタイプが秩序だった層構造を形成しているため、神経回路を再編成する新生ニューロンの種類は、嗅球機能に重要であると考えられる。脳室下帯の神経幹細胞は不均一な集団であり、脳室下帯の領域によって産生する嗅球のニューロンのサブタイプが異なることが報告されてきた (Merkle et al., 2007等)。このことから、脳室下帯の領域ごとの神経幹細胞の制御が、各新生ニューロンサブタイプの数、そして嗅球の機能に重要な役割を担っていると考えられる。しかしながら、領域特異的に神経幹細胞の機能を制御する分子的メカニズムについてはほとんどわかっていない。

そこで本研究ではまず、静止期神経幹細胞の維持を担うNotch 受容体のアイソフォームを同定することを目的とした。さらに、同定したNotch 受容体アイソフォームの機能が脳室下帯の領域間で異なるかどうかを検討することにした。

第一章 序論

成体の神経幹細胞

成体哺乳類の脳内では、海馬歯状回や嗅球などの限局した領域においてのみ新生ニューロンが供給され続けていることが知られている。嗅球と海馬歯状回の新生ニューロンはそれぞれ、脳室下帯と海馬歯状回に存在している神経幹細胞 (Neural stem cell : NSC)によって一生に渡って産生され続けている。また、この2箇所が最大の神経幹細胞ニッチである。脳室下帯に存在する神経幹細胞 (B1細胞) の多くは細胞分裂をしていない静止状態にある静止期神経幹細胞 (quiescent NSC : qNSC) である。神経幹細胞は活性化されると (活性化神経幹細胞 (activated NSC : aNSC)) 増殖し、一過性増殖細胞 (C細胞)、神経芽細胞、そして未成熟ニューロンへと順に分化する (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Chaker et al., 2016) (Fig. A)。これらの未成熟ニューロンは、前方の嗅球へと Rostral Migratory Stream (RMS) と呼ばれる長い経路を分裂しながら移動し、最終的に顆粒細胞および傍糸球体細胞に約4週間かけて分化し、先天的・後天的嗅覚行動を制御する (Sakamoto et al., 2011, 2014)。

成体の神経幹細胞は胎生期の神経系前駆細胞の一部が残って形成される。胎生期神経系前駆細胞は成体の神経幹細胞とは異なり、分裂を繰り返しながら脳を構築する神経細胞を次々に産み出している。これまで成体の神経幹細胞は脳を構築し終わった後に神経系前駆細胞の一部が残って成体の神経幹細胞になると考えられてきた。しかし近年、脳構築の途中の時期 (マウスの胎生13日目から15日目頃) に既に他の神経系前駆細胞とは異なりゆっくりと分裂をしているか、または静止した特別な細胞群 (起源細胞) が存在し、この細胞群が成体の神経幹細胞になることが報告された (Fuentelba et al., 2015; Furutachi et al., 2015)。

脳室に面した脳室帯には脳室と脳室帯の内側を隔てる壁のような役割を果たす上衣細胞が存在している。脳室下帯はその上衣細胞層の内側の領域である。上衣細胞は、表面に多数の長い繊毛を有する上皮細胞である。上衣細胞は、側脳室と上衣細胞層の内側との隔たりを成す壁としての役割の他に、その繊毛の運動によって側脳室内を流れる脳脊髄液の流動を制御したり、側脳室と脳室下帯の間の物質交換を行ったりといった役割を担う。また、bone morphogenetic protein (BMP) シグナルを阻害する Noggin を産生しており、神経幹細胞

の維持やニューロン産生の制御に関与している (Lim et al., 2000)。神経幹細胞は細胞体の一部である細長い突起を上衣細胞の隙間に伸ばしており、これが脳室に接して直接脳室とコンタクトをしている。脳室面から観察すると、神経幹細胞の伸ばした突起を上衣細胞が取り囲み、風車状 (pinwheel) 構造を形成している。この構造が神経幹細胞の機能や分布の決定に何らかの貢献をしていると考えられているが、明らかではない。上衣細胞は上述の通り多数の繊毛を持つが、神経幹細胞も脳室と接した小さな範囲に一次繊毛を形成して脳室内に伸ばしている。この一次繊毛は、脳脊髄内を流れる Sonic hedgehog (Shh) などのシグナル分子を受容する場として機能していると考えられている。

神経幹細胞の発見

幹細胞は、自己複製能と多分化能を有する細胞であるが、脳室下帯において自己複製能と多分化能を有する前駆細胞が存在することは、*in vitro* における neurosphere 法によって示された。脳室下帯の細胞を、低密度で、増殖因子である epidermal growth factor (EGF) または fibroblast growth factor 2 (FGF2) の存在下で浮遊培養すると、一部の細胞は一つの細胞由来の (クローナルな) 細胞塊 (neurosphere) を形成する。すなわち、脳室下帯には自己複製能を有する細胞が存在することがわかる。neurosphere の中には、増殖因子を除去して無血清培地中で培養することでニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトという神経系を構成する主な細胞種へと分化誘導する事ができるものがあり、このような自己複製能を有する neurosphere を形成するもとの細胞は多分化能を有する細胞である事が示唆される。また、neurosphere を継代する事により、一部の neurosphere の中には neurosphere を再び形成する事のできる細胞が存在する事がわかる。従って、neurosphere 形成能を持つ細胞の一部は、多分化能を維持しながら増殖できる細胞である事が示された (Reynolds and Weiss, 1992, 1996; Morshead et al., 1994)。

in vivo における成体神経幹細胞の存在は様々なアプローチによって示されてきた。deoxythymidine や bromodeoxyuridine (BrdU) は S 期の細胞に取り込まれるため、個体に投与することによって分裂中の細胞とそこから産み出された細胞を検出することができる。BrdU をマウスに投与すると、BrdU 陽性なニューロンが観察されることから、新生ニューロンの存在が確認できる。また同時に脳室下帯のアストロサイトがラベルされてい

ることが観察された。さらにこのアストロサイトの中には長期的にラベルを保持している細胞が存在していた。これらのことから脳室下帯のアストロサイトが神経幹細胞である可能性が示唆された (Doetsch et al., 1999)。また、このアストロサイトは glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性であり、GFAP 陽性な細胞をラベルすることによってもニューロンへと分化する細胞が観察されている。Cytosine β -D-Arabinofuranoside (Ara-C) を投与すると分裂細胞を殺すことができる。Ara-C によって分裂細胞を殺したのちに、GFAP 陽性な細胞からニューロン分化が行われていることが観察された (Doetsch et al., 1999)。また、LewisX (LeX)/ssea-1 も神経幹細胞のマーカーとして報告されている (Capela and Temple, 2002)。Fluorescence-activated cell sorting (FACS) によって神経幹細胞を分取する試みが行われてきたが、GFAP は細胞内タンパク質であることから、抗体免疫染色によっては GFAP をマーカーとして分取することはできない。そのため、抗体免疫染色を用いた FACS の分取法として LeX が使われる。また、種々の幹細胞や前駆細胞が発現している CD133/Prominin-1 もまた神経幹細胞に発現しており、FACS による神経幹細胞の分取に用いられる。しかし、CD133/Prominin-1 は繊毛に集積しており、神経幹細胞だけではなく、上皮細胞も同時に発現している。これらのマーカーは単独では神経幹細胞の分取が難しいため、ニューロンマーカーである CD24 など幾つかのマーカーの組み合わせが用いられる (Pastrana et al., 2009; Beckervordersandforth and Tripathi, 2010; Daynac et al., 2013; Codega et al., 2014)。

胎生期の神経系前駆細胞

胎生期の脳には脳を構築する細胞が存在し、ニューロンやグリア細胞を産生する。この細胞は発生の進行に伴い分化様式を変化させていくことから、限定的な多分化能を有しており、神経系前駆細胞と呼ばれる。神経系前駆細胞は、最初は未分化性を維持したまま対称分裂することにより増殖し、分化せずにその数を増やす（増殖期、マウス胎生 7~10 日目）。その後ニューロンを産生するようになる（ニューロン分化期、マウス胎生 11~18 日）。さらに発生が進むと一部の細胞がグリアに分化するようになる（グリア分化期、マウスでは胎生 17、18 日目以降）(Temple, 2001; Ohtsuka and Kageyama, 2004)。上述した neurosphere 法は胎生期の神経系前駆細胞でも同様に行うことができ、また *in vitro* においても培養期間によってニューロンを産生する時期とその後のグリアを産生する時期が見

られることから、この神経系前駆細胞の分化様式の変化は少なくとも細胞内在的なメカニズムが存在することがわかる。また、この *neurosphere* 法は神経前駆細胞だけを濃縮でき、さらに生体から採取するよりも多くの細胞を取得できるため、実験的に有用な系である。

成体神経幹細胞の不均一性

脳室下帯の神経幹細胞は不均一な集団であり、その空間的な位置関係が細胞運命と相関している。例えば、*calretinin* 陽性、*calbindin* 陽性そして *Tyrosine Hydroxylase* (TH) 陽性な傍系球体細胞はそれぞれ、脳室下帯の *medial* 側、*lateral/ventral* 側、そして *dorsal* 側から主に産生されることが報告されている (Merkle et al., 2007; Young et al., 2007; Fernández et al., 2011)。脳室下帯の領域間では *Emx1* (*dorsal*) や *Gsx2* (*lateral*)、*Nkx2.1* (*ventral*) などの既知の遺伝子発現の違いが存在するが、脳室下帯がどの程度機能的ドメインとして領域を分けることができるのかは明らかではなく、神経幹細胞の性質にどれほどバリエーションが存在するのかについても、十分な知見は得られていない。

上述した *calretinin* 陽性、*calbindin* 陽性そして TH 陽性な傍系球体細胞など、嗅球に供給される新生ニューロンは、その細胞数や機能が異なっている。したがって、神経幹細胞は脳室下帯における位置や環境によって異なった制御を受けて、産み出すニューロンサブタイプの数や、産み出すニューロンサブタイプそのものを決定していると考えられる。実際に、*ventral* 側の神経幹細胞は *Shh* シグナルや *Pro-opiomelanocortin* (POMC) ニューロンのアクソンによって制御を受けていることが報告されている (Ihrie et al., 2011; Paul et al., 2017)。しかしながら、神経幹細胞の領域特異的な制御に関わる分子メカニズムについては、未だに明らかになっていることは少ない。

上述のように *Shh* シグナルや POMC ニューロンのアクソンなど外的なシグナルによる制御もあるが、こうした領域によって異なるニューロンを新生するという神経幹細胞の性質の違いには細胞内在的な制御も報告されている。上述したように、神経幹細胞 (神経系前駆細胞) は *in vitro* の培養によってもその性質が維持できる。そこで異なる領域から取得した神経幹細胞を *in vitro* で培養したのちに、分取した場所とは異なる領域に移植する実験が行われた。すると、神経幹細胞から産生されたニューロンサブタイプは、神経幹細胞が元々存在していた領域に由来するものであり、移植後の領域から産生されるタイプではなかつ

た (Merkle et al., 2007)。このことから、少なくとも産生するニューロンサブタイプが異なるという神経幹細胞の領域による性質の違いは、細胞内的なメカニズムが存在するということがわかる。

静止期神経幹細胞

神経幹細胞は一生に渡ってニューロン新生を行うため、長期的な神経幹細胞の数の維持と、ニューロンの新生という二つのことを同時に行わなければならない。そのために、神経幹細胞は静止期と活性化状態のバランスの制御を正確に行なっていると考えられる。つまり、長期的に神経幹細胞の数を維持するために、多くの神経幹細胞は静止状態にあり、そこから適切な数の静止期神経幹細胞が活性化されることでニューロン新生を継続的に行なっている。神経幹細胞の静止状態を壊すと、短期的には活性化神経幹細胞とさらに分化した細胞の増加を招くことでニューロン新生が増加する。その後長期的には次第に神経幹細胞は枯渇し、ニューロン新生が減少する (Groszer et al., 2006; Nam and Benezra, 2009; Renault et al., 2009; Imayoshi et al., 2010; Mira et al., 2010; Kawaguchi et al., 2013; Martynoga et al., 2013; Porlan et al., 2013; Furutachi et al., 2015)。したがって、神経幹細胞の静止期を正しく制御することが長期的な神経幹細胞数及びニューロン新生の維持と、新生ニューロンの数を決定する上で重要であると考えられる。神経幹細胞がいかにして神経幹細胞数を保ちながら、ニューロン新生を続けているのかについては様々なモデルが提唱されてきた。BrdU等のチミジンアナログを用いて分裂細胞を標識する実験から、神経幹細胞が一度活性化した後、静止期神経幹細胞に戻ることが観察されており、このことがニューロン新生を長期に渡って継続できる理由の一つであると考えられてきた。しかし近年の報告から、多くの神経幹細胞は一度活性化すると分裂を繰り返しながら分化してしまい、神経幹細胞として残らないことが報告された (Calzolari et al., 2015)。実際に、神経幹細胞は枯渇しないものの老化とともに数を減らすことが知られており (Shook et al., 2012)、この可能性を支持している。

活性化神経幹細胞を静止期神経幹細胞に対して、分裂を行っているという性質から Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) や Ki67 といった細胞分裂マーカー陽性な細胞として定義されるが、Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) 陰性な静止期神経幹細胞と

EGFR 陽性な活性化神経幹細胞として分けることができることも報告されている (Doetsch et al., 2002; Pastrana et al., 2009)。EGFR は膜たんぱく質であることから FACS に他の神経幹細胞マーカーと共に用いることで、静止期神経幹細胞と活性化神経幹細胞を分取することができる (Pastrana et al., 2009; Daynac et al., 2013; Codega et al., 2014)。しかし、静止期神経幹細胞と活性化神経幹細胞の遺伝子発現の違いについては、近年にトランスクリプトーム解析が行われ、これまで神経幹細胞のマーカーの一つであると考えられてきた Nestin が静止期神経幹細胞では発現していないことを示唆する報告がなされる (Codega et al., 2014) など、未だ十分には明らかになっていない。

Notch シグナル

Notch シグナルは、神経系やその他の様々な細胞の分化や組織の形成において非常に重要な役割を果たしている事が知られており、線虫からヒトに至るまで進化的によく保存された細胞間のシグナル伝達経路である。Notch シグナル伝達系を構成する分子の異常により、様々な致死的な発生不全を起こしたり、成体において癌など多くの疾患の原因となったりすることからもヒトをはじめとして多くの生物において非常に重要なシグナル経路であることがわかる。

Notch およびそのリガンドの基本構造

Notch は 1 回膜貫通型の受容体であり、ショウジョウバエでは 1 種類、哺乳類では Notch1 ~4 までの 4 種類あることが知られている。中枢神経系においては Notch1 ~Notch3 までは発現が報告されているが、Notch4 についてはほとんど報告がない (Irvin et al., 2004)。外に EGF リピート、Lin-Notch リピート、細胞内に Ankyrin リピート、RBP-jk-associated molecule (RAM) ドメイン、transactivation domain (TAD) ドメイン、proline–glutamic acid–serine–threonine (PEST) 配列を持つ (Fig. B)。EGF リピートは、隣接細胞のリガンドとの結合に必須のドメインである。また、RAM ドメインは核内で Immunoglobulin Kappa J Region Recombination Signal Binding Protein 1 (RBP-J) と複合体を形成するために必要であり、Ankyrin リピートは、さらに mastermind-like (MAML) と複合体を形成して DNA と結合するために必要である。また PEST 配列はタンパク質の不安定化に関わる配列であり、Notch の細胞内ドメインの

分解を促進する。Notch による標的遺伝子の活性化は、RAM ドメインと Ankyrin リピート、そして部分的に TAD ドメインに依ることがわかっている。Notch のリガンドは、ショウジョウバエにおいては Delta、Serrate の 2 種類があり、哺乳類では Delta のホモログが Delta-like 1, 3, 4 (Dll1, 3, 4) の 3 種類、Serrate のホモログが Jagged 1, 2 の 2 種類あることが知られている。リガンドも 1 回膜貫通型タンパク質であり、Notch と共通に持つ EGF リピートの領域において Notch と結合する。

Notch シグナルの活性化機構

Notch は膜受容体であり、隣接細胞の細胞膜上のリガンドと細胞間で結合すると、ADAM (containing a disintegrin and metalloprotease) ファミリーによって細胞外ドメイン (Notch intracellular domain : NICD) が切断され、それに続いて細胞内ドメインが γ -secretase によって切断されることで細胞内ドメインが遊離する。切断された細胞内ドメインは、核内に移行すると、RBP-J や MAML と複合体を形成し、Hes ファミリーなどの標的遺伝子の転写を活性化し、その結果 Ascl1 などの proneural 遺伝子の発現を抑制する (Yoon and Gaiano, 2005; Ables et al., 2011; Pierfelice et al., 2011) (Fig. C)。このリガンドの結合による Notch の活性化は、リガンドが Notch を物理的に引っ張ることで Notch の構造が変化し ADAM による切断部位が露出することで Notch の活性化が進行することが示唆されている (Meloty-Kapella et al., 2012)。どのリガンドも同様のメカニズムで Notch を活性化できると考えられているが、Dll3 だけは Notch を活性化することができないと考えられている。

Notch 受容体の翻訳後修飾

Notch 受容体の EGF リピートは翻訳後に糖鎖修飾を受けることが知られており、Notch の活性に重要な役割を担っている。O-Fucose (O-Fuc) 単糖は、タンパク質 O-Fuc 転移酵素 (ショウジョウバエでは O-fucosyltransferase (Ofut1)、哺乳類では Protein O-Fucosyltransferase 1 (Pofut1)) によって付加される。O-Fuc 転移酵素の欠損によって Notch の機能欠損と似た表原型が見られること (Okajima and Irvine, 2002) や、特定の O-Fuc 修飾部位の変異によって Notch の活性が弱まること (Rampal et al., 2005) などから O-Fuc は Notch の活性に必須の役割を担っていると考えられる。

