



Lunatic fringe potentiates Notch signaling in the developing brain

加藤, 智朗

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2010-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5050

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005050>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 加藤 智朗
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博い第 5050 号
学位授与の要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の日 付 2010 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Lunatic fringe potentiates Notch signaling in the developing brain (ルナティックフリンジは脳発生過程においてノッチシグナルを増強している)

審 査 委 員

主 査 教 授 清野 進
教 授 南 康博
教 授 勾坂 敏朗

Lunatic fringe potentiates Notch signaling in the developing brain

ルナティックフリンジは脳発生過程において
ノッチシグナルを増強している

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
発生・再生医学
(指導教員: 丹羽 仁史 客員教授)

加藤 智朗

【序章】

哺乳類大脳皮質形成過程における神経前駆細胞は、発生段階により多様な細胞分化系譜や分裂様式を示す。胎生期の神経新生が起こる時期には、神経前駆細胞は脳質層(ventricular zone; VZ)で細胞周期に応じて自身の細胞核を頂端(apical)側から基底(basal)側へと移動させ、一部の細胞の細胞核は再び頂端側へと移動して細胞分裂を行う。頂端側で細胞分裂を行う神経前駆細胞は *apical progenitor* と呼ばれ、多くの場合、細胞分裂後の方の娘細胞が *apical progenitor* として細胞分裂を繰り返し、もう一方では細胞分裂能を失い直接ニューロンへと分化するか、VZ の基底側あるいは脳質下層(subventricular zone)で数回分裂する *basal progenitor* として分裂した後にニューロンへと分化する。*apical progenitor* の細胞分裂後に生まれる娘細胞の細胞運命決定がどのように制御されているかは未解明な部分が多い。

Notch シグナルは神経前駆細胞の増殖能の維持において重要であるが、膜タンパク質である Notch が切断され、Notch 細胞内ドメイン(NICD)が核内に移行して転写因子の補助因子として機能する過程で、他の多くの分子が関与している。ショウジョウバエの研究より同定された *Fringe* 遺伝子は Notch 膜タンパク質の細胞外ドメインを糖鎖修飾する酵素をコードしており、*Fringe* は近傍の細胞が発現する Notch リガンドの種類に応じて Notch の活性を正または負に制御することが知られている。マウス発生期の大脳皮質では、三種類の *Fringe* 遺伝子オーソログが発現していることが示されているがその機能は知られていない。そこで本研究では未分化な神経前駆細胞が最も豊富に存在する VZ において強く発現している *Lunatic fringe* (*Lfng*)が神経前駆細胞での Notch の活性化及び増殖能の維持にどのように関与しているかを調べた。

【材料と方法】

Lfng ノックアウトマウス

Randy L. Johnson 氏らにより作成された *Lfng* 遺伝子欠損変異マウスを分与して頂いた。雌雄 *Lfng* 欠損ヘテロ接合型(*Lfng* +/-)マウス同士を交配し、*Lfng* 欠損ホモ接合型(*Lfng* KO)マウスを得た。遺伝子型は PCR により確認した。

in utero electroporation

麻酔下の妊娠マウスを開腹して子宮を出し、胎児脳に plasmid DNA を注入し、電気パルスをかけることにより神経前駆細胞に各種発現ベクターを導入した。恒常的発現プロモーター(pCAG)下流に loxP 配列で挟んだ polyA シグナル配列を挿入したベクターと、pCAG-Cre ベクターを共導入することにより、目的遺伝子を発現する細胞密度をコントロールした。

BrdU 及び EdU ラベル

細胞の増殖能を調べるため、BrdU または EdU を妊娠マウス腹腔内に注射した。BrdU は免疫組織染色により、また、EdU は製品プロトコールに従い、取り込まれた細胞を検出した。

免疫組織染色

摘出した脳をパラホルムアルデヒドで固定し、20%スクロース溶液で置換した後、OCT コンパウンドに包埋して凍結させ、クライオスタットにより切片を作成した。0.1%Triton-X100 と 5% ロバ血清を含む PBS 溶液でブロッキングした後、一次抗体を 0.01%Triton-X100 を含む PBS 溶液で希釈し、切片上にかけ、静置した。洗浄後、二次抗体を同溶液で希釈したものを切片上にかけ静置した。洗浄後、封入剤をかけ封入した。

