

## 論文の内容の要旨

論文題目 静止期成体神経幹細胞の維持における Notch3 の役割の解析

氏名 河合 宏紀

### 序論

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。

### 結果

#### 1. Notch3 は成体脳室下帯の静止期神経幹細胞に高発現している

Notch1 は活性化神経幹細胞の維持に選択的に貢献していることが示唆されていることから、まず Notch1 の発現パターンを詳細に調べることにした。成体マウス大脳組織切片を作製し、抗 Notch1 抗体を用いて免疫染色を行った。その結果 Notch1 は静止期成体神経幹細胞

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。この結果は 活性化神経幹細胞が Notch1 に依存し、静止期神経幹細胞が依存していないという報告と一致している。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

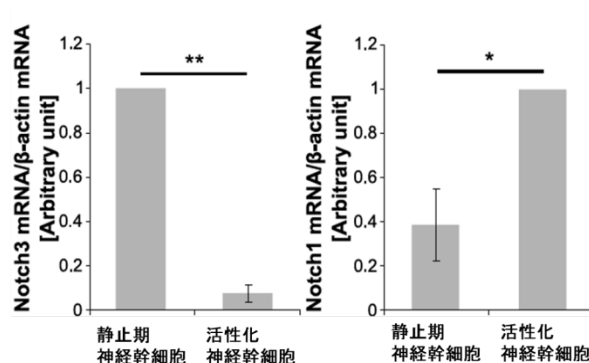


図1 Notch3 は静止期神経幹細胞で高発現しており、Notch1 は活性化神経幹細胞でより発現していた

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。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。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 (図 1)。一方で、Notch1 は活性化神経幹細胞に高発現していた。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。

## 2. Notch3 ノックアウトマウスでは静止期神経幹細胞が減少する

まず Notch3 が神経幹細胞の維持に貢献しているのかを調べるために、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い、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。さらに、神経幹細胞の中でも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を明らか

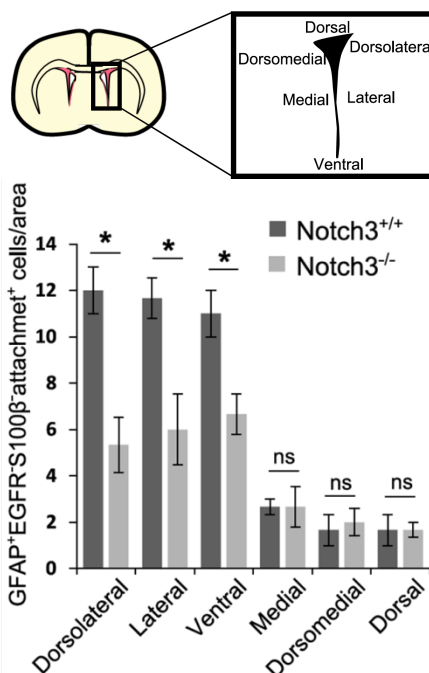


図2 Notch3 のノックアウトによって、静止期神経幹細胞が領域特異的に減少した

にするために、GFAP 陽性、EGFR 陰性、S100 $\beta$  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 (図 2)。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。以上のことより、Notch3 が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。

### 3. Notch3 のノックダウンによって神経幹細胞の増殖が亢進する

当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。

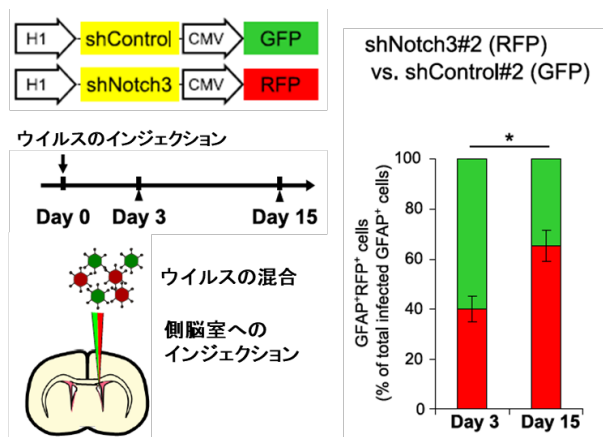


図3 Notch3 のノックダウンによって神経幹細胞 (GFAP 陽性細胞) が増加した

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い 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 陽性な細胞の割合が増加していることが明らかになった。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。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 (図 3)。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。

### 4. 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、tyrosine hydroxylase (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。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。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。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依ると考えられる。

## 結論

これまで、静止期神経幹細胞の維持と分裂の促進という、相反する 2 つの重要な機能を Notch シグナルがいかに行っているのかは明らかでなかった。本研究により、Notch3 が脳室下帯の静止期成体神経幹細胞に高発現しており、静止状態とその適切な数の維持に貢献していることが示唆された。このことは、Notch1 が活性化神経幹細胞の維持に機能しているという報告と合わせて、Notch 受容体の使い分けが神経幹細胞の静止状態と活性化状態のバランスの維持に貢献している可能性を示唆している。また、Notch3 の神経幹細胞維持における機能は脳室下帯の領域特異的であり、さらに嗅球の特定のニューロンサブタイプの新生に重要な役割を担っていることが示唆された。従って、長期的な神経新生の継続と嗅球の機能維持という重要な生命現象を担うメカニズムの一端を明らかにすることができたと考えている。

## 発表論文

Kawai K, Kawaguchi D\*, Kuebrich D. B, Kitamoto T, Yamaguchi M, Gotoh Y and Furutachi S\*

(\*Co-corresponding authors.)

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

*Journal of Neuroscience* 37 (49) 11867-11880