Fringe は O-Fuc に GlcNAc を付加して GlcNAc-Fuc を合成する。Fringe は翅の原基 (wing disc) の背腹の境界を決める因子として同定され (Irvine and Wieschaus, 1994)、その後 Fringe が GlcNAc 転移酵素であること及び、GlcNAc-Fuc が Notch と Delta との結合を増強し、Serrate との結合を減弱することが報告された (Brückner et al., 2000; Moloney et al., 2000)。つまり Fringe は Notch にリガンド特異性を与える分子である。哺乳類においては Lunatic fringe (Lfng)、Manic fringe (Mfng)、Radical fringe (Rfng) の 3 種類がある。基本的には哺乳類の Fringe もショウジョウバエと同様にリガンドとの相互作用を調整していると考えられており、Jagged1 からのシグナルを阻害し、Dll1 と Notch1 及び Notch2 の相互作用を増強することが報告されている (Yang et al., 2005)。また、3 つの Fringe には活性の強さに違いがあることや Lfng や Mfng がリガンド特異性を与える一方で Rfng は Jagged1 及び Dll1 両方のシグナルを増強することも報告されており (Rampal et al., 2005; Kakuda and Haltiwanger, 2017)、使い分けられている可能性が示唆されているが、十分には解明されていない。

成体の神経幹細胞における Notch シグナルの役割

Notch シグナルは中枢神経系全体において胎生期から成体に至るまで神経幹細胞の未分化性の維持を担っている。それに加えて、成体脳室下帯においては静止期神経幹細胞の分裂を抑制して神経幹細胞の静止期の制御を行なっている。RBP-J の欠損は一過的な静止期神経幹細胞の活性化を引き起こし、その後神経幹細胞の枯渇を起こす (Imayoshi et al., 2010)。一方で、Notch1 の欠損によっては静止期神経幹細胞の減少は起こらず、活性化神経幹細胞の選択的減少が起こる (Basak et al., 2012)。このことから Notch1 は神経幹細胞の増殖を促進していることが示唆されている (Nyfeler et al., 2005; Androutsellis-Theotokis et al., 2006; Aguirre et al., 2010; Basak et al., 2012)。そのため、脳室下帯において神経幹細胞の静止期制御を担っている Notch 受容体は不明である。

成体神経幹細胞における Notch リガンド

成体の脳室下帯では Dll1 と Jagged1 が発現して、神経幹細胞の機能の維持に貢献していることが報告されている。Dll1 は活性化神経幹細胞と一過性増殖細胞に発現しており、静止期神経幹細胞の維持に貢献していることが報告されている (Kawaguchi et al., 2013)。興

味深いことに、Dll1 は神経幹細胞の分裂時に非対称に分配され、娘細胞の未分化性と静止期の維持に貢献することが示唆されている。また、血管内皮細胞に発現している Jagged1 が神経幹細胞の静止期の維持に貢献しているという報告もされている (Ottone et al., 2014)。従って、神経幹細胞は異なる細胞種から異なるリガンドとの相互作用によって静止期の維持を制御されているが、それぞれのリガンドが神経幹細胞の静止期の維持にどのような差異を持っているのかは明らかでない。

Notch3

Notch3 は哺乳類 Notch 受容体アイソフォームの一つである。全ての Notch 受容体アイソフォームは先述した構造的特徴、すなわち細胞外に EGF リピート、Lin-Notch リピート、細胞内に Ankyrin リピート、RAM ドメイン、TAD ドメイン、PEST 配列を共通に持つが、Notch3 は Notch1 や Notch2 と比べて TAD ドメインが短いか、または機能的でない (Fig. C)。この Notch3 の TAD ドメインは RBP-J と MAML との複合体が結合する CSL (CBF-1/RBP-Jk, Suppressor of hairless and Lag-1) 配列の近くにあるジンクフィンガードメイン結合配列に結合することができ、Hes5 などのプロモーターを活性化できることが報告されている (Ong et al., 2006)。またそのほかに、Notch3 は Notch1 と比べて ankyrin リピートは比較的相同性が高く (72%) 一方で RAM ドメイン (41%) や、C 末端 (21%) は相同性が低い (Bellavia et al., 2008)。

Notch3 の幹細胞や前駆細胞における報告としては筋肉におけるサテライト細胞 (Kitamoto and Hanaoka, 2010) や乳腺における管腔前駆細胞 (Lafkas et al., 2013)、海馬歯状回における神経幹細胞 (Ehret et al., 2014) などの組織幹細胞においてその静止期との関連が報告されている。ゼブラフィッシュにおいては、Notch3 のホモログと Notch1 のホモログがそれぞれ静止期神経幹細胞と活性化神経幹細胞において細胞周期制御を担っていることが報告されている (Alunniet al., 2013)。以上のことから、Notch3 は他の Notch 受容体と共通した機能を持ちながらも構造的、機能的差異を持ち、幹細胞における静止期の制御に貢献している報告があることから、脳室下帯の神経幹細胞における静止期制御を担う分子としての可能性を考えた。

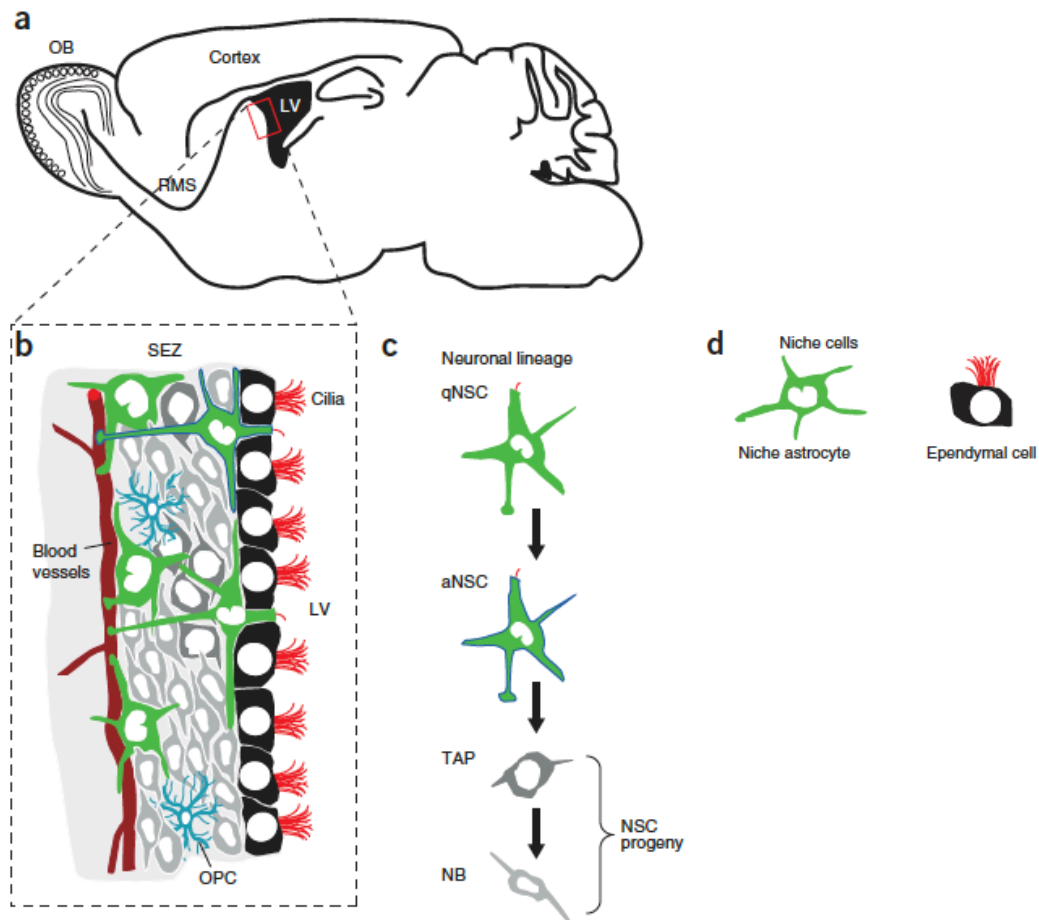


Fig. A マウスの脳室下帯の構造

a, マウス成体脳のサジタルセクション。**b** で示す脳室下帯の図は赤で囲んだ領域。**b**, 脳室下帯の構造。側脳室 (LV) 上皮細胞 (Ependymal cell) が並び、その間から静止期神経幹細胞 (qNSC) 及び 活性化神経幹細胞 (aNSC) が突起を脳室に伸ばしている。その周りには一過的増殖細胞 (TAP) 及び神経芽細胞 (NB) が存在している。またオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) やアストロサイトも存在し、血管が通っている。**c**, 神経幹細胞リネージの分化様式。**d**, 脳室下帯に存在する他の細胞。

Fischer et al., 2011 より転載。

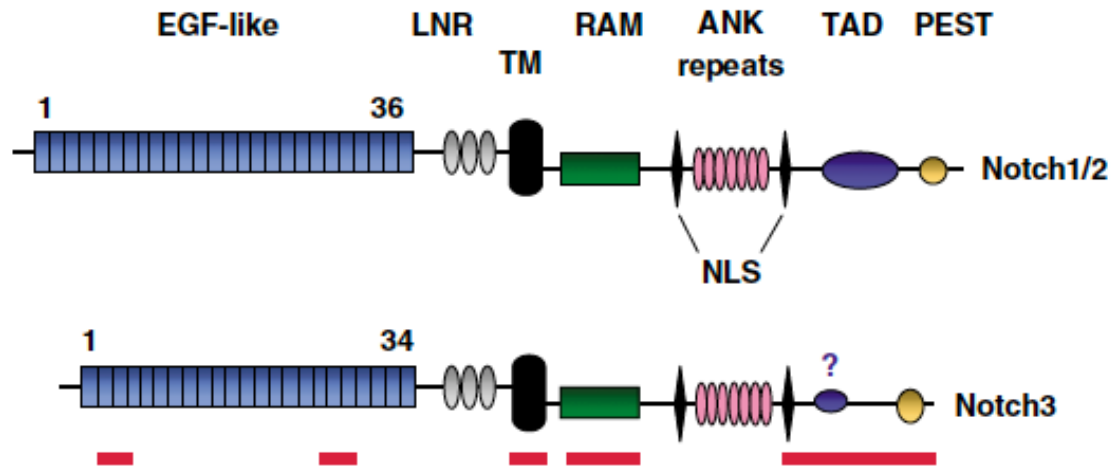


Fig. B Notch1/2 に対する Notch3 の構造的差異

赤線は Notch1/2 と相同性の低い位置を示す。Notch3 は Notch1/2 に比べて特に TAD ドメインが短くなっている。

Bellavia et al., 2008 より転載。

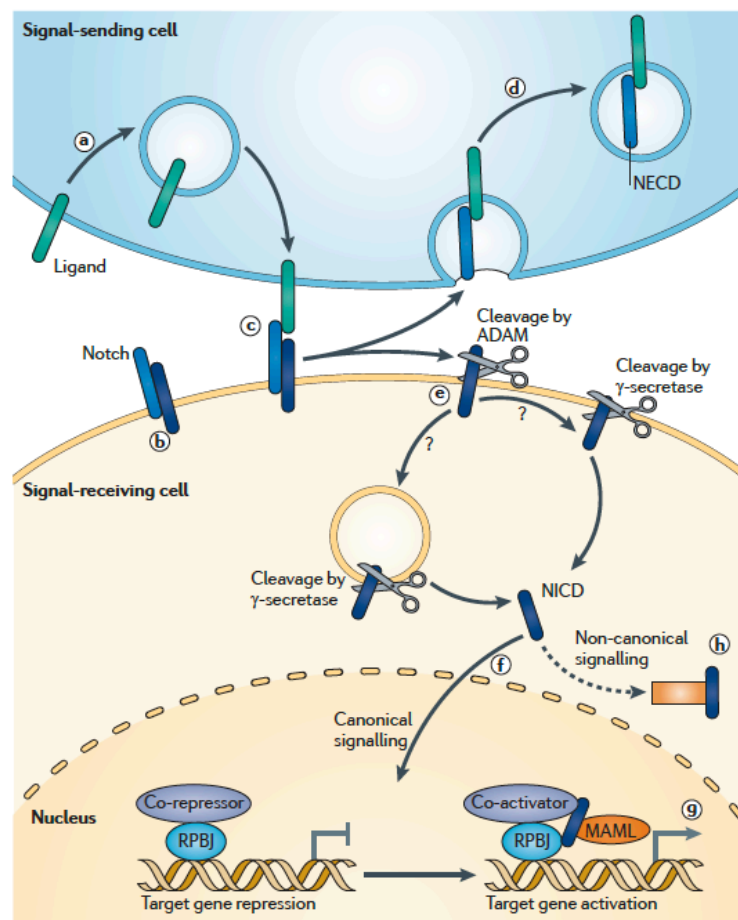


Fig. C Notch シグナル経路

Notch 発現細胞 (下) の Notch 受容体 (b) が隣接するリガンド発現細胞 (上) のリガンド (a) と結合する (c) と (ADAM) によって Notch の細胞外ドメインが切り離され、細胞外ドメインはリガンド発現細胞に取り込まれる。細胞外ドメインが切り離された Notch 受容体は引き続いて γ -secretase によって細胞内ドメインが切断されて遊離する。遊離した細胞内ドメインは核内に移行し (f)、RBP-J や MAML 及び他のタンパク質と複合体を形成してターゲット遺伝子の発現を誘導する (g)。細胞内ドメインは核内に移行せずに他の機能を果たす場合もある (h)。

Ables et al., 2011 より転載。

第二章 材料と実験方法

マウス

C57BL/6J にバッククロスした Notch3 ノックアウトマウス (Kitamoto et al., 2005) を用いた。野生型マウスである ICR マウスを SLC Japan より購入し、神経系前駆細胞の初代培養系及び *in situ* hybridization に用いた。他の実験においては 2-3 ヶ月齢の C57BL6 マウスを用いた。すべてのマウスは、東京大学の Animal Care and Use Committee によるプロトコルに基づいて維持・使用した。

プラスミド

pCAG-IRES-EGFP (pCAGIG) は Dr. C. L. Cepko と Dr. T. Matsuda よりご供与頂いた。CAG2IG-NICD1 と pCAG2IG-NICD3 は、3XFlagNICD1 (Plasmid #20183) と 3XFlagNICD3 (#20185) を Addgene より購入し、pCAGIG よりマルチクローニングサイトを改変した pCAG2-IRES-EGFP (pCAG2IG) にインサートして作成した。

神経系前駆細胞の単離

胎生 11.5 日目（プラグ確認日 0 日とする）の ICR マウス的大脑から大脳基底核原基を切り出し、神経系細胞分散液 (Sumitomo Bakelite) を用いたパパイイン処理によって個々の細胞に分離して実験に用いた。得られた細胞を、3 日間浮遊培養して neurosphere を形成させる事で神経系前駆細胞をより選択的に培養した。一連の作業は過去の報告の通りに行った (Hirabayashi et al., 2009)。

in vitro トランスフェクション及びインフェクション

3 日間浮遊培養した neurosphere をトリプシン処理によって再分散させ、pCAG2IG、pCAG2IG-NICD1 または pCAG2IG-NICD3 のいずれかを Lipofectamine 2000 (Invitrogen) のプロトコルに従ってトランスフェクションを行なった。DNA 総量を揃えるために pCAG を用いた。固定前に 10 μ g/ml の BrdU を 4 時間添加することでラベルをした。レンチウイ

ルスのインフュクションをする際は、20 時間ウイルス添加培地で培養したのちに、通常の培地に戻して 2 日間培養した。

免疫染色

大脳組織切片の蛍光免疫染色においては、まず、マウスを麻酔によって深く眠らせ、氷冷した 4 % paraformaldehyde (PFA) / Phosphate-Buffered Saline (PBS) で灌流固定を行なった。大脳を取り出し、4 % PFA/PBS を用いて 4 °C で 2–3 時間後固定を行なった。4 °C で 10 % sucrose/PBS 中に浸した。大脳が沈んだところで、さらに 20 % sucrose/PBS に溶液を置換した。同様に、30% sucrose/PBS 溶液に置換して一晩放置した。この大脳を OCT compound (Tissue Tek) 中に包埋し-80 °C で冷凍した。12–40 μ m の厚みの切片を作成し、0.1 % Triton X-100 を含む 3 % Bovine Serum Albumin (BSA)/ Tris-Buffered Saline (TBS) (blocking buffer) で 2 時間室温に置き、その後 1 次抗体を含む blocking buffer で 4 °C で一晩、その後 Alexa Fluor 標識された二次抗体を含む blocking buffer で室温 2 時間置いた。そして Mowiol (Calbiochem) で封入し、観察した。レンチウイルスを感染させた脳切片は 40 μ m の厚みで作成し、0.5 % Triton X-100 を含む 5 % BSA/TBS を blocking buffer に用いた。BrdU、Calbindin、Calretinin、TH に対する抗体を用いる時は、切片を 0.025 N HCl で 65 °C にて 30 分置き、0.1 M bolic acid (pH8.5) で一度リンスした。Iododeoxyuridine (IdU) の染色においては target retrieval solution (Dako) を用いて抗原の賦活化を行なった。抗原の賦活化は 5-10 分間 105°C でオートクレーブすることによって行なった。EGFR に対する抗体で染色する場合は、tyramide signal amplification kit (Molecular Probes) によってシグナルのエンハンスを行なった。細胞蛍光免疫染色においては、培養した細胞を氷冷した 4 % PFA/PBS で 10 分固定した。その後、細胞は 0.1 % Triton X-100/PBS を用いて 10 分間室温で透過処理行なったのち、3 % BSA/PBS (blocking buffer) で 10 分間室温に置いた。その後、1 次抗体を含む blocking buffer で 4 °C で一晩、その後 Alexa Fluor 標識された二次抗体を含む blocking buffer で室温 2 時間置いた。そして Mowiol (Calbiochem) で封入し、観察した。免疫染色に用いた抗体は以下の通りである。マウスモノクローナル抗体である抗 Ascl1 抗体 (1:500, BD Pharmingen, 556604, RRID:AB_396479)、抗 BrdU 抗体 (1:500, BD Bioscience, 347580)、Calretinin (1:1000, Millipore, MAB1568, RRID:AB_94259)、抗 GFAP 抗体 (1:1000, Millipore, MAB360,

