

みにれびゅう

## 神経前駆細胞において増殖と分化の協調を制御する Rb ファミリータンパク質の役割

味岡 逸樹

### 1. はじめに

多細胞生物の発生において、一般的に細胞の増殖と分化は互いに相容れない関係にあり、細胞増殖を遂行する分子機構と細胞分化を遂行する分子機構が協調的に制御されている。特に神経細胞においては協調機構が厳格に作動しており、発生期に神経前駆細胞から産み出された神経細胞は増殖しない。がん抑制遺伝子 *Rb* とそのファミリー遺伝子 (*p107*, *p130*) 産物は、転写因子 E2F の活性を制御することで増殖の停止機能や分化の促進機能を持つが、ファミリー間の代償的発現誘導や機能重複から、その役割解明には機能重複等を考慮した逆遺伝学的解析が必要とされる。近年、すべての Rb ファミリー遺伝子を欠損したマウスの解析が可能になり、Rb ファミリーを欠損した神経前駆細胞は増殖を停止せずに分化を開始することが明らかとなった。Rb ファミリーを欠損した神経前駆細胞から産み出された神経細胞は増殖しつつ、その多くはやがて細胞死を起こすが、細胞死を逃れた場合は悪性腫瘍として振る舞うこともある。したがって、発生期における増殖と分化の協調機構の解明は、悪性腫瘍化の仕組みの解明にもつながる。本稿では、中枢神経系発生における Rb ファミリーの役割を概説するとともに、神経前駆細胞や神経細胞における増殖と分化の協調機構についても概説する。

### 2. 細胞増殖における Rb ファミリーの役割

がん抑制遺伝子 *Rb* の遺伝子産物は、転写活性因子 E2F と結合し、細胞周期進行に重要な遺伝子群を負に制御している (図 1A)<sup>1)</sup>。Rb は Cdk によってリン酸化されると E2F

から解離し、細胞周期進行に重要な遺伝子群が発現する (図 1A)。哺乳類では、Rb ファミリーとして Rb, p107, p130 が存在し、転写活性型 E2F ファミリーとして E2F1, E2F2, E2F3a が存在し、ファミリー間で優先的に結合する組み合わせがあるものの、すべての Rb ファミリーは増殖抑制能を持つ。Rb 欠損による増殖制御不全が、E2F との二重欠損で回復するといういくつかの報告から、Rb は主に E2F 依存的に増殖抑制能を発揮すると考えられている。一方で、E2F 非依存的な機構も知られている。具体的には、Cdk インヒビター p27 のユビキチン化を担う S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) と Rb が結合し、あるいは、Rb が Skp2 と anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) の両方に結合して Skp2 の分解を促進し、どちらの場合も p27 の安定化に寄与する (図 1B)。また別の機構として、クロマチン依存的な増殖抑制機構が存在し、Rb はヒストンメチル化酵素やヒストンアセチル化酵素と結合し、特定の遺伝子群を不活化する (図 1C)。したがって、Rb ファミリーは、E2F を代表とした多種多様なタンパク質と結合することで、増殖に重要な遺伝子の発現抑制や Cdk の活性抑制を担っているタンパク質である。

### 3. 神経細胞分化における Rb ファミリーの役割

E2F 結合 DNA 領域が増殖制御遺伝子以外のプロモーター領域にも存在すること、また、Rb ファミリーが多種多様なタンパク質と結合するという事実から、Rb ファミリーは増殖抑制以外の機能も担っていることが容易に想像される。実際、Rb ノックアウト (KO) マウスでは、赤血球の分化不全や幼若神経細胞の過増殖と細胞死が認められる<sup>2,3)</sup>。このように、Rb は増殖抑制以外にも、状況に応じて細胞分化や細胞死を制御しているため、Rb の機能とその仕組みの解明には細胞タイプ依存性や発生時期依存性といったコンテキスト依存性を考慮する必要がある。たとえば、Rb は E2F1 を介して細胞自律的に細胞死を抑制することが知られているが、Rb KO マウスにおける幼若神経細胞の細胞死は胎盤形成の異常による細胞非自律的なものである<sup>4)</sup>。実際、大脳で特異的に発現する *Foxg1* プロモーターを利用したコンディショナルノックアウト (cKO) マ

東京医科歯科大学脳統合機能研究センター (〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45)

**The role of retinoblastoma family protein for protecting uncoupled proliferation and differentiation in neuronal progenitors**

Itsuki Ajioka (Center for Brain Integration Research (CBIR), Tokyo Medical and Dental University (TMDU), 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan)