イメージングと細胞数測定

免疫組織染色後の凍結切片の大脳皮質領域を共焦点レーザー顕微鏡にて画像化した。得られた画像から免疫組織染色により発現が見られる細胞数を計測した。

【結果と考察】

(1) *Lfng* KO マウスの apical progenitor では Notch シグナルの低下が見られるが細胞分化や脳形成に影響しない。

Lfng KO マウスの発生過程における神経前駆細胞の Notch の活性化及び apical progenitor としての増殖能を正常マウスと比較した。Notch の活性化の指標として、下流遺伝子である Hes1 及び Hes1 により発現抑制される Neurogenin2 (Ngn2) の免疫組織染色を行うと、*Lfng* KO マウスの大脳皮質では Hes1 陽性細胞が減少し、Ngn2 陽性細胞が増加していた。このことから、神経前駆細胞における Notch シグナルの低下が示唆された。ところが、*Lfng* KO マウス神経前駆細胞の増殖能について調べるために胎児脳に BrdU を取り込ませ、BrdU 陽性細胞の数、分布、増殖細胞マーカー Ki67 及び細胞周期制御因子 p27 の発現割合を測定したが、いずれにおいても正常マウスと有意な差は検出されず、また、成体脳の大きさや大脳皮質の層構造を示すマーカーの発現パターンに大きな異常は示されなかった。これらの結果、*Lfng* の機能欠失は Notch 活性化レベルの低下を引き起すが、細胞増殖能には影響を与えないと考えられた。

(2) *Lfng* 機能欠失による Notch シグナルの低下は細胞自律的である。

Notch の活性化には近傍の細胞が細胞膜上に提示するリガンドとの接触が必要であることが知られているが、リガンドの発現は Notch の活性化により抑制されるため、*Lfng* KO マウスの解析では *Lfng* の発現がその細胞自身での Notch の活性化に正に働くのか、負に働くのかは明らかにできなかった。そこで、*Lfng* の Notch シグナルに関する機能としての細胞自律性を確かめるため、人工型 miRNA を発現させる RNA 干渉法を利用し、*Lfng* ノックダウンによるモザイク解析を行った。miRNA 発現細胞では Hes1 陽性細胞数の割合が減少し、Ngn2 陽性細胞数の割合が増加した。この効果は細胞密度によらず、また、miRNA を発現していない細胞での Hes1 や Ngn2 の発現には影響しないことから、*Lfng* の機能欠失による Notch 活性化レベルの低下は細胞自律的であると考えられた。また、*Lfng* の機能欠失実験において、細胞密度によらず apical progenitor で発現される Pax6 や分化した直後のニューロンや basal progenitor で発現される Tbr2 の陽性細胞数の割合に変化がないことから *Lfng* 機能欠失による Notch 活性化レベルの低下は神経前駆細胞の細胞運命決定には影響しないことが示された。本研究からその理由は明らかにはされなかったが、*Lfng* 機能欠失による

Notch シグナルの低下が細胞分化を引き起こすのに十分でないか、或いは他のメカニズムにより細胞分化が抑制されている可能性が考えられた。

(3) 哺乳類 *Fringe* 遺伝子の強制発現により Notch シグナルが亢進される。

Lfng や他の二つのオーソログである *Manic fringe* (*Mfng*)、*Radical fringe* (*Rfng*) の強制発現による神経前駆細胞に与える影響を確認した。同時に、*Lfng* の糖転移酵素活性を消失したタンパク質をコードした *LfngD201A* 変異型の強制発現も行った。その結果、三つすべての *Fringe* 遺伝子の強制発現により VZ に局在する細胞に限り Notch シグナルは亢進され、*apical progenitor* として増殖能を維持した細胞が増加していることが示された。一方、*LfngD201A* 変異型の強制発現では miRNA を用いた機能欠失実験同様、Notch 活性化レベルは低下したが、神経前駆細胞の増殖能には影響しないことが示され、この変異体は *Lfng* のドミナントネガティブ変異体として機能すると考えられた。

Lfng 強制発現実験は *Lfng* の発現は細胞自律的な Notch シグナルの亢進を引き起こし *apical progenitor* の維持に寄与しうることを示した。過去の報告では NICD の強制発現は VZ にある神経前駆細胞の細胞周期を延長もしくは静止させていることが示されているため、*Lfng* の強制発現による細胞周期への影響を EdU の取り込みにより調べたところ、*Lfng* の強制発現細胞においても NICD と同様の結果が得られ、この結果は *Lfng* が細胞自律的に Notch シグナルを亢進している事を支持した。