RRID:AB_2109815)、S100 β (1:500, Abcam, ab11179, RRID:AB_297818)、そして抗 Tyrosine Hydroxylase 抗体 (1:500, Millipore, MAB318, RRID:AB_2313764)。ウサギモノクローナル抗体である抗 Ki67 抗体 (1:1000, Abcam, ab16667, RRID:AB_302459)、抗 Notch1 抗体 (1:200, Cell Signaling, 3608, RRID:AB_2153354)、抗 Sox2 抗体 (1:200, Cell Signaling, C70B1, RRID:AB_2194037)、そして抗 S100 β 抗体 (1:5, DAKO, IS504)。ウサギポリクローナル抗体である抗 Calbindin 抗体 (1:500, Chemicon, AB1778)と抗 RFP 抗体 (MBL, PM005, RRID:AB_591279)。ニワトリポリクローナル抗体である抗 GFAP 抗体 (1:500, Abcam, ab4674, RRID:AB_304558) と抗 GFP (1:1000, Abcam, ab13970, RRID:AB_300798)。ラットモノクローナル抗体である抗 BrdU 抗体 (1:200, Abcam, ab6326, RRID:AB_305426)。ヒツジポリクローナル抗体である抗 EGFR 抗体 (1:5000, Upstate, 06-129)。ヤギポリクローナル抗体である抗 Dcx 抗体 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, sc8066, RRID:AB_2088494)。Alexa Fluor 標識された二次抗体と Hoechst 33342 (核染色) は Molecular Probes のものを用いた。全ての蛍光画像は共焦点顕微鏡 (Leica TCS-SP5 または Olympus FV3000) にて取得した。画像は、Fiji software (RRID:SCR_002285) を用いて前処理と解析をおこなった。

組織切片の *in situ* hybridization

凍結組織切片の *in situ* hybridization は Nomura らの報告を参考に行った (Nomura and Osumi, 2004)。Notch3 検出用の Digoxigenin ラベルされた RNA probe としては、ヌクレオチド 4987-6957 (NM_008716.2) に相当する *Notch3* cDNA (ヌクレオチド 906-2115, NM_183029.2) に対する antisense probe を用いた。

FACS

2 ヶ月齢の野生型 (C57BL/6J) マウスより脳室下帯を切り出し、パパイン処理によって、分離、分散させた。パパイン処理は神経系細胞分散液 (Sumitomo Bakelite) を用い、最終的に PBS 中に分散させた。その後、25 % Percoll (SIGMA) を用いてで 4°C で 10 分遠心することでミエリンを除去した。0.2 % BSA/PBS に再分散させたのち、mouse anti-Lex (1:500, Chemicon, MAB4301) 10 分間、wash をしてから Alexa Fluor 標識された二次抗体 (1:500; Molecular Probes, A21042)、A555-complexed EGF (1:200; Molecular Probes) そして

APC-conjugated rat anti-mCD24 (1:100; BioLegend, 101814, RRID:AB_439716) 中で 10 分間静置した。全ての染色と wash は氷冷した 0.2 % BSA/PBS で行なった。FACS AriaIII (BD)で解析及びソートした。デブリスと細胞凝集は前方及び側方散乱を元に適切にゲート外へと除いた。ゲートは過去の報告を参考にした (Daynac et al., 2013)。データは FlowJo software を用いて解析した。

レンチウイルスの準備と定位インジェクション

H1 プロモーターの下流で shRNA を発現するレンチウイルスベクター (CS-Rfa-CG または CS-Rfa-CMV-mRFP1) パッケージングベクターである pCAG-HIV-gp 及び pCMV-VSV-G-RSV-Rev と共に 293FT 細胞に Polyethylenimine 'MAX' (PEI, Polyscience, Inc.; cat. no. 24765)を用いてトランスフェクションした。ウイルスカクテルの準備には、GFP を発現するコントロールウイルスと、RFP を発現する shNotch3 ウイルスを別々に作成し、定位インジェクションの直前に混合した。全てのプラスミドは理研バイオリソースセンターの三好浩之先生よりご供与いただいた。定位インジェクションにおいては、マウスを麻酔により深く眠らせ、1 μ l のウイルス上清をインジェクションした (bregma と脳表面よりそれぞれ、anterior, -0.75 mm; lateral, 1.1 mm; depth, 2 mm の位置)。shRNA の配列は以下の通り:

shNotch3#1 : GTATAGAGACGAGTTCATTTA

shNotch3#2 : GCTTGGGAAATCTGTCTTGCA

shControl#1 (shLuc (Luciferase) #1) : GTGCGTTGCTAGTATCCGC

shControl#2 (shLuc#2) : GATTTCGAGTCGTCTTAATGT

qRT-PCR

FACS によって取得した細胞集団から RNA を抽出し、cDNA を作成した。Quartz-Seq 法のプロトコルに従った (Sasagawa et al., 2013)。取得した cDNA を KAPA SYBR Fast qPCR Kit (Kapa Biosystems)と Roche LightCycler を用いてリアルタイム PCR (Polymerase Chain Reaction) 解析を行った。 β -actin または GAPDH の mRNA 量で標準化した。使用したセンス鎖とアンチセンス鎖のプライマーはそれぞれ以下の通り:

β -actin Forward: AATAGTCATTCCAAGTATCCATGAAA

β -actin Reverse: GCGACCATCCTCCTCTTAG

GAPDH Forward: ATGAATACGGCTACAGCAACAGG

GAPDH Reverse: CTCTTGCTCAGTGTCCCTTGCTG

Notch1 Forward: CATCACAGCCACACCTCAGT

Notch1 Reverse: CTTTCCTGGGGCAGAATGGT

Notch3 Forward: CTCTCAGACTGGTCTG

Notch3 Reverse: GGAGGGAGGGAACAGA

チミジンアナログの投与

分裂細胞を標識する目的で、EdU (Invitrogen, 5 mg/kg-1) を固定の 1 時間前に一回腹腔内投与した。ラベル保持細胞を検出するためには、IdU (Sigma) を 2 週間飲水に添加した (1 % IdU, 1 % sucrose)。マウスは 2 週間の IdU 投与の直後またはその後通常の飲水で 3 週間飼育した後に固定した。新生ニューロンをラベルするためには BrdU (Sigma, 50 mg/kg-1) を一日 2 回 (8 時間以上のインターバル) 5 日間腹腔内投与し、投与から 4 週間後に固定した。EdU の検出には Click-iT EdU Imaging Kit (Invitrogen) を用いた。

Ara-C 投与

Ara-C 投与は過去の報告の通りに行った (Doetsch et al., 1999)。PBS に Ara-C (Sigma, 2%) を溶解し、小型浸透圧ポンプ (Alzet, model 1007D) を用いて 6 日間脳内に注入した。カニューレ (Alzet, brain infusion kit III) を用いて定位的に左側脳室にインプラントした (bregma 及び脳表面よりそれぞれ、anterior, 0 mm; lateral, 1.1 mm; depth, 2 mm の位置)。ポンプ除去直後または 12 時間後に固定した。

統計処理

定量データは少なくとも 3 回以上の結果を用いている。グラフのエラーバーは標準偏差を示す。P 値は Two-tailed Student's t test、paired Student's t-test または Dunnett's test により求め、 $P < 0.05$ を統計的に有意な差として評価した。

第三章 結果

Notch1 は活性化神経幹細胞で高発現している

Notch シグナルが静止期の神経幹細胞をいかにして制御しているのかを明らかにする上で、まず Notch1 の発現パターンに注目した。過去の報告から、Notch1 が成体の神経幹細胞に発現しており、活性化神経幹細胞の数及び分裂能の維持に貢献している一方で、静止期神経幹細胞の維持には貢献していないことが示唆されている (Basak et al., 2012)。しかしながら、その詳細な発現パターン、特に神経幹細胞の中でも、静止期神経幹細胞と活性化神経幹細胞でその発現が異なるか、といった解析は行われていない。Notch1 が活性化神経幹細胞で機能していることから、活性化神経幹細胞でより高発現しているのではないかと考えた。そこでまず、Notch1 の発現パターンを詳細に検討することにした。2 ヶ月齢の野生型マウスから大脳組織切片を作成し、Notch1 及び GFAP、EGFR に対する抗体を用いて免疫組織染色を行なった。静止期神経幹細胞は GFAP 陽性 EGFR 陰性かつ脳室に接している細胞、活性化神経幹細胞は GFAP 陽性 EGFR 陽性かつ脳室に接している細胞、一過的増殖細胞は GFAP 陰性 EGFR 陽性な細胞として定義できる。これらの細胞種における Notch1 陽性な細胞の数を定量したところ、Notch1 陽性細胞は静止期神経幹細胞よりも活性化神経幹細胞でより多くの細胞で発現していることが明らかになった。さらに活性化神経幹細胞よりも増殖能の高い一過的増殖細胞では Notch1 のシグナル強度が高いことが観察され、1 細胞における Notch1 の発言量が多いことを示唆する結果を得た (Fig. 1A, B)。これら結果は 活性化神経幹細胞の維持に Notch1 が必要であるが、静止期神経幹細胞の維持には Notch1 は必要ではなく、さらに Notch1 が増殖能の充進に貢献しているという過去の報告と一致している。

Notch3 は静止期神経幹細胞に領域特異的に発現している

Notch1 発現細胞が活性化神経幹細胞が多かったこと、及び Notch1 の 1 細胞における発現量が増殖能と相関していたことから、静止期神経幹細胞で別の Notch 受容体のアイソフォームが発現し、機能しているのではないかと考えた。そこで次に、別の Notch 受容体のアイソフォームである Notch3 に着目し、その発現パターンを調べた。生後 18 日目のマウ

ス大脳組織切片を用いて *in situ* hybridization によって mRNA の発現パターンを調べたところ、Notch3 が脳室下帯に発現していることを示唆する結果を得た。さらに、その発現は脳室下帯の中でも神経幹細胞が多く存在する lateral および ventral 領域に高く、medial および dorsal 領域にはあまり発現していなかった (Fig1. C-G)。さらに、Notch3 が静止期神経幹細胞に発現しているのかを調べるために、成体脳室下帯を切り出し、FACS によって静止期神経幹細胞と活性化神経幹細胞を分取し、RT-qPCR 法によってその発現を検討することにした。静止期神経幹細胞及び、活性化神経幹細胞は Lex と CD24 に対する抗体及び EGF リコンビナントプロテインを用いて EGFR を標識することで分取できることが報告されている (Daynac et al., 2013)。まず、2 ヶ月齢の野生型マウスから脳室下帯を切り出し、染色をして FACS を用いて分取した。この際少数の細胞から mRNA 量を定量するために、逆転写及び cDNA の増幅に Quartz-Seq 法を用い、取得した増幅後の cDNA を用いて定量 PCR を行った (Sasagawa et al., 2013)。その結果、Notch3 は活性化神経幹細胞と比較して静止期神経幹細胞に高発現していることが示唆された (Fig2)。一方で、Notch1 は活性化神経幹細胞に高発現していた。このことは、免疫染色の結果と一致している。以上の結果より、Notch3 が静止期神経幹細胞に高発現し、その発現は領域特異性があることが示唆された。

Notch3 ノックアウトマウスでは神経幹細胞が領域特異的に減少する

Notch3 が静止期神経幹細胞で高発現していたことから、Notch3 のコンベンショナルノックアウトマウスを用いて、その影響を調べることにした。Notch3 のコンベンショナルノックアウトマウスは致死ではなく、生殖可能で、平滑筋細胞分化と動脈の小さな異常が報告されているが、大きな異常は報告されていない (Domenga et al., 2004; Kitamoto et al., 2005)。Notch3 のノックアウトマウスの成体大脳組織切片を作製し免疫染色を行ったところ、実際に細胞構築上の全体的な異常は観察されなかった (Fig. 3A, B)。しかしながら、GFAP 陽性、Sox2 強陽性かつ S100 β 陰性な神経幹細胞の数を定量したところ、Notch3 ノックアウトマウスでは神経幹細胞が減少していることが示唆された。興味深いことに、脳室下帯を 6 つの領域に分けると、dorsolateral、lateral、ventral 領域においては神経幹細胞が減少していたが、medial、dorsomedial、dorsal 領域においては減少がみられなかった (Fig. 3B, C, F)。EGFR

陽性、GFAP 陰性な一過的増殖細胞及び Dcx 陽性な神経芽細胞も同様に定量したところ、神経幹細胞と同じく dorsolateral、lateral、ventral 領域においては減少していたが、medial、dorsomedial、dorsal 領域においては減少がみられなかった (Fig. 3D, E, G, H)。以上のことから、Notch3 のノックアウトによって神経幹細胞及び分化細胞が減少することが示唆され、Notch3 が神経幹細胞の数と、恒常的な神経新生の維持に貢献している可能性が示唆された。

Notch3 のノックアウトによって静止期神経幹細胞が領域特異的に減少する

Notch3 ノックアウトマウスにおいて神経幹細胞が減少していることが示唆されたが、静止期神経幹細胞が減少したのか、活性化神経幹細胞が減少したのかは不明である。そこでこれを明らかにするために、GFAP 陽性、EGFR 陰性、S100 β 陰性かつ脳室に接している静止期神経幹細胞の数を定量した。その結果、静止期成体神経幹細胞は dorsolateral、lateral、ventral 領域において減少し、medial、dorsomedial、dorsal 領域においては減少が見られなかった (Fig. 4A, B)。一方で、活性化神経幹細胞はどの領域においても減少が見られなかった (Fig. 4C)。以上のことから、Notch3 が領域特異的に静止期神経幹細胞の維持に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

しかしながら、活性化神経幹細胞が減少していないにもかかわらず神経新生が減少していたのはなぜかという疑問が残る。一つの可能性は、Notch3 のノックアウトによって静止期神経幹細胞が異常な活性化を起こすが、正常な分化過程を辿ることができずに一過的増殖細胞を正しく産生することができないという可能性である。2 ヶ月齢のマウスに EdU を腹腔内投与し1時間後に固定することで分裂中の細胞を EdU 陽性細胞として検出することができる。活性化神経幹細胞と一過的増殖細胞で発現している Ascl1 陽性な細胞中の EdU 陽性な細胞の割合を計測した。その結果、Notch3 ノックアウトマウスでは Ascl1 陽性細胞中の EdU 陽性な細胞の割合が減少していることが観察された (Fig5)。この結果は、Notch3 ノックアウトによって異常な活性化を起こした活性化神経幹細胞または一過的増殖細胞は、一過的増殖細胞を産生する分裂能が低いという可能性が示唆された。

Notch3 ノックアウトマウスではラベル保持細胞が減少する

Notch3 の欠損によって静止期神経幹細胞が減少したことをさらに明らかにするために、

チミジンアナログである IdU を用いたラベル保持実験を行った。IdU は S 期を通過した細胞で取り込まれるため、長期的な IdU の投与によって神経幹細胞に IdU を取り込ませたのちに、長い期間の追跡を行うと、静止期に入った細胞だけが、IdU 保持細胞として検出されることになる(Doetsch et al., 1999)。2 ヶ月齢のマウスに対して 2 週間 IdU を飲水に混ぜて経口投与して、IdU 陽性かつ Sox2 強陽性、GFAP 陽性な神経幹細胞数を定量した。ここでは、Notch3 ノックアウトによって静止期神経幹細胞の減少が観察された dorsolateral、lateral、ventral 領域をまとめて lateral domain とした。その結果、Notch3 ノックアウトマウスにおいてその数が少し減少していた (Fig. 6A-C)。このことは神経幹細胞全体が減少している (Fig. 3)という結果と一致している。次に通常の飲水に戻して 3 週間後に IdU をまだ保持している神経幹細胞の数を同様に定量した。その結果、Notch3 ノックアウトマウスにおいて IdU 陽性かつ Sox2 強陽性、GFAP 陽性な IdU 保持神経幹細胞の数が、大きく減少していることが明らかになった (Fig. 6D, E)。したがって、静止期神経幹細胞が Notch3 ノックアウトで減少していることがさらに示唆された。また、IdU 投与直後の時点で既に Notch3 ノックアウトマウスにおいて IdU 陽性かつ Sox2 強陽性、GFAP 陽性な神経幹細胞数が減少しているが、3 週間後の IdU 保持神経幹細胞の数の減少割合の方が大きかった (Cohen's $d = 6.02$ and 2.95)。このことは、Notch3 ノックアウトによって静止期神経幹細胞が活性化神経幹細胞よりも減少していることを示唆しており、マーカーを用いた免疫染色を用いた定量結果と一致している (Fig. 4)。また、IdU 陽性細胞は少なくとも一度 S 期を通過して細胞分裂をしていると考えられることから、Notch3 の欠損が活性化神経幹細胞から静止期へ戻ることを抑制、または静止期神経幹細胞が活性化することを促進した可能性も示唆している。