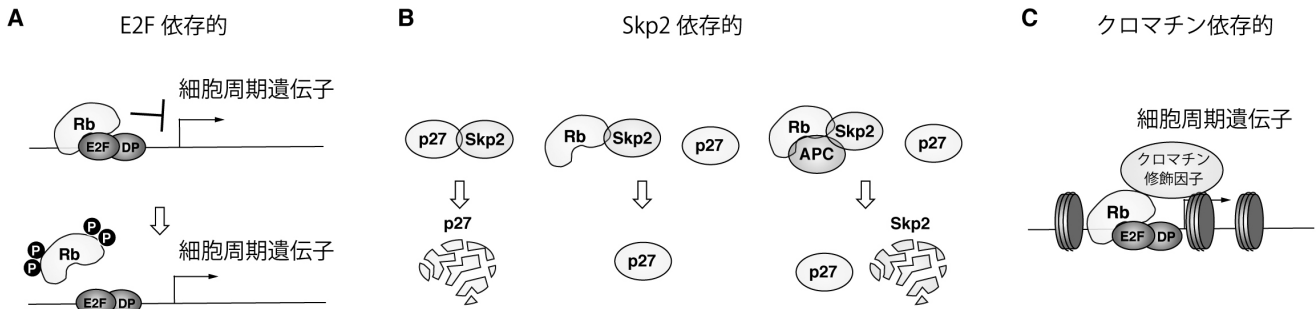


図1 Rbによる細胞増殖の制御機構

(A) 転写因子E2Fと結合し、細胞周期進行に重要な遺伝子群を発現抑制する。(B) Skp2と結合し、p27の安定化に寄与する。(C) クロマチン修飾因子と結合し、細胞周期進行に重要な遺伝子群を発現抑制する。

ウスでは、幼若神経細胞は過増殖するが、KOマウスで観察されるような広範な細胞死は起こらない<sup>5)</sup>。また、Rb cKOマウスの解析からRbがコンテキスト依存的な神経細胞分化も制御していることも明らかとなった。たとえば、網膜前駆細胞を特異的に不活化させる、*Chx10*プロモーターを用いたRb cKOマウスでは網膜神経細胞の一つ桿体細胞の分化不全が起こり<sup>6)</sup>、辺縁側の網膜前駆細胞を特異的に不活化させる、*Pax6*プロモーターを用いたRb cKOマウスでは、別の網膜神経細胞の一つスターバーストアマクリン細胞の分化不全が起こる<sup>7)</sup>。これらの分化不全は、分化開始ではなく成熟化の過程で起こることが示唆されており、Rbはこれら網膜神経細胞の成熟化の過程に必須だと考えられる。

Rbの機能を明らかにする際、コンテキスト依存性のほかに、ファミリー間の代償的発現誘導と機能重複も考慮する必要がある。たとえば、ヒトでは*RBI*の欠損で網膜芽細胞腫を発症するが、マウスではRbのみの欠損では網膜芽細胞腫を発症せず、Rbに加えて*p107*を二重欠損させると網膜芽細胞腫を発症する<sup>8)</sup>。なお、マウスではRb欠損で*p107*が代償的に発現誘導し、網膜細胞の細胞周期を正常に保つが、ヒトでは*p107*が発現誘導されないため、*RBI*の欠損のみで網膜芽細胞腫を発症すると考えられている<sup>9)</sup>。したがって、Rbの単独欠損で認められる神経細胞分化不全は、Rbの独自の機能によるものであり、Rbファミリーの役割解明には、機能重複等を考慮した逆遺伝学的手法が必要とされる。詳細は後述するが、Rbファミリーすべてを欠損させた大脳皮質の幼若神経細胞は、成熟化する領域まで遊走せず、Rbファミリーは細胞分化過程の一つである細胞遊走を細胞自律的に制御していることが示唆されている<sup>10)</sup>。今後、すべてのRbファミリー遺伝子を特定の細胞かつ特定の時期に不活化させる研究成果が蓄積することにより、いまだ明らかにされていない神経細胞分化におけるRbファミリーの役割解明がますます進むだろう。