(4) *Lfng* は近傍の細胞が発現する *Dll1* に依存して Notch シグナルを亢進する。

Lfng KO マウスを用いて、*Delta-like1(Dll1)* と *Jagged1(Jag1)* の 2 種類の Notch リガンドの強制発現に対する影響を調べた。*Dll1* を低細胞密度で強制発現すると、*Lfng* の遺伝子型にかかわらず Tbr2 陽性細胞の割合が増加した。この結果は *Dll1* が近傍の細胞より強く発現することで、*cis inhibition* と呼ばれる細胞自律的なメカニズムと、近傍の細胞の Notch の活性化が起こり、リガンドの発現が抑制されたため *Dll1* 強制発現細胞はリガンドとの接触が減少する非自律的なメカニズムにより Notch シグナルが抑制され細胞分化が促進されると考えられた。一方で *Dll1* を高細胞密度で強制発現させた場合、*Lfng* +/- マウスでは Tbr2 陽性細胞の割合が有意に減少するが *Lfng* KO マウスでは *Lfng* +/- マウス程の減少が見られなかった。また、*Jag1* の強制発現では *Lfng* の発現の有無にかかわ

らず、高細胞密度においても *Dll1* を *Lfng* +/- マウスで強制発現した時に見られたような Tbr2 陽性細胞の減少は見られなかった。これらの結果から、*Lfng* は近傍で発現する *Dll1* からの Notch シグナルの活性化を細胞自律的に増強する機能があることが示唆された。

本研究は、マウス大脳皮質形成過程における *Lfng* 遺伝子の役割を明らかにしたものであるが、本研究の成果は神経前駆細胞の増殖能の維持と分化の制御に関わる詳細な分子機構の解明において重要な意義を持つと考えられる。

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|----------------------------------|--|----|-------|
| 受付番号 | 甲第 2126 号 | 氏名 | 加藤 智朗 |
| 論文題目 Title of Dissertation | <p>Lunatic fringe potentiates Notch signaling in the developing brain</p> <p>ルナティックフリンジは脳発生過程においてノッチシグナルを増強している</p> | | |
| 審査委員 Examiner | <p>主査 <u>清野 遼</u> Chief Examiner</p> <p>副査 <u>南 康博</u> Vice-examiner</p> <p>副査 <u>勾坂 敏朗</u> Vice-examiner</p> | | |
| 審査終了日 | 平成 22 年 7 月 21 日 | | |

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

【序章】

哺乳類大脳皮質形成過程における神經前駆細胞は、発生段階により多様な細胞分化系譜や分裂様式を示す。胎生期の神經新生が起こる時期には、神經前駆細胞は脳質層(ventricular zone; VZ)で細胞周期に応じて自身の細胞核を頂端(apical)側から基底(basal)側へと移動させ、一部の細胞の細胞核は再び頂端側へと移動して細胞分裂を行う。頂端側で細胞分裂を行う神經前駆細胞は **apical progenitor** と呼ばれ、多くの場合、細胞分裂後の方の娘細胞が **apical progenitor** として細胞分裂を繰り返し、もう一方では細胞分裂能を失い直接ニューロンへと分化するか、VZ の基底側あるいは脳質下層(subventricular zone)で数回分裂する **basal progenitor** として分裂した後にニューロンへと分化する。**apical progenitor** の細胞分裂後に生まれる娘細胞の細胞運命決定がどのように制御されているかは未解明な部分が多い。

Notch シグナルは神經前駆細胞の増殖能の維持において重要であり、シグナル経路に関わる多くの分子が同定されている。ショウジョウバエの研究より同定された *Fringe* 遺伝子は Notch 膜タンパク質の細胞外ドメインを糖鎖修飾する酵素をコードしており、*Fringe* は近傍の細胞が発現する Notch リガンドの種類に応じて Notch の活性を正または負に制御することが知られている。マウス発生期の大脳皮質では、三種類の *Fringe* 遺伝子オーソログが発現していることが示されているがその機能は不明であった。そこで本研究では未分化な神經前駆細胞が最も豊富に存在する VZ において強く発現している *Lunatic fringe* (*Lfng*) の神經前駆細胞での機能を解析した。

【結果と考察】

(1) *Lfng* ノックアウト(KO)マウスの **apical progenitor** では Notch シグナルの低下が見られるが細胞分化や脳形成に影響しない

まず始めに研究者は Johnson 氏らにより作成された *Lfng* ノックアウトマウスの発生過程における神經前駆細胞の Notch の活性化及び **apical progenitor** としての増殖能を正常マウスと比較した。Notch の活性化の指標として、下流遺伝子である *Hes1* 及び *Hes1* により発現抑制される *Neurogenin2* (*Ngn2*) の免疫組織染色を行うと、*Lfng* KO マウスの大脳皮質では *Hes1* 陽性細胞の減少、*Ngn2* 陽性細胞の増加が観察され、神經前駆細胞における Notch シグナルの低下が示唆された。この *Lfng* KO マウス神經前駆細胞の増殖能について BrdU 投与により調べたが、正常マウスと有意な差は検出されず、また、成体脳の大きさや大脳皮質の層構造を示すマーカーの発現パターンに大きな異常は示されなかった。