Notch3 の欠損は損傷修復に機能する神経幹細胞を減少させるが、その活性化率には影響しない

Notch3 欠損による静止期神経幹細胞への影響をさらに明らかにするために、Ara-C 処理実験を行なった。Ara-C は分裂細胞を殺すため、Ara-C を 6 日間注入すると分裂している活性化神経幹細胞、一過的増殖細胞や神経芽細胞は殺され、静止期神経幹細胞は生き残る。Ara-C 処理直後 (0 h) 及び注入中止 12 時間後 (12 h) に固定 1 時間前に EdU を腹腔内投与したのちに固定した。0 h においてほとんど全ての分裂細胞がいなくなっていることが確認

した。そこで、GFAP 陽性、Sox2 陽性かつ脳室に接している神経幹細胞を定量したところ、lateral domain において減少していることが観察された (Fig. 7A-C)。この神経幹細胞は Ara-C 投与後まで生き残っていたことからこの期間中静止期にあった神経幹細胞であると考えられる。このことは、恒常的な状態で静止期神経幹細胞が減少していたこれまでの結果と一致している。

次に Ara-C 処理中止 12 時間後に新規に活性化して EdU 陽性となった GFAP 陽性、Sox2 強陽性かつ脳室に接している神経幹細胞の数を定量した。その結果、Notch3 ノックアウトマウスでは、dorsal と medial 領域に対して、特に lateral domain にてその数が減少していた (Fig. 7D, E)。しかし、神経幹細胞中の EdU 陽性細胞の割合を定量したところ、その割合には差がなかった (Fig. 7F)。したがって、Notch3 の欠損は静止期神経幹細胞を減少させるが、損傷後の神経幹細胞の活性化には影響を及ぼさないことが示唆された。以上の結果より、Notch3 は恒常的な状態において神経幹細胞の静止期と活性化状態の遷移の制御には貢献しているが、損傷修復時には貢献していないと考えられる。

Notch3 は神経幹細胞の細胞分裂を抑制する

所属研究室の先行研究により、成体の静止期神経幹細胞は、胎生期の脳の構築を担っている神経幹細胞から形成されることが示唆されている (Furutachi et al., 2015)。これまでの実験では Notch3 のノックアウトマウスを用いて解析を行っていたため、Notch3 が静止期神経幹細胞の形成に必要なのか、その維持に必要なのかは明らかではなかった。そこで、成体マウス脳室下帯における Notch3 のノックダウンを試みた。Notch3 に対する shRNA を発現するレンチウイルスを作成し、成体マウス側脳室にインジェクションを行った。胎生期神経幹細胞の *in vitro* 初代培養系を用いて、神経幹細胞にレンチウイルスを感染させ、その後定量 PCR 法にてノックダウンの効率を確認したところ、約 6 割に Notch3 の mRNA 発現量が減少していることが確認できた (Fig. 8A, B)。同ウイルスを用いて、インジェクション 6 日後に大脳組織切片を作成し、抗 Ki67 抗体を用いた免疫染色によって、神経幹細胞の増殖活性を調べた。その結果、Notch3 がノックダウンされた神経幹細胞では Ki67 陽性細胞の割合が増加していることが明らかになった (Fig. 8C, D)。したがって、Notch3 が神経幹細胞の分裂を抑制していることが示唆された。

Notch3 が静止期神経幹細胞の細胞分裂を抑制しているのであれば、Notch3 のノックダウンによって神経幹細胞の数が増加することが予想される。そこで、Notch3 に対する shRNA と RFP を発現するレンチウイルスと、Luciferase に対する shRNA と GFP を発現するコントロールレンチウイルスを混合し、成体マウス側脳室にインジェクションを行った。胎生期神経幹細胞の *in vitro* 初代培養系を用いてノックダウンの効率を確認したところ、約 6 割に Notch3 の mRNA 発現量が減少していることが確認できた (Fig. 9A, B)。同ウイルスを用いて、インジェクションの 3 日後と 15 日後にそれぞれ大脳組織切片を作成し、GFP または RFP を発現する神経幹細胞の数を定量した。その結果、レンチウイルスが感染した GFP または RFP 陽性な神経幹細胞の総数に対して、Notch3 に対する shRNA を発現する RFP 陽性な神経幹細胞の割合が、インジェクションの 3 日目に比べて 15 日目において増加した (Fig. 9C, D)。したがって、Notch3 のノックダウンによって、神経幹細胞の数が増加することが示唆された。この結果は、Notch3 が神経幹細胞の増殖を抑制しているという可能性を支持している。

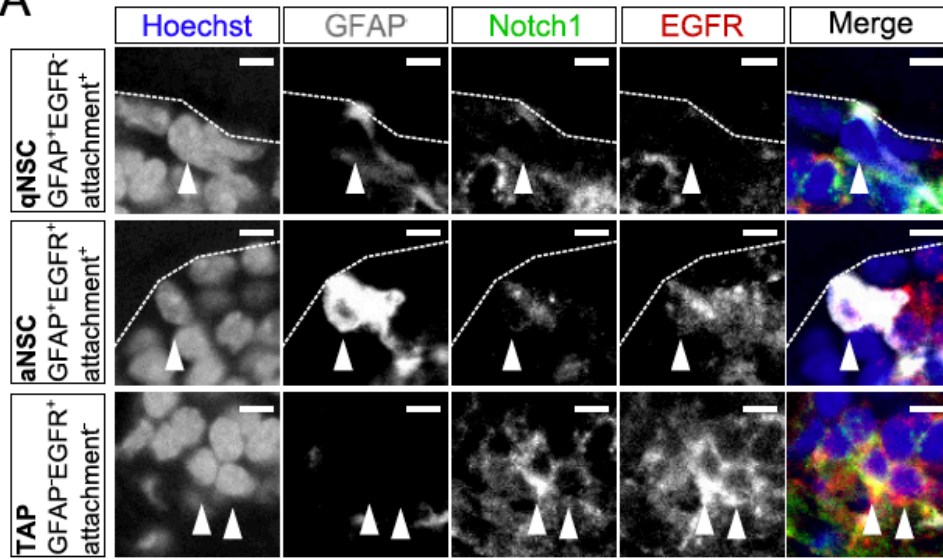
Notch1 が活性化神経幹細胞の増殖を亢進させるという報告に対して、これまでの結果から Notch3 が活性化神経幹細胞よりも静止期神経幹細胞で高発現しており、静止期の維持に貢献していることが示唆されている。そこで、Notch1 と Notch3 が細胞周期制御に関して内在的な機能を有しているのか、それとも他のメカニズムによって異なる機能を果たしているのかを明らかにしようと考えた。そこで、胎生期神経幹細胞の *in vitro* 初代培養系を用いて活性化型 Notch1 と活性化型 Notch3 の過剰発現を行なった。その結果、Notch1 と Notch3 は共に神経幹細胞の細胞周期の進行を抑制することが示唆された (Fig. 10)。このことから、少なくとも今回の実験条件において、Notch1 または Notch3 を高発現させることで、どちらも神経幹細胞の細胞分裂を抑制することができることを示唆している。

Notch3 のノックアウトによってニューロンサブタイプ特異的に新生ニューロンが減少する

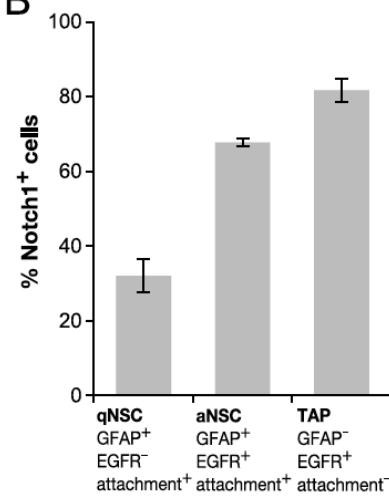
Notch3 のノックアウトによって領域特異的な神経幹細胞の減少が起こったことから、嗅球における新生ニューロンにどのような影響が及ぼされているのかを検討することにした。成体の野生型または Notch3 ノックアウトマウスに対して BrdU を 1 日 2 回、5 日間にわた

って腹腔内投与し、4週間後に嗅球の組織切片を作成した。この切片を用いて 抗 BrdU 抗体とニューロンサブタイプマーカーの抗体で免疫染色を行い、成熟・定着した傍糸球体ニューロンの数を定量した。嗅球の傍糸球体ニューロンのうち、Calbindin (CalB) 陽性細胞は側脳室の lateral 側、Calretinin (CR) 陽性細胞は medial 側、TH 陽性細胞は dorsal 側の脳室下帯神経幹細胞から主に産生されることが報告されている。傍糸球体のサイズが変化していないかを核染色像を元に定量したところ、Notch3 ノックアウトマウスで有意な変化は見られなかった (Fig. 11A, B)。次に、BrdU 陽性な細胞数を定量したところ、約半数に減少しており、Notch3 ノックアウトマウスでは新生ニューロンが減少していることが示唆された (Fig. 11C, D)。次にどのニューロンサブタイプが減少したのかを明らかにするために、CalB 陽性な BrdU 陽性細胞の数を定量したところ、Notch3 ノックアウトマウスにおいて大きく減少していた (Fig. 11C, E)。一方で、CR 陽性な BrdU 陽性細胞は少し減少しており、TH 陽性な BrdU 陽性細胞の数は減少していなかった (Fig 11C, F-H)。以上のことから、Notch3 がサブタイプ特異的なニューロン新生に重要な機能を果たしていることが示唆された。このサブタイプ特異的な Notch3 の機能は、その領域特異的な発現パターンに依ると考えられる。

A



B



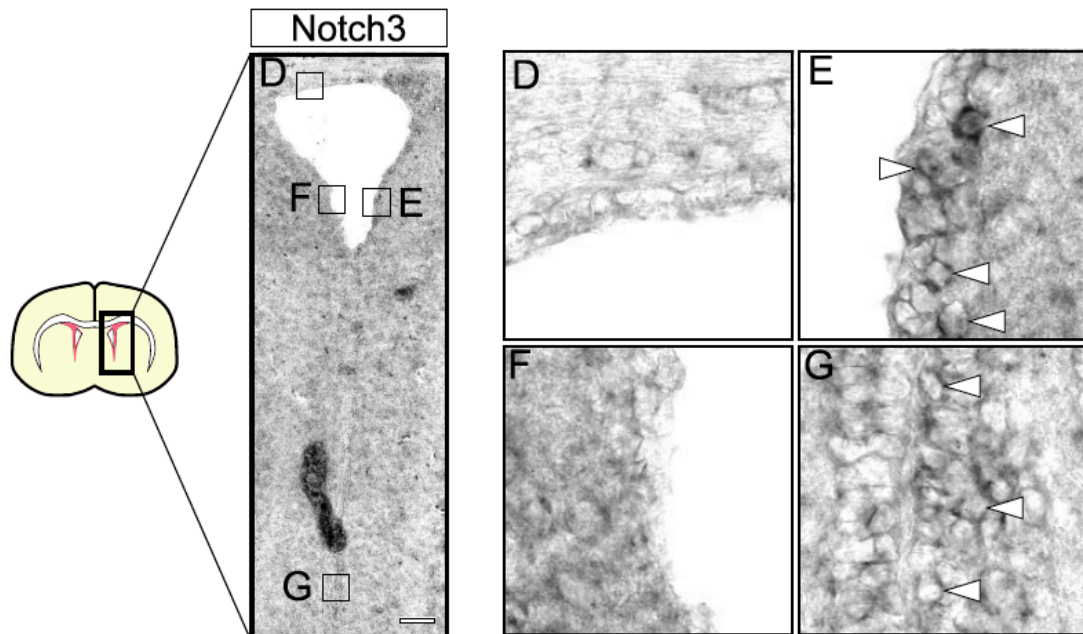
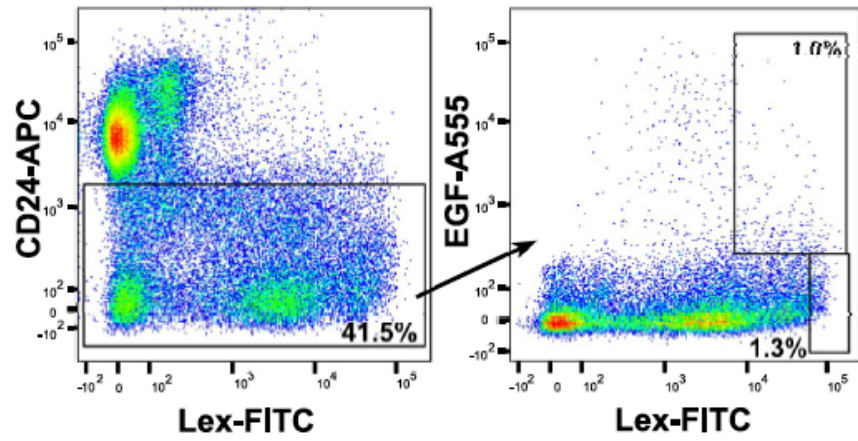


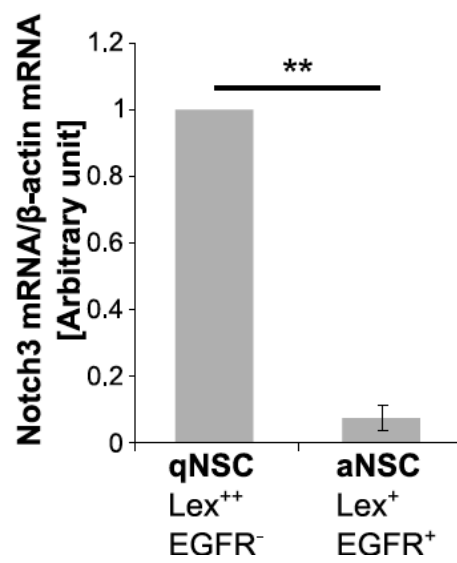
Fig. 1 マウスの生後脳の下帯における Notch1 と Notch3 の発現パターン

A, Notch1 の発現パターンを詳細に調べるために、2 ヶ月齢のマウス大脳組織切片を Notch1 (緑)、GFAP (白)、EGFR (赤) に対する抗体を用いて免疫染色を行なった。鏝はそれぞれ静止期神経幹細胞 (qNSC)、活性化神経幹細胞 (aNSC)、一過的増殖細胞 (TAP) を示している。Notch1 の発現量は静止期神経幹細胞や活性化神経幹細胞よりも一過的増殖細胞で高かった。**B**, それぞれの細胞種における Notch1 陽性細胞率の定量を行なった。静止期神経幹細胞よりも活性化神経幹細胞及び一過的増殖細胞でより高い割合の細胞が Notch1 陽性だった。**C-G**, 生後 18 日目において Notch3 の *in situ* hybridization を行なった。Notch3 は lateral (**E**) と ventral (**G**) 領域で発現していたが、dorsal (**D**) 領域で弱く、medial (**F**) 領域では発現が観察されなかった。鏝は Notch3 を高発現している細胞を示す。核を Hoechst を用いて染色した (青)。エラーバーは標準偏差を表す。n = 3, Scale bar; 10 μ m (**A**), 100 μ m (**C**)

A



B



C

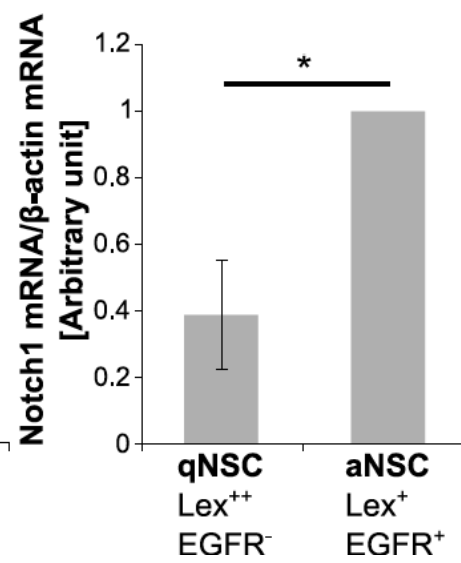


Fig. 2 Notch3 は脳室下帯神経幹細胞において活性化神経幹細胞よりも静止期神経幹細胞でより多く発現している

A, FACS で静止期神経幹細胞及び活性化神経幹細胞を分取する際の代表的な結果を示す。

B, C, FACS で分取した細胞を Quartz-seq の手法を用いて RNA 抽出、逆転写及び増幅を行い cDNA を取得した。その後定量 PCR を行い、Notch3 および Notch1 の mRNA 量を定量した。エラーバーは標準偏差を表す。n = 3 (**B**), 4 (**C**), Paired-Student's t test; *P < 0.05, **P < 0.01.

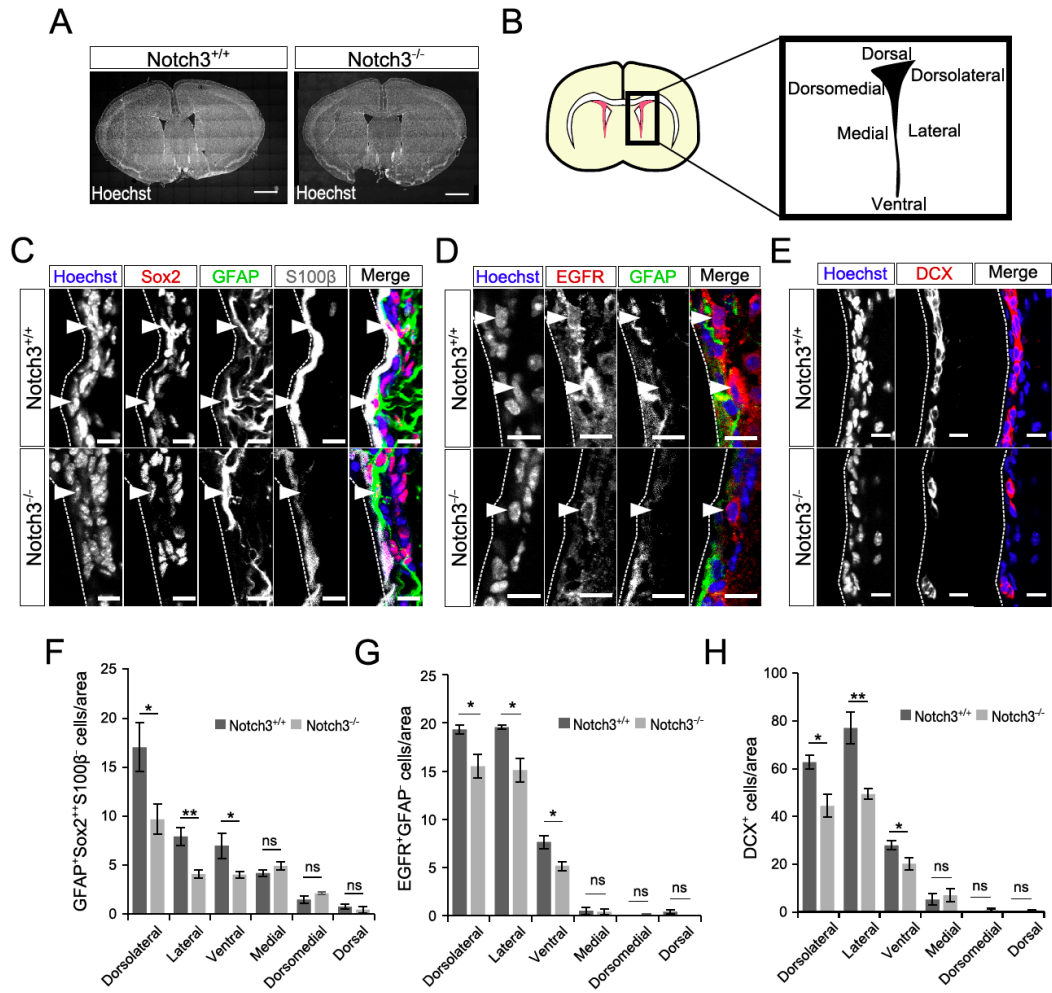
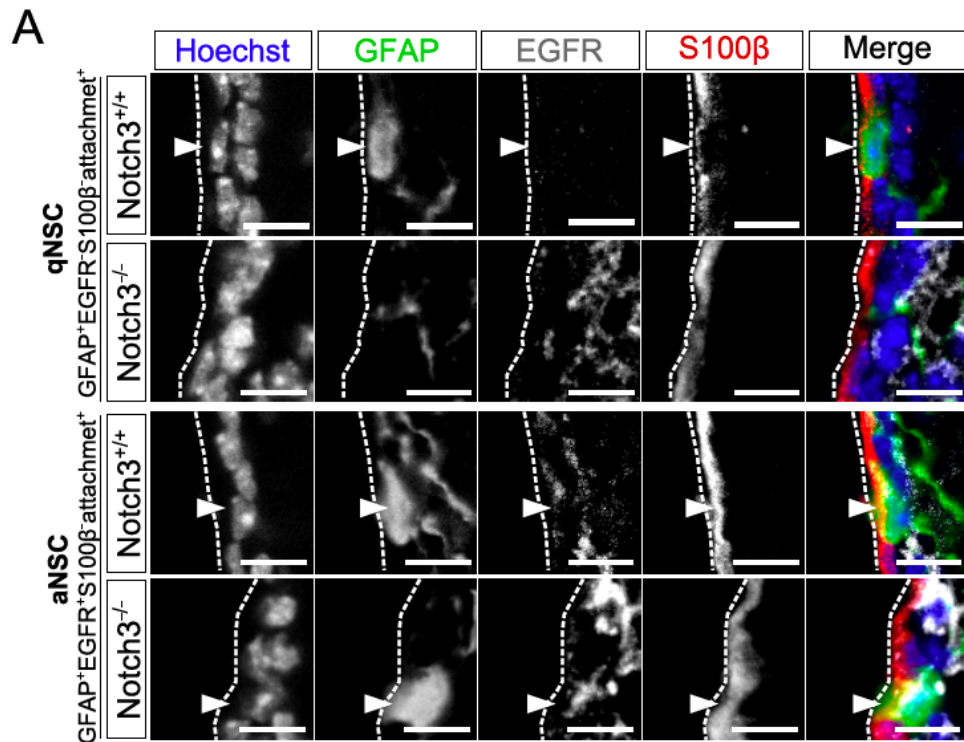
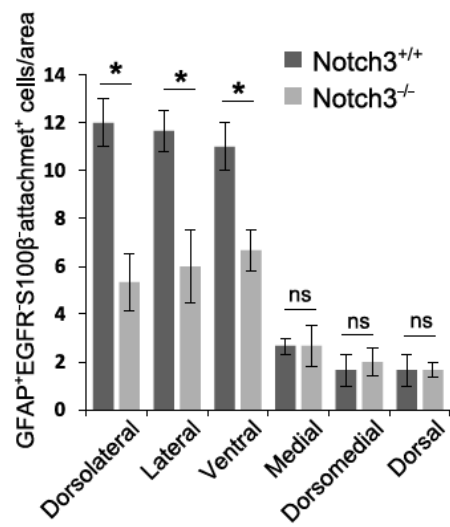


Fig. 3 Notch3 の欠損は領域特異的な神経幹細胞と分化細胞の減少を引き起こす

A, 2ヶ月齢の野生型 (*Notch3*^{+/+}) と Notch3 欠損 (*Notch3*^{-/-}) マウス的大脑組織切片を Hoechst を用いて核染色した。全体的な細胞構成に異常は見られなかった。**B**, 脳室下帯を 6 つの領域に区分けした。**C-E**, 2ヶ月齢の野生型 (*Notch3*^{+/+}) と Notch3 欠損 (*Notch3*^{-/-}) マウス的大脑組織切片をそれぞれ、GFAP (緑), Sox2 (赤) S100β (white) (**C**), GFAP (緑) and EGFR (赤) (**D**) Dcx (赤) (**E**) に対する抗体を用いて免疫染色を行なった。lateral 領域の染色像を示しており、鋳はそれぞれ、GFAP 陽性 Sox2 強陽性かつ S100β 陰性な細胞 (**C**) GFAP 陰性 EGFR 陽性な細胞 (**D**) を示している。**F-H**, それぞれ GFAP 陽性 Sox2 強陽性かつ S100β 陰性な神経幹細胞 (**F**)、GFAP 陰性 EGFR 陽性な一過的増殖細胞 (**G**) Dcx 陽性な未成熟ニューロン (**H**) を定量した。核を Hoechst を用いて染色した (青)。点線は脳室面を示す。エラーバーは標準偏差を表す。Scale bar; 1 mm (**A**) 5μm (**C**) 10 μm (**D, E**), n=3 と 4 (**F**), 3 と 3 (**G**), 4 と 4 (**H**) Two-tailed Student's t test; *P < 0.05, **P < 0.01.



B



C

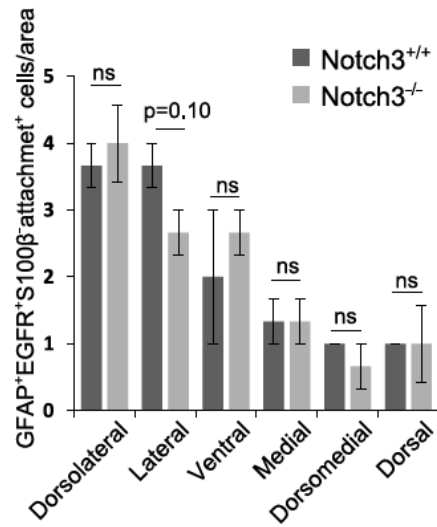


Fig. 4 Notch3 の欠損により、静止期神経幹細胞が領域特異的に減少するが、活性化神経幹細胞は減少しない

A, 2 ヶ月齢の野生型 (*Notch3*^{+/+}) と Notch3 欠損 (*Notch3*^{-/-}) マウス的大脑組織切片を GFAP (緑), EGFR (白) S100β (赤) に対する抗体を用いて免疫染色を行なった。静止期神経幹細胞は脳室に接している(attachment⁺) GFAP 陽性 EGFR 陰性 S100β 陰性細胞、活性化神経幹細胞は脳室に面している GFAP 陽性 EGFR 陽性 S100β 陰性細胞として定義した。鋸はそれぞれの細胞種を示す。 B, 脳室に接している GFAP 陽性 EGFR 陰性 S100β 陰性細胞。 C, 脳室に面している GFAP 陽性 EGFR 陽性 S100β 陰性細胞の定量。核を Hoechst を用いて染色した (青)。点線は脳室面を示す。エラーバーは標準偏差を表す。 Scale bar; 10 μm , n =3, Two-tailed Student's t test; *P < 0.05.

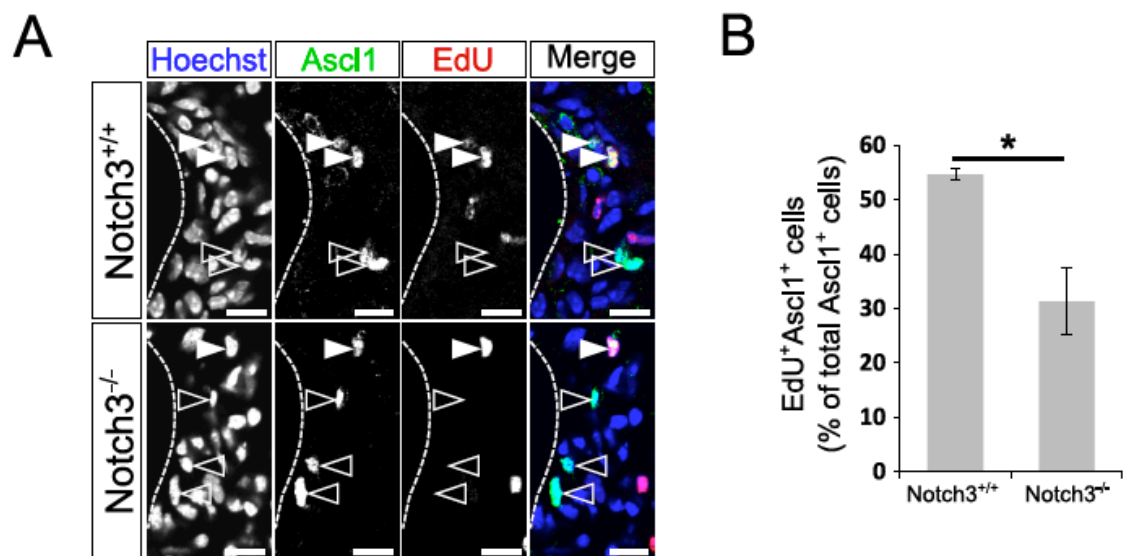
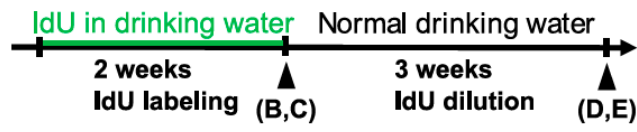


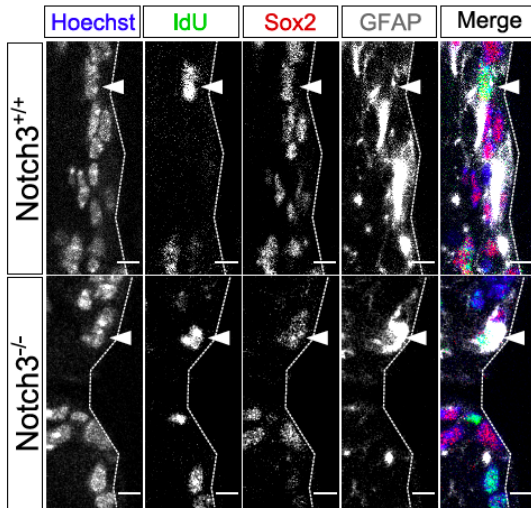
Fig. 5. Notch3 の欠損によって活性化神経幹細胞または一過的増殖細胞の増殖が減少する
2 ヶ月齢の野生型 (*Notch3*^{+/+}) と Notch3 欠損 (*Notch3*^{-/-}) マウスに EdU を腹腔内投与し、1
時間後に固定して大脳組織切片を作成した。

A, 大脳組織切片を Ascl1 (緑), EdU (赤) に対する抗体を用いて免疫染色を行なった。鏝は
Ascl1 陽性 EdU 陽性細胞を、白抜きの鏝は Ascl1 陽性 EdU 陰性細胞を示す。B, Ascl1 陽性
細胞中の EdU 陽性細胞の割合を定量した。核を Hoechst を用いて染色した (青)。エラーバ
ーは標準偏差を表す。n = 3, Scale bar; 10 μ m, Two-tailed Student's t test; *P < 0.05

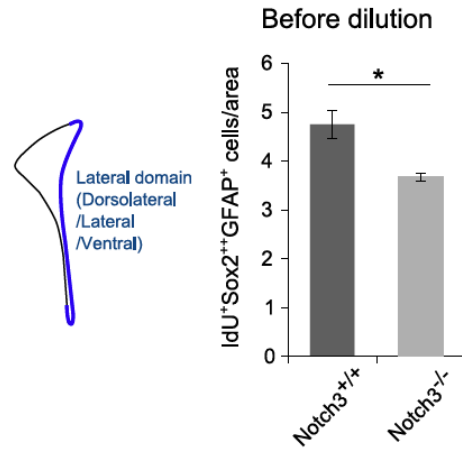
A



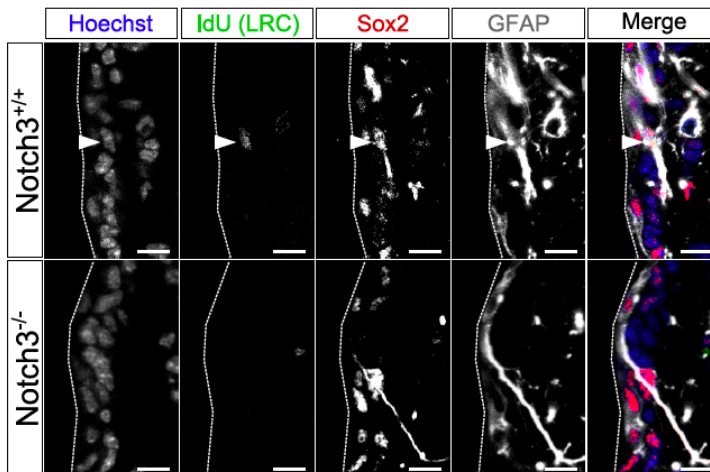
B



C



D



E

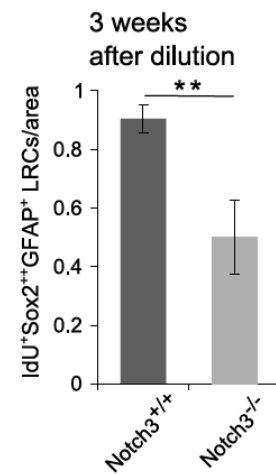


Fig. 6. Notch3 の欠損によってラベル保持細胞が減少する

A, 実験デザイン。IdU を 2 ヶ月齢の野生型 (*Notch3*^{+/+}) と Notch3 欠損 (*Notch3*^{-/-}) マウスの飲水に添加した。2 週間後通常の飲水に戻した。IdU 添加水を 2 週間飲ませた時点、またはその後通常の飲水に戻して 3 週間後に固定した。B, 2 ヶ月齢の野生型 (*Notch3*^{+/+}) と Notch3 欠損 (*Notch3*^{-/-}) マウスを 2 週間 IdU 添加水で飼育したのちに大脳組織切片を作成し、IdU (緑), GFAP (白) Sox2 (赤) に対する抗体を用いて免疫染色を行なった。鏟は IdU 陽性 Sox2 強陽性 GFAP 陽性細胞を示す。C, IdU 陽性 Sox2 強陽性 GFAP 陽性細胞を脳室下帯の dorosolateral、lateral、及び ventral 領域について定量した D, 2 ヶ月齢の野生型 (*Notch3*^{+/+}) と Notch3 欠損 (*Notch3*^{-/-}) マウスを 2 週間 IdU 添加水で飼育したのちに通常の飲水に戻して 3 週間飼育して大脳組織切片を作成し、IdU (緑), GFAP (白) Sox2 (赤) に対する抗体を用いて免疫染色を行なった。鏟は IdU 陽性 Sox2 強陽性 GFAP 陽性細胞なラベル保持細胞を示す。E, IdU 陽性 Sox2 強陽性 GFAP 陽性なラベル保持細胞を脳室下帯の dorosolateral、lateral、及び ventral 領域について定量した。核を Hoechst を用いて染色した (青)。点線は脳室面を示す。エラーバーは標準偏差を表す。Scale bar; 5 μ m (**B**) 10 μ m (**D**), n = 3, Two-tailed Student's t test; *P < 0.05, **P < 0.01.