(2) *Lfng* 機能欠失による Notch シグナルの低下は細胞自律的である

Notch の活性化には近傍の細胞が細胞膜上に提示するリガンドとの接触が必要であることが知られているが、リガンドの発現は Notch の活性化により抑制されるため、*Lfng* KO マウスの解析では *Lfng* の発現がその細胞自身での Notch の活性化に正に働くのか、負に働くのかは明らかにできない。そこで、*Lfng* の Notch シグナルに関する機能としての細胞自律性を確かめるため RNA 干渉法を利用したモザイク解析を行うと、*Lfng* の機能欠失による変化は機能欠損細胞自身で起こり、他の細胞には影響しないことから *Lfng* は細胞自律的に機能することが示唆された。また、*Lfng* の機能欠失実験において、細胞密度によらず **apical progenitor** で発現される *Pax6* や分化した直後のニューロンや **basal progenitor** で発現される *Tbr2* の陽性細胞数の割合に変化がないことから *Lfng* 機能欠失による Notch 活性化レベルの低下は神經前駆細胞の細胞運命決定には影響しないことが示された。

(3) 哺乳類 *Fringe* 遺伝子の強制発現により Notch シグナルが亢進される

Lfng や他の二つのオーソログである *Manic fringe*、*Radical fringe* の強制発現による神経前駆細胞に与える影響を確認した。同時に、*Lfng* の糖転移酵素活性を消失したタンパク質をコードした *LfngD201A* 変異型の強制発現も行った。その結果、三つすべての *Fringe* 遺伝子の強制発現により VZ に局在する細胞に限り Notch シグナルは亢進され、*apical progenitor* として増殖能を維持した細胞が増加することが示された。一方、*LfngD201A* 変異型の強制発現では RNA 干渉法を用いた機能欠失実験と同様の表現型が示されたことから、この変異体は *Lfng* のドミナントネガティブ変異体として機能することを示唆した。また、*Lfng* の強制発現による細胞周期への影響を EdU の取り込みにより調べたところ、*Lfng* の強制発現細胞は NICD と同様細胞周期の延長、又は静止を誘導していることが示され、この結果は *Lfng* が細胞自律的に Notch シグナルを亢進している事を支持した。

(4) *Lfng* は近傍の細胞が発現する *Dll1* に依存して Notch シグナルを亢進する

Lfng KO マウスを用いて、*Delta-like1(Dll1)* と *Jagged1(Jag1)* の 2 種類の Notch リガンドの強制発現に対する影響を調べた。*Dll1* を低細胞密度で強制発現すると、*Lfng* の遺伝子型にかかわらず Tbr2 陽性細胞の割合が増加した。この結果は *Dll1* が近傍の細胞より強く発現することで、*cis-inhibition* と呼ばれる細胞自律的なメカニズムと、近傍の細胞の Notch の活性化が起こり、リガンドの発現が抑制されたため *Dll1* 強制発現細胞はリガンドとの接触が減少する非自律的なメカニズムにより Notch シグナルが抑制され細胞分化が促進されると考えられた。一方で *Dll1* を高細胞密度で強制発現させた場合、コントロールマウスでは Tbr2 陽性細胞の割合が有意に減少するが *Lfng* KO マウスではコントロールマウス程の減少が見られなかった。また、*Jag1* の強制発現では *Lfng* の発現の有無にかかわらず、高細胞密度においても *Dll1* をコントロールマウスで強制発現した時に見られたような Tbr2 陽性細胞の減少は見られなかった。これらの結果から、*Lfng* は近傍で発現する *Dll1* からの Notch シグナルの活性化を細胞自律的に増強する機能があることを示唆した。

本研究は、Notch シグナルの調節因子である *Lfng* 遺伝子がマウス大脳皮質形成過程においてリガンドの種類に依存して Notch シグナルを増強していることを明らかにした。この神経前駆細胞の未分化性の維持と分化の制御に関する重要な知見は価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。

The candidate, having completed studies on "Lunatic fringe potentiates Notch signaling in the developing brain", with a specialty in Developmental Biology and having advanced the field of knowledge in the area of brain development, is hereby recognized as having qualified for the degree of Ph.D.(Medicine).