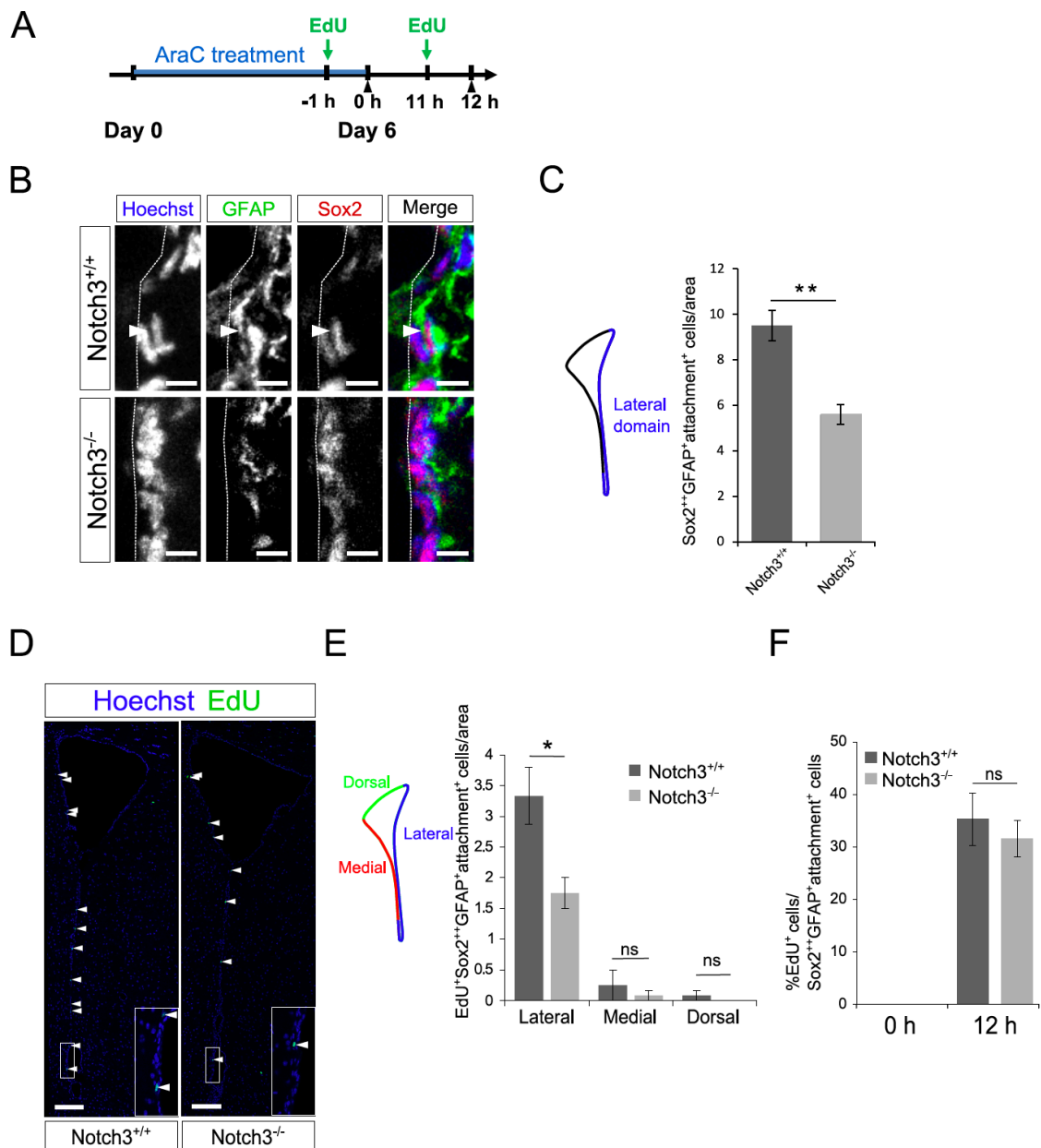
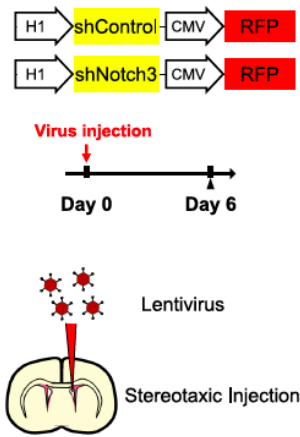


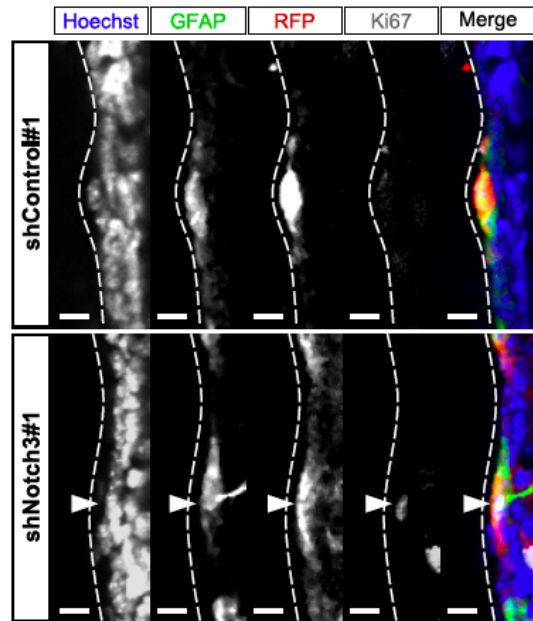
Fig. 7. Notch3 の欠損によって Ara-C 投与後の静止期神経幹細胞が減少する

A, 実験デザイン。ポンプを用いて Ara-C を 2 ヶ月齢の野生型 (*Notch3*^{+/+}) と Notch3 欠損 (*Notch3*^{-/-}) マウスに 6 日間連続注入した。ポンプを取り除いた直後 (0h) または 12 時間後 (12 h) に固定した。EdU は固定 1 時間前に腹腔内投与した。**B**, ポンプを取り除いた 12 時間後に野生型 (*Notch3*^{+/+}) と Notch3 欠損 (*Notch3*^{-/-}) マウスを、固定して大脳組織切片を作成し、GFAP (緑), Sox2 (赤) に対する抗体を用いて免疫染色を行なった。鏟は Sox2 強陽性 GFAP 陽性かつ脳室に接している細胞を示す。**C**, Sox2 強陽性 GFAP 陽性かつ脳室に接している細胞を lateral ドメイン (dorsolateral, lateral, ventral 領域) について定量した。**D**, ポンプを取り除いた 12 時間後の大脳組織切片を EdU 染色した。鏟は EdU 陽性細胞を示す。拡大図は四角で囲んだ領域に拡大図。**E**, EdU 陽性 Sox2 強陽性 GFAP 陽性かつ脳室に接している細胞を定量した。**F**, Sox2 強陽性 GFAP 陽性かつ脳室に接している細胞中の EdU 陽性細胞の割合を定量した。核を Hoechst を用いて染色した (青)。点線は脳室面を示す。エラーバーは標準偏差を表す。Scale bar; 5 μ m (**B**) 100 μ m (**D**), n = 3, Two-tailed Student's t test; *P<0.05. **P<0.01.

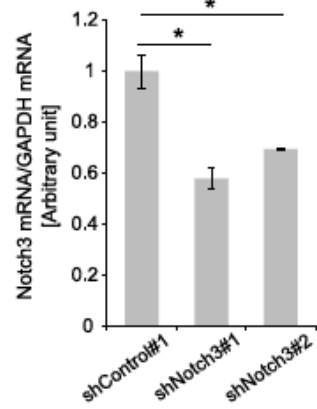
A



C



B



D

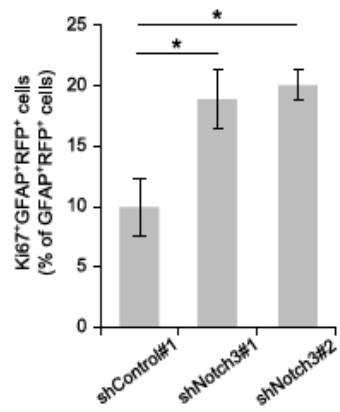


Fig. 8. Notch3 のノックダウンによって神経幹細胞中の分裂細胞の割合が増加する

A, shRNA を発現するレンチウイルスのコンストラクトと実験デザイン。レンチウイルスを脳室にインジェクションし、6 日後に固定した。B, 神経系前駆細胞の初代培養系にレンチウイルスを感染させ、RT-qPCR を行った。luciferase に対する shRNA をコントロールに用いた。C, レンチウイルスをインジェクション 6 日後の脳組織切片を作成し、GFAP (緑) RFP (赤) Ki67 (白) を免疫染色した。D, Ki67 陽性 GFAP 陽性細胞中の RFP 陽性細胞の割合を定量した。核を Hoechst を用いて染色した (青)。点線は脳室面を示す。エラーバーは標準偏差を表す。Scale bar; 10 μ m, n = 3, Dunnett's test; *P<0.05.

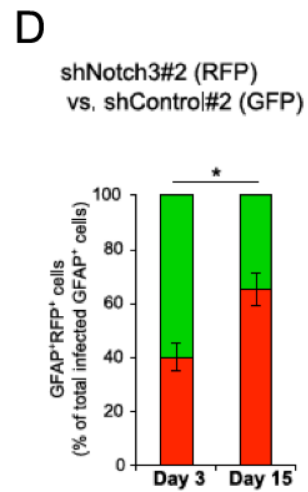
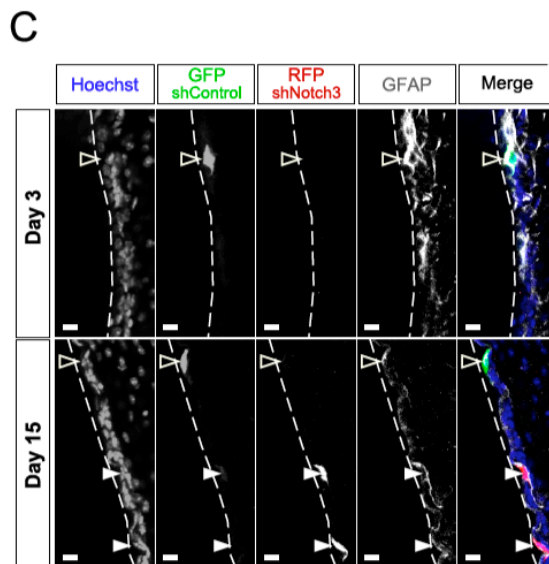
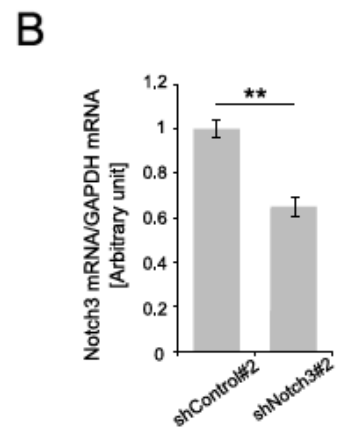
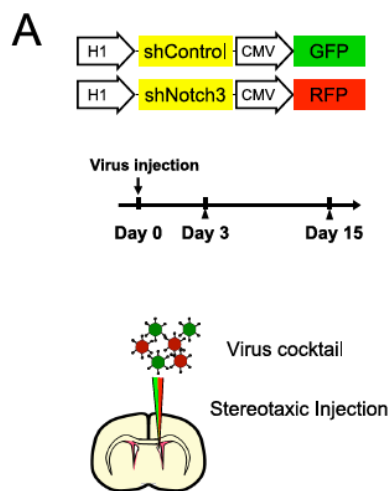


Fig. 9. Notch3 のノックダウンによって神経幹細胞が増加する

A, shRNA を発現するレンチウイルスのコンストラクトと実験デザイン。レンチウイルスカクテル (shNotch3#2-RFP と shControl#2-GFP レンチウイルス) を 2 ヶ月齢のマウスの脳室にインジェクションし、3 日後、15 日後に固定した。**B**, 神経系前駆細胞の初代培養系にレンチウイルスを感染させ、RT-qPCR を行った。luciferase に対する shRNA をコントロールに用いた。**C**, レンチウイルスのインジェクション 3 日後と 15 日後の脳組織切片を作成し、GFP (緑) RFP (赤) GFAP (白) に対する抗体を用いて免疫染色した。白抜きの鍍及び鍍はそれぞれ GFAP 陽性 GFP 陽性 RFP 陰性細胞及び GFAP 陽性 GFP 陰性 RFP 陽性細胞を示す。核を Hoechst を用いて染色した (青)。点線は脳室面を示す。エラーバーは標準偏差を表す。Scale bar; 10 μ m, n = 3, Two-tailed Student's t test; *P<0.05. **P<0.01.

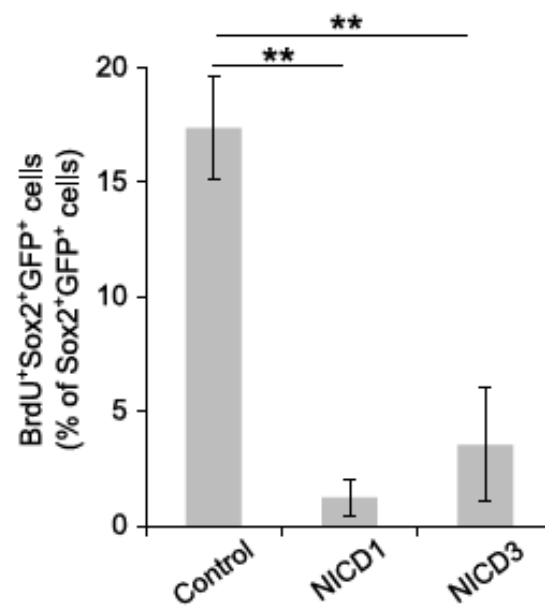
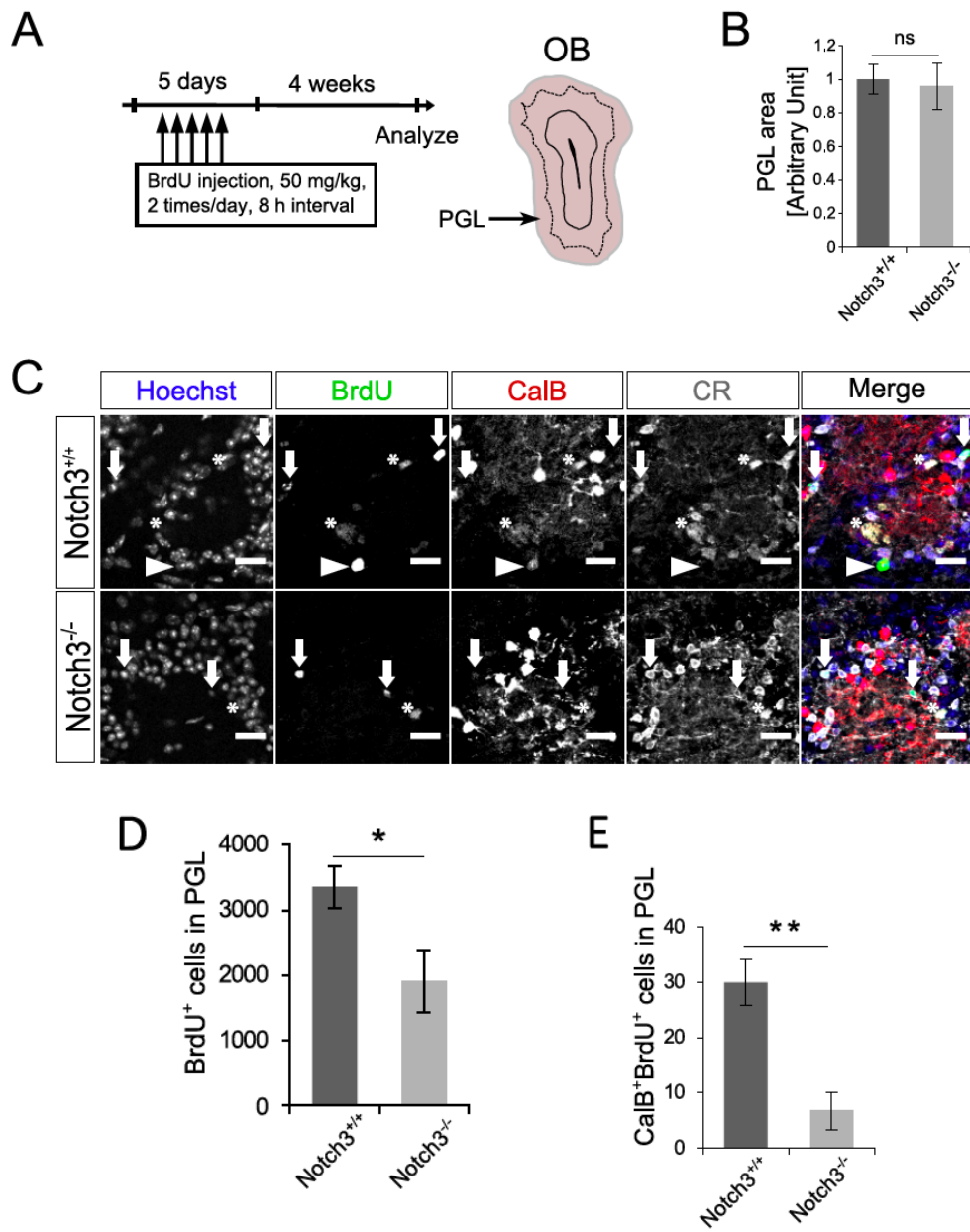


Fig. 10. NICD1、NICD3 の過剰発現によって神経系前駆細胞の細胞分裂が抑制された
 神経系前駆細胞初代培養系に NICD1 または NICD3 を過剰発現した。エラーバーは標準偏
 差を表す。n = 3, Dunnett's test; **P<0.01.



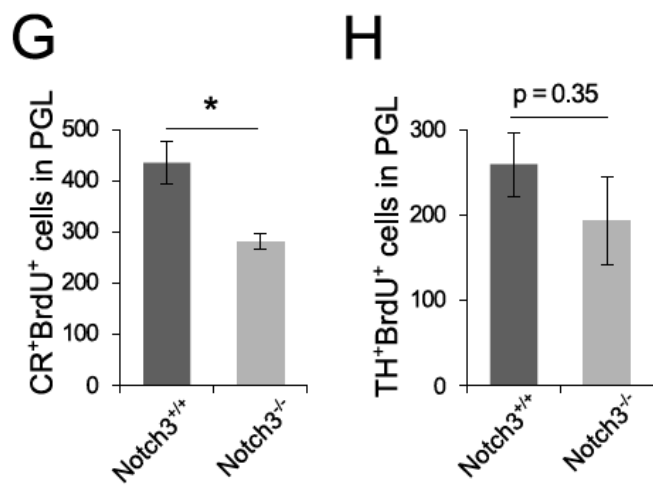
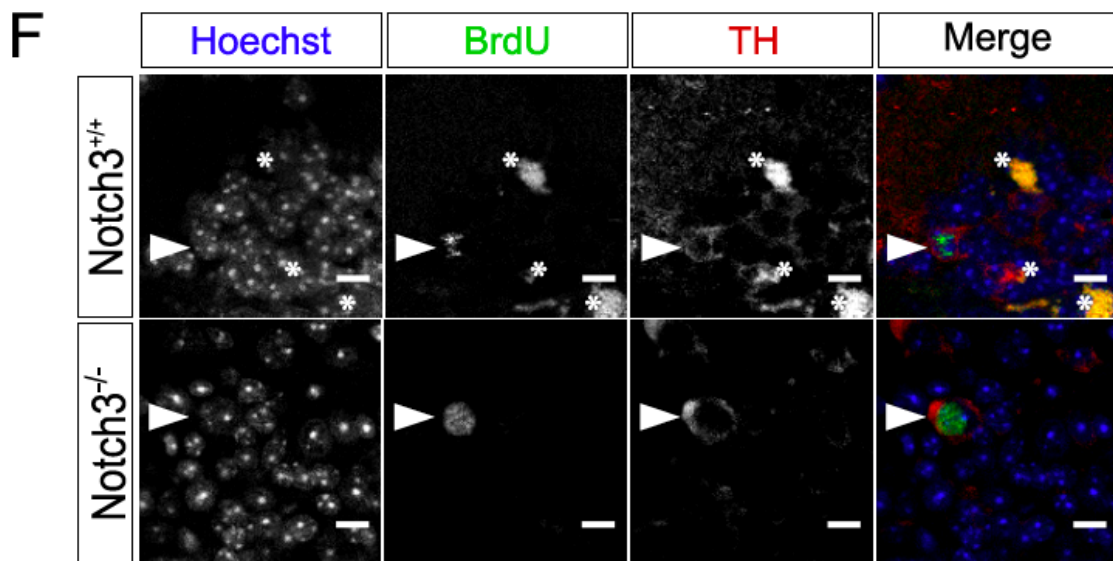


Fig. 11. Notch3 の欠損によってニューロンタイプ特異的な嗅球における新生ニューロンの減少が起こる

A, 実験デザイン。2 ヶ月齢の野生型 (*Notch3*^{+/+}) と Notch3 欠損 (*Notch3*^{-/-}) マウスに BrdU を一日 2 回 8 時間以上のインターバルで 5 日間に渡って腹腔内投与し、最後の投与より 4 週間後に固定して傍糸球体層 (PGL) を解析した。B, PGL のサイズを核染色による面積で比較したところ Notch3 の欠損によって有意な変化はなかった。C, 嗅球を BrdU (緑), CalB (赤) CR (白) に対する抗体を用いて免疫染色を行なった。鏟は CalB 陽性 BrdU 陽性細胞を示す。矢印は CR 陽性 BrdU 陽性細胞を示す。アスタリスクは BrdU の核外シグナルで、非特異的なシグナルを示す。D, PGL における BrdU 陽性細胞を定量した。E, PGL における CalB 陽性 BrdU 陽性細胞を定量した。F, 嗅球の切片に対して BrdU (緑) TH (赤) に対する抗体を用いて抗体染色を行なった。鏟は TH 陽性 BrdU 陽性細胞を示す。アスタリスクは BrdU の核外シグナルで、非特異的なシグナルを示す。G, H, PGL における CR 陽性 BrdU 陽性細胞 (G) TH 陽性 BrdU 陽性細胞 (H) を定量した。核を Hoechst を用いて染色した (青)。エラーバーは標準偏差を表す。n = 4 と 3, Scale bar; 20 μ m (C) 10 μ m (E), Two-tailed Student's t test; *P<0.05. **P<0.01.

第4章 考察

成体哺乳類の脳室下帯では、Notchシグナルが静止期神経幹細胞と活性化神経幹細胞両方の未分化性の維持に貢献している。しかしながら、Notchシグナルはそれに加えて静止期神経幹細胞と活性化神経幹細胞の相反する状態にも貢献する。つまり、静止期神経幹細胞における細胞分裂抑制と、活性化神経幹細胞における細胞分裂促進である。しかし、Notchシグナルがいかんにして静止期神経幹細胞と活性化神経幹細胞において異なる機能を果たしているのかは明らかでなかった。本研究では、Notch3が静止期神経幹細胞に高発現しており、Notch3のノックアウトマウスの解析から、静止期神経幹細胞が減少することを見出した。また、Notch3を成体でノックダウンすることによって、Notch3が神経幹細胞の分裂を抑制していることが示唆された。一方で、Notch1は静止期神経幹細胞よりも活性化神経幹細胞と一過的増殖細胞で高発現しており、Notch1の欠損が神経幹細胞の増殖を減少させたという過去の報告も踏まえると、異なるNotchアイソフォームが静止期神経幹細胞と活性化神経幹細胞で選択的に発現することが、Notchシグナルの異なる機能を少なくとも部分的には説明することが示唆された。

Notch1 と Notch3 のノックアウトの影響の違い

Notch1 と Notch3 のノックアウトまたはノックダウンが異なる影響を神経幹細胞に与えることが示唆されたが、どのようなメカニズムによるものなのであろうか。一つの可能性は、Notch1 と Notch3 が異なる細胞内在的な機能を持っているという可能性である。本研究では、Notch1 と Notch3 の *in vitro* での過剰発現は、どちらも神経幹細胞の細胞分裂を抑制した。したがって、少なくとも Notch3 そして Notch1 もその活性化によって細胞分裂を抑制することができることが示唆された。しかしながら、この結果は生体内において Notch1 と Notch3 が細胞内在的な異なる機能を果たしている可能性を否定するものではない。*in vitro* 過剰発現の実験では、細胞の状態及び活性化 Notch1 や活性化 Notch3 の量を実際の生体内における状態と同等にすることが困難だからである。Notch1 と Notch3 は両方とも RBP-J や Hes/Hey ファミリーのような基本的な Notch の下流のターゲットを活性化することができる。しかし、一方で、序論でも述べたように Notch3 は Notch1 及び Notch2 と

は細胞内ドメインにおける transactivation domain (TAD) が短いことなど配列的な違いがあるという特徴があり (Bellavia et al., 2008)、また Notch1 と Notch3 の細胞内ドメインは異なる DNA 配列指向性があることも報告されている (Ong et al., 2006)。これらのことから Notch3 と Notch1 が神経幹細胞において異なる標的遺伝子の活性化を介して細胞分裂の抑制と促進に貢献している可能性がある。また、他のシグナル経路が Notch シグナルと協調的に機能して幹細胞の静止期を制御している可能性もある。例えば、脳室下帯の神経幹細胞において、増殖の促進に寄与している EGFR や Ascl1 は Notch シグナルと関与していることが報告されている (Andreu-Agulló et al., 2009; Aguirre et al., 2010; Castro et al., 2011; Kim et al., 2011)。したがって、Notch1 と Notch3 が異なる影響を EGFR や Ascl1 に及ぼしているという可能性もあり、非常に興味深い。EGFR に関しては、EGFR のシグナルが Numb による Notch1 のユビキチン化と分解の促進を招くことが報告されている (Aguirre et al., 2010)。Notch1 と Notch3 の Numb による分解のされ方に違いがあるかは知られていないものの、静止期神経幹細胞と活性化神経幹細胞における Notch1 と Notch3 の発現パターンを説明するメカニズムになる可能性もある。さらに、同様に、神経幹細胞の静止状態に関与する cdk インヒビターである p57 や p21、その他シグナル分子 Id1、BMPR、PTEN、FoxO3 や NFIX など Notch 受容体アイソフォームの違いによって異なった影響を受ける可能性がある (Groszer et al., 2006; Renault et al., 2009; Mira et al., 2010; Martynoga et al., 2013; Porlan et al., 2013; Furutachi et al., 2015)。Notch1 と Notch3 の機能的な差異は RBP-J や MAML といった Notch と複合体を形成する分子の違いによって生み出されている可能性もあるが、異なる Notch 受容体アイソフォームが異なるパートナー分子と複合体を形成するかどうかは知られていない。

Notch3 と Notch1 の質的な違いに加えて、発現量とダイナミクスがそれぞれの欠損が引き起こす結果を異なったものにしていく重要な要素である可能性もある。過去の報告では、胎生期の神経系前駆細胞における強い Notch シグナルが増殖を抑制する一方で、弱いシグナルが増殖を促進すること、またオシレーションした Hes1 と持続的な Hes1 の発現が細胞の増殖をそれぞれ維持または抑制することが報告されている (Guentchev and McKay, 2006; Shimojo et al., 2008; Chapouton et al., 2010; Ninov et al., 2012)。それゆえ、Notch シグナルの発現量とダイナミクスを静止期神経幹細胞と活性化神経幹細胞で調べ、それが異なる Notch

受容体によってどう影響されるのかを検討することは面白い可能性である。

Notch3 の脳室下帯領域特異性

さらに、本研究では、細胞種による Notch3 の発現の違いに加えて、領域による Notch3 の発現の違いも発見した。Notch3 は lateral と ventral 領域の神経幹細胞に多く発現しており、その維持に貢献していた。lateral と ventral 領域は dorsal と medial 領域よりも神経幹細胞が多く存在していることから (Fiorelli et al., 2015, 及び Fig. 3)、Notch3 の発現が高いことが lateral 及び ventral 領域で神経幹細胞が多いという状況を生み出しているのかもしれない。また、今回 Notch3 の発現が見られた領域は、過去の報告と照らし合わせると、Gsx2 や胎生期の Ascl1 が発現している領域に近いようではあるが、これまでの既知の領域マーカーとなる遺伝子発現と正確に比較することはできていない。Notch3 が領域特異的に神経幹細胞の制御に貢献していることに加えて、Notch3 が脳室下帯の領域化に貢献しているという可能性もある。そのため、Notch3 が過去の報告と比較してどの領域に発現しているのかを調べることによって、また Notch3 ノックアウトマウスにおいて他の領域マーカーの発現を調べることによって、Notch3 が領域特異的な神経幹細胞制御のみに貢献しているのか、脳室下帯の領域化そのものにも貢献しているのかに関する知見が得られると考えられるため、今後の研究課題として興味深い。また、今回は背腹軸、左右軸に注目していたが、脳室下帯及びそこから産み出されるニューロンサブタイプは前後軸でも異なっていることが知られている。そのため、Notch3 の領域特異性が、前後軸で観察した場合にはどう異なっているのかについても検討したい。

他の Notch 受容体アイソフォームである Notch2 と Notch4 については、Notch4 は神経系において発現が見られていないが、Notch2 は発現が報告されている (Basak et al., 2012)。したがって、Notch2 も Notch1 及び Notch3 に加えて、神経幹細胞及びその分化細胞において機能している可能性がある。本研究においては、Notch2 の発現パターンについては検討できておらず、Notch2 が静止期神経幹細胞や活性化神経幹細胞でどのように発現し、機能しているか、脳室下帯の領域間での発現や機能的差異があるのかについては、まだ知見が得られていない。例えば、Notch3 の静止期神経幹細胞の維持への貢献があまり見られなかった dorsal や medial 領域において Notch2 が機能している可能性もあり、Notch1、Notch2、

Notch3 の使い分けが脳室下帯でどのように行われているかについての詳細な解析は今後の研究課題である。

また、本研究でも最も影響の大きかった脳室下帯の lateral や ventral 領域であっても Notch3 の欠損による静止期神経幹細胞の減少は部分的であった。そのため、Notch1 と Notch3 ではノックアウトの効果が異なっていることを示唆する結果を得ているが、Notch の共通のエフェクターである RBP-J の欠損時では静止期神経幹細胞が大きく減少することから考えて、Notch アイソフォームはある程度の冗長性を持って静止期神経幹細胞の維持に貢献していると考えられる。つまり、今回 Notch1 は静止期神経幹細胞よりも活性化神経幹細胞で高発現をしているという結果を得ているが、静止期神経幹細胞においてもある程度発現し、その維持に貢献している可能性がある。それゆえ、Notch1、Notch2、Notch3 の使い分けとともに、どの程度これらのアイソフォームが冗長性を持って神経幹細胞及びニューロン新生の恒常性を維持しているのかについても今後の検討課題である。

Notch3 と Notch1 がそれぞれ静止期神経幹細胞と活性化神経幹細胞で機能し、その維持に貢献していることはゼブラフィッシュにおいて報告されている (Alunni et al., 2013)。そのため、Notch3 が静止期神経幹細胞の維持に貢献していること、及び Notch1 との使い分けがあることは進化的に保存された現象であると考えられる。しかしながら、ゼブラフィッシュにおいては長期的なノックアウトの影響や、障害時における Notch3 欠損の影響については明らかでなく、本研究にて初めて明らかになった。Notch3 の機能がゼブラフィッシュとマウスでどの程度共通しているのかは興味深い。また一方で、Notch3 の機能に領域特異性があるのかについてはゼブラフィッシュで明らかでなく、Notch 受容体アイソフォームの領域特異的な使い分けが進化的に保存されているのかも興味深い。

ニューロンサブタイプ特異的な影響

神経幹細胞は dorsal、medial、lateral のすべての脳室下帯の領域に存在している。しかしながら、産生されるニューロンのサブタイプは領域に依存している。本研究では、Notch3 の欠損が CalB 陽性細胞を大きく減少させる一方で CR 陽性細胞の減少は僅かであり、TH 陽性細胞は有意には減少しなかった (Fig. 11F, G, H)。この結果は、神経幹細胞の減少が、脳室下帯の lateral 側では見られているが、medial 側と dorsal 側では見られていないことを

考えると、CalB 陽性細胞は lateral から、CR 陽性細胞は medial から、TH 陽性細胞は dorsal の脳室下帯から主に産生されるという過去の報告と一致している (Merkle et al., 2007; Young et al., 2007; Fernández et al., 2011)。しかしながら、このニューロンサブタイプの脳室下帯の由来領域の特異性はサブタイプごとに異なる。CalB 陽性細胞はほとんどが lateral 領域に由来しているが、CR 陽性細胞は多くが medial 領域に由来するがそれ以外の領域からも産生されている。そのため、medial 領域の神経幹細胞が減少していなかったのにも関わらず、CR 陽性細胞が減少していたのだと考えられる。さらに、今回の結果は、異なる Notch アイソフォームが嗅球の異なるニューロンサブタイプの決定そのものに貢献しているという可能性もある。また、脳室下帯由来の新生ニューロンが線条体や大脳新皮質に移動しているという報告もある (Dayer et al., 2005; Ernst et al., 2014)。従って、異なる Notch アイソフォームが嗅球以外の他の脳領域へのニューロンサブタイプの産生を制御しているということも面白い可能性である。今後、領域特異的に Notch 受容体アイソフォームの過剰発現やノックダウンを行い、その分化運命を解析することによって、この可能性を検証できると考えている。

Notch3 ノックアウトマウスにおけるニューロン新生の減少

本研究では、Notch3 のノックアウトマウスにおいて、静止期神経幹細胞の数と神経新生全体の減少が見られた一方で、活性化神経幹細胞は有意な減少が見られなかった (Fig. 3A, B, C, Fig. 7)。静止期神経幹細胞が活性化神経幹細胞を経てニューロンへと分化していくが、静止期神経幹細胞と未成熟ニューロンや嗅球の新生ニューロンが減少しているにも関わらず、活性化神経幹細胞の減少が見られなかったのはなぜであろうか。一つの可能性は、Notch3 ノックアウトマウスでは静止期神経幹細胞が異常な活性化を起こすが、少ない数の一過性増殖細胞しか産生できていないという可能性である。本研究では実際に、Notch3 ノックアウトマウスにおいて一過性増殖細胞が減少しているという結果も得ている (Fig. 2G)。さらに、Ascl1 陽性細胞中における分裂細胞の割合が Notch3 ノックアウトマウスでは減少していることを見出した (Fig. 3D, E)。Ascl1 は活性化神経幹細胞の一部と一過性増殖細胞で陽性になることが知られており、従って、Notch3 ノックアウトマウスにおいて異常に活性化した神経幹細胞または一過性増殖細胞は一過性増殖細胞を産生する増殖能が低

いことが示唆されている。そのため、ニューロン新生の減少の一部は活性化神経幹細胞または一過性増殖細胞の増殖が減少していることに依ると考えられる。

Notch 受容体アイソフォームの使い分けにおける Notch リガンドの貢献

序論で述べたように、Notch 受容体アイソフォームの違いだけではなく、Notch リガンドも Dll1、Dll3、Dll4 及び Jagged1、Jagged2 といった複数のリガンドが存在する。神経幹細胞に対しては Dll1 と Jagged1 が Notch 受容体の活性化を介して静止期神経幹細胞の維持に貢献していることが報告されている。しかしながら、異なるリガンドが静止期神経幹細胞の制御にどういった差異を持っているのかは明らかでない。リガンドの使い分けに関しては T 細胞の分化過程において、Dll1 が Notch2 を、Dll4 が Notch1 を活性化しているという報告 (Besseyrias et al., 2007) などもあるが、Dll3 を除きどのリガンドもどの Notch 受容体アイソフォームであっても活性化することができることが知られており、組み合わせの優劣があるとは考えられているものの十分な知見は得られていない。しかしながら、Delta-like ファミリーと Jagged ファミリーでは Notch の活性化の優位性に差異が生まれる場合があることはよく知られている。序論でも述べたように Fringe は Notch 受容体の糖鎖修飾を変化させることでリガンドとの結合を変化させる。Fringe が作用することで Notch 受容体は Delta-like ファミリーとの結合を増強され、Jagged ファミリーとの結合は阻害される。そのため、神経幹細胞において Fringe が発現し、Dll1 と Jagged1 による活性化に差異が生まれることが静止期神経幹細胞の制御にどのように影響しているのかは興味深い。さらに、Dll1 は神経幹細胞のリネージに発現して機能している一方で、Jagged1 は血管内皮細胞に発現して機能している。このことから、Dll1 と Jagged1 が異なる文脈で静止期神経幹細胞の制御を担っていると考えられる。今後 Dll1 と Jagged1 が静止期神経幹細胞と活性化神経幹細胞の Notch シグナルの活性化にどのように貢献しているのか、また脳室下帯の領域によって差があるのかを細胞レベル、細胞コンパートメントレベルで観察することで明らかにしていくことができるととても面白い。

結言

哺乳類の脳内では神経幹細胞は、一生にわたってニューロンを産生する。神経幹細胞は通常静止状態にあり、長期的に維持されているが、適切なタイミングで活性化されて分裂・分化する。これまで神経幹細胞において Notch シグナルが静止期の維持と細胞分裂の促進という、相反する二つの機能を果たしていることがわかっていたが、いかにしてそれを達成しているのかは不明であった。本研究により、脳室下帯において Notch3 が静止期神経幹細胞に高発現し、静止期神経幹細胞の適切な数を維持及び特定の嗅球ニューロンの産生に貢献していることが示唆された。今後、異なる Notch アイソフォームの発現・活性化がいかにして制御されているかを明らかにすることで、長期的な神経新生の維持と領域特的な神経幹細胞の制御がいかにして制御されているのかという基礎的な神経幹細胞の側面をより明らかにできると考えられる。

参考文献

- Ables JL, Breunig JJ, Eisch AJ, Rakic P (2011) Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain. *Nat Rev Neurosci* 12:269–283.
- Aguirre A, Rubio ME, Gallo V (2010) Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature* 467:323–327.
- Alunni A, Krecsmarik M, Bosco A, Galant S, Pan L, Moens CB, Bally-Cuif L (2013) Notch3 signaling gates cell cycle entry and limits neural stem cell amplification in the adult pallium. *Development* 140:3335–3347.
- Andreu-Agulló C, Morante-Redolat JM, Delgado AC, Fariñas I (2009) Vascular niche factor PEDF modulates Notch-dependent stemness in the adult subependymal zone. *Nat Neurosci* 12:1514–1523.
- Androutsellis-Theotokis A, Leker RR, Soldner F, Hoepfner DJ, Ravin R, Poser SW, Rueger MA, Bae S-K, Kittappa R, McKay RDG (2006) Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. *Nature* 442:823–826.
- Basak O, Giachino C, Fiorini E, Macdonald HR, Taylor V (2012) Neurogenic subventricular zone stem/progenitor cells are Notch1-dependent in their active but not quiescent state. *J Neurosci* 32:5654–5666.
- Beckervordersandforth R, Tripathi P (2010) In vivo fate mapping and expression analysis reveals molecular hallmarks of prospectively isolated adult neural stem cells. *Cell Stem Cell*.
- Bellavia D, Checquolo S, Campese AF, Felli MP, Gulino A, Screpanti I (2008) Notch3: from subtle structural differences to functional diversity. *Oncogene* 27:5092–5098.
- Besseyrias V, Fiorini E, Strobl LJ, Zimmer-Strobl U, Dumortier A, Koch U, Arcangeli M-L, Ezine S, Macdonald HR, Radtke F (2007) Hierarchy of Notch-Delta interactions promoting T cell lineage commitment and maturation. *J Exp Med* 204:331–343.
- Brückner K, Perez L, Clausen H, Cohen S (2000) Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* 406:411–415.
- Calzolari F, Michel J, Baumgart EV, Theis F, Götz M, Ninkovic J (2015) Fast clonal expansion and limited neural stem cell self-renewal in the adult subependymal zone. *Nat Neurosci* 18:490–

492.

- Capela A, Temple S (2002) LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35:865–875.
- Castro DS, Martynoga B, Parras C, Ramesh V, Pacary E, Johnston C, Drechsel D, Lebel-Potter M, Garcia LG, Hunt C, Dolle D, Bithell A, Ettwiller L, Buckley N, Guillemot F (2011) A novel function of the proneural factor *Ascl1* in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets. *Genes Dev* 25:930–945.
- Chaker Z, Codega P, Doetsch F (2016) A mosaic world: puzzles revealed by adult neural stem cell heterogeneity. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 5:640–658.
- Chapouton P, Skupien P, Hesl B, Coolen M, Moore JC, Madelaine R, Kremmer E, Faus-Kessler T, Blader P, Lawson ND, Bally-Cuif L (2010) Notch activity levels control the balance between quiescence and recruitment of adult neural stem cells. *J Neurosci* 30:7961–7974.
- Codega P, Silva-Vargas V, Paul A, Maldonado-Soto AR, DeLeo AM, Pastrana E, Doetsch F (2014) Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche. *Neuron* 82:545–559.
- Dayer AG, Cleaver KM, Abouantoun T, Cameron HA (2005) New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J Cell Biol* 168:415–427.
- Daynac M, Chicheportiche A, Pineda JR, Gauthier LR, Boussin FD, Mouthon MA (2013) Quiescent neural stem cells exit dormancy upon alteration of GABAAR signaling following radiation damage. *Stem Cell Res* 11:516–528.
- Doetsch F, Caillé I, Lim D a, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703–716.
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2002) EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36:1021–1034.
- Domenga V, Fardoux P, Lacombe P, Monet M, Maciazek J, Krebs LT, Klonjowski B, Berrou E, Mericskay M, Li Z, Tournier-Lasserre E, Gridley T, Joutel A (2004) Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev* 18:2730–2735.

- Ehret F, Vogler S, Pojar S, Elliott D a., Bradke F, Steiner B, Kempermann G (2014) Mouse model of CADASIL reveals novel insights into Notch3 function in adult hippocampal neurogenesis. *Neurobiol Dis* 75:131–141.
- Ernst A, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Druid H, Frisén J (2014) Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 156:1072–1083.
- Fernández ME, Croce S, Boutin C, Cremer H, Raineteau O (2011) Targeted electroporation of defined lateral ventricular walls: a novel and rapid method to study fate specification during postnatal forebrain neurogenesis. *Neural Dev* 6:13.
- Fiorelli R, Azim K, Fischer B, Raineteau O (2015) Adding a spatial dimension to postnatal ventricular-subventricular zone neurogenesis. *Development* 142:2109–2120.
- Fischer J, Beckervordersandforth R, Tripathi P, Steiner-Mezzadri A, Ninkovic J, Götz M (2011) Prospective isolation of adult neural stem cells from the mouse subependymal zone. *Nat Protoc* 6:1981–1989.
- Fuentealba LC, Rompani SB, Parraguez JI, Obernier K, Romero R, Cepko CL, Alvarez-Buylla A (2015) Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell* 161:1644–1655.
- Furutachi S, Miya H, Watanabe T, Kawai H, Yamasaki N, Harada Y, Imayoshi I, Nelson M, Nakayama KI, Hirabayashi Y, Gotoh Y (2015) Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nat Neurosci* 18:657–665.
- Groszer M, Erickson R, Scripture-Adams DD, Dougherty JD, Le Belle J, Zack JA, Geschwind DH, Liu X, Kornblum HI, Wu H (2006) PTEN negatively regulates neural stem cell self-renewal by modulating G0-G1 cell cycle entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:111–116.
- Guentchev M, McKay RDG (2006) Notch controls proliferation and differentiation of stem cells in a dose-dependent manner. *Eur J Neurosci* 23:2289–2296.
- Ihrie RA, Shah JK, Harwell CC, Levine JH, Guinto CD, Lezameta M, Kriegstein AR, Alvarez-Buylla A (2011) Persistent Sonic Hedgehog Signaling in Adult Brain Determines Neural Stem Cell Positional Identity. *Neuron* 71:250–262.
- Imayoshi I, Sakamoto M, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R (2010) Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci*

30:3489–3498.

Irvin DK, Nakano I, Paucar A, Kornblum HI (2004) Patterns of Jagged1, Jagged2, Delta-like 1 and Delta-like 3 expression during late embryonic and postnatal brain development suggest multiple functional roles in progenitors and differentiated cells. *J Neurosci Res* 75:330–343.

Irvine KD, Wieschaus E (1994) fringe, a Boundary-specific signaling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during *Drosophila* wing development. *Cell* 79:595–606.

Kakuda S, Haltiwanger RS (2017) Deciphering the Fringe-Mediated Notch Code: Identification of Activating and Inhibiting Sites Allowing Discrimination between Ligands. *Dev Cell* 40:193–201.

Kawaguchi D, Furutachi S, Kawai H, Hozumi K, Gotoh Y (2013) Dll1 maintains quiescence of adult neural stem cells and segregates asymmetrically during mitosis. *Nat Commun* 4:1880.

Kim EJ, Ables JL, Dickel LK, Eisch AJ, Johnson JE (2011) Ascl1 (Mash1) defines cells with long-term neurogenic potential in subgranular and subventricular zones in adult mouse brain. *PLoS One* 6:e18472.

Kitamoto T, Hanaoka K (2010) Notch3 null mutation in mice causes muscle hyperplasia by repetitive muscle regeneration. *Stem Cells* 28:2205–2216.

Kitamoto T, Takahashi K, Takimoto H, Tomizuka K, Hayasaka M, Tabira T, Hanaoka K (2005) Functional redundancy of the Notch gene family during mouse embryogenesis: Analysis of Notch gene expression in Notch3-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 331:1154–1162.

Kriegstein AR, Alvarez-Buylla A (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32:149–184.

Lafkas D, Rodilla V, Huyghe M, Mourao L, Kiaris H, Fre S (2013) Notch3 marks clonogenic mammary luminal progenitor cells in vivo. *J Cell Biol* 203:47–56.

Lim D a., Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2000) Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28:713–726.

- Martynoga B, Mateo JL, Zhou B, Andersen J, Achimastou A, Urbán N, van den Berg D, Georgopoulou D, Hadjur S, Wittbrodt J, Ettwiller L, Piper M, Gronostajski RM, Guillemot F (2013) Epigenomic enhancer annotation reveals a key role for NFIX in neural stem cell quiescence. *Genes Dev* 27:1769–1786.
- Meloty-Kapella L, Shergill B, Kuon J, Botvinick E, Weinmaster G (2012) Notch ligand endocytosis generates mechanical pulling force dependent on dynamin, epsins, and actin. *Dev Cell* 22:1299–1312.
- Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A (2007) Mosaic Organization of Neural Stem Cells in the Adult Brain. *Science* (80-) 317:381–384.
- Mira H, Andreu Z, Suh H, Chichung Lie D, Jessberger S, Consiglio A, Emeterio JS, Hortigüela R, Marqués-Torrejón MÁ, Nakashima K, Colak D, Götz M, Fariñas I, Gage FH (2010) Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 7:78–89.
- Moloney DJ, Panin VM, Johnston SH, Chen J, Shao L, Wilson R, Wang Y, Stanley P, Irvine KD, Haltiwanger RS, Vogt TF (2000) Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* 406:369–375.
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D (1994) Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13:1071–1082.
- Nam H, Benezra R (2009) High levels of Id1 expression define B1 type adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 5:515–526.
- Ninov N, Borius M, Stainier DYR (2012) Different levels of Notch signaling regulate quiescence, renewal and differentiation in pancreatic endocrine progenitors. *Development* 139:1557–1567.
- Nyfeler Y, Kirch RD, Mantei N, Leone DP, Radtke F, Suter U, Taylor V (2005) Jagged1 signals in the postnatal subventricular zone are required for neural stem cell self-renewal. *EMBO J* 24:3504–3515.
- Okajima T, Irvine KD (2002) Regulation of Notch signaling by O-linked fucose. *Cell* 111:893–904.
- Ong CT, Cheng HT, Chang LW, Ohtsuka T, Kageyama R, Stormo GD, Kopan R (2006) Target

- selectivity of vertebrate notch proteins: Collaboration between discrete domains and CSL-binding site architecture determines activation probability. *J Biol Chem* 281:5106–5119.
- Ottone C, Krusche B, Whitby A, Clements M, Quadrato G, Pitulescu ME, Adams RH, Parrinello S (2014) Direct cell-cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells. *Nat Cell Biol* 16:1045–1056.
- Pastrana E, Cheng L-C, Doetsch F (2009) Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:6387–6392.
- Paul A, Chaker Z, Doetsch F (2017) Hypothalamic regulation of regionally distinct adult neural stem cells and neurogenesis. *Science* 356:1383–1386.
- Pierfelice T, Alberi L, Gaiano N (2011) Notch in the vertebrate nervous system: an old dog with new tricks. *Neuron* 69:840–855.
- Porlan E, Morante-Redolat JM, Marques-Torrejon MA, Andreu-Agullo C, Carneiro C, Gomez-Ibarlucea E, Soto A, Vidal A, Ferron SR, Farinas I (2013) Transcriptional repression of Bmp2 by p21(Waf1/Cip1) links quiescence to neural stem cell maintenance. *Nat Neurosci* 16:1567–1575.
- Rampal R, Arboleda-Velasquez JF, Nita-Lazar A, Kosik KS, Haltiwanger RS (2005) Highly conserved O-fucose sites have distinct effects on Notch1 function. *J Biol Chem* 280:32133–32140.
- Renault VM, Rafalski VA, Morgan AA, Salih DAM, Brett JO, Webb AE, Villeda SA, Thekkat PU, Guillerey C, Denko NC, Palmer TD, Butte AJ, Brunet A (2009) FoxO3 Regulates Neural Stem Cell Homeostasis. *Cell Stem Cell* 5:527–539.
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707–1710.
- Reynolds BA, Weiss S (1996) Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 175:1–13.
- Sakamoto M, Ieki N, Miyoshi G, Mochimaru D, Miyachi H, Imura T, Yamaguchi M, Fishell G, Mori K, Kageyama R, Imayoshi I (2014) Continuous Postnatal Neurogenesis Contributes to

- Formation of the Olfactory Bulb Neural Circuits and Flexible Olfactory Associative Learning. *J Neurosci* 34:5788–5799.
- Sakamoto M, Imayoshi I, Ohtsuka T, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R (2011) Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:8479–8484.
- Shimojo H, Ohtsuka T, Kageyama R (2008) Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. *Neuron* 58:52–64.
- Shook B a., Manz DH, Peters JJ, Kang S, Conover JC (2012) Spatiotemporal Changes to the Subventricular Zone Stem Cell Pool through Aging. *J Neurosci* 32:6947–6956.
- Yang L-T, Nichols JT, Yao C, Manilay JO, Robey EA, Weinmaster G (2005) Fringe glycosyltransferases differentially modulate Notch1 proteolysis induced by Delta1 and Jagged1. *Mol Biol Cell* 16:927–942.
- Yoon K, Gaiano N (2005) Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci* 8:709–715.
- Young KM, Fogarty M, Kessaris N, Richardson WD (2007) Subventricular zone stem cells are heterogeneous with respect to their embryonic origins and neurogenic fates in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 27:8286–8296.

発表論文

Hiroki Kawai, Daichi Kawaguchi, Benjamin D. Kuebrich, Takeo Kitamoto, Masahiro Yamaguchi,
Yukiko Gotoh and Shohei Furutachi

Area-specific regulation of quiescent neural stem cells by Notch3 in the adult mouse subependymal
zone

Journal of Neuroscience 37 (49) 11867-11880

謝辞

本研究を行うにあたり、非常に熱心にご指導くださった後藤由季子教授に心から深く感謝申し上げます。後藤由季子教授によるご指導と東京大学分子細胞生物学研究所情報伝達研究室及び東京大学薬学部分子細胞生物学研究室での研究生活を通じて多くのことを学ぶことができました。

また、研究を一から丁寧に指導してくださった古舘昌平博士に大変感謝しております。特に、発表資料、申請書類を書く能力は古舘昌平博士が根気強く指導してくださった経験なくしては、身につかなかったと思います。

研究室のみなさまには、ディスカッションや実験の上で大変お世話になりました。どうもありがとうございました。

そして、精神的、経済的な面で助けてくれた家族に感謝いたします。