#### 4. 増殖と分化の同時進行による網膜芽細胞腫

我々は網膜発生における個々のRbファミリーの役割解明を目指して、六つあるRbファミリー遺伝子アレルのうち、五つを網膜前駆細胞で特異的に欠損するマウスを作製して解析した。具体的には、Rb遺伝子を1アレルだけ持つRb-single (*Chx10-Cre; Rb Lox/+; p107 -/-; p130 -/-*)マウス、*p107*遺伝子を1アレルだけ持つ*p107*-single (*Chx10-Cre; Rb Lox/Lox; p107 +/-; p130 -/-*)マウス、*p130*遺伝子を1アレルだけ持つ*p130*-single (*Chx10-Cre; Rb Lox/Lox; p107 -/-; p130 +/-*)マウスを解析し、個々のRbファミリーの役割解明を行った<sup>11)</sup>。この中で*p107*-singleマウスは我々がまったく予期しなかった表現型を示した。具体的には、*p107*-single網膜前駆細胞から産み出された水平細胞が、シナプスを形成しながら増殖し、転移性の網膜芽細胞腫を形成することである。従来、分化した神経細胞は決して増殖しないと考えられており、神経細胞では増殖と分化の協調機構が厳格に作動すると考えられていたが、*p107*-single水平細胞は分化と増殖を同時に進行させ、悪性腫瘍として振る舞うことが明らかとなった。網膜芽細胞腫を発症するマウスは*p107*-singleマウス以外にも報告されている。具体的には、Rbと*p107*あるいはRbと*p130*を二重欠損させると、これらの網膜前駆細胞から産み出された、本来増殖しない幼若アマクリン細胞が増殖し、網膜芽細胞腫を形成するというものである<sup>12)</sup>。Rbファミリーの一部を欠損した網膜前駆細胞から産み出されたほかのタイプの網膜神経細胞が増殖しない理由は、水平細胞やアマクリン細胞が細胞死に耐性であるからだと考えられている。悪性化の過程で興味深いのは、増殖を続けた*p107*-single水平細胞が悪性化に伴い分化形質を失う点である。最近の研究から、水平細胞や幼若アマクリン細胞が増殖した異なる遺伝子型を持つマウスの網膜芽細胞腫や、さらにはヒトの網膜芽細胞腫においても、悪性化に伴い、本来同時に発現することのない、網膜視細胞、水平細胞、網

膜前駆細胞等で特異的に発現する遺伝子群を同時に発現していることが明らかとなった<sup>13)</sup>。すなわち、網膜芽細胞腫は、増殖と分化の協調が破綻した網膜ハイブリッド細胞であるといえる。また別の研究から、ヒトの網膜芽細胞腫では *RBI* 以外の変異がきわめてまれで、エピジェネティックな変異が網膜芽細胞腫の悪性化に重要だと明らかになった<sup>14)</sup>。したがって、網膜芽細胞腫の悪性化には、ヒト *RBI* あるいはマウス Rb ファミリーの遺伝子欠損に加えてエピジェネティックな変異が重要な役割を担い、その変異が増殖と分化の協調破綻に寄与しているのかもしれない。

## 5. 大脳皮質発生における Rb ファミリーの役割解明

発生期に産み出された神経細胞は決して増殖することはなく、神経細胞が細胞周期を進めた場合は、増殖せずに細胞死を起こすと考えられている。また、神経変性疾患における神経細胞死は細胞周期を進めることが細胞死の引き金になるという概念も提唱されている<sup>15)</sup>。我々は、神経前駆細胞で Rb ファミリーを欠損させると神経細胞分化を進めつつ増殖するというデータから、一度神経細胞へと分化を開始した細胞で Rb ファミリーを欠損させると増殖するのだろうかという疑問を持った。この疑問を解くためのモデルとして、エレクトロポレーション法で比較的同一の神経細胞タイプに遺伝子導入しやすい、大脳の興奮性神経細胞に着目して解析した<sup>10)</sup>。その解析の結果、Rb ファミリーは、神経前駆細胞において細胞周期からの離脱に必須で、神経細胞において細胞周期再侵入の阻止に必須であることが示唆された (図 2A)。また、恒常的に Cre リコンビナーゼを発現する pCAG-Cre を神経前駆細胞にエレクトロポレーション法で遺伝子導入することで、Rb ファミリーを神経前駆細胞で急性不活化させると、前駆細胞が増殖を停止せずに分化を開始し、幼若神経細胞が増殖することが明らかとなった (図 2B)。一方で、幼若神経細胞で特異的に

Cre リコンビナーゼを発現する pMAP2-Cre を遺伝子導入することで、Rb ファミリーを分化開始直後に急性不活化させると、細胞周期を S 期へと進めるものの、分裂せずに最終的には細胞死を起こすことが明らかとなった (図 2C)。また、細胞増殖制御とは別に、Rb ファミリーは幼若神経細胞の細胞遊走にも必須であることが明らかとなった。一度分化を開始した幼若神経細胞が分裂期に至らない仕組みの一端も明らかになりつつある。具体的には、前駆細胞で Rb ファミリーを欠損した幼若神経細胞では、DNA 修復経路が活性化しており、この経路の活性化が分裂に必須である。一方、幼若神経細胞で急性的に Rb ファミリーを欠損させた場合には、DNA 修復経路が活性化しない。したがって、神経細胞は前駆細胞から産み出された直後に DNA 修復経路を活性化しないような機構を獲得している可能性が考えられ、この機構が神経細胞の分化と増殖の同時進行を防ぐ仕組みとなっているのかもしれない。今後、分子レベルでその機構が明らかにされることにより、神経細胞が細胞周期を進めた後に増殖と細胞死といった異なる運命へと導かれる仕組みが解明されるかもしれない。

## 6. おわりに

*RBI* のクローニングから 30 年近く経つが、三つあるすべての Rb ファミリーを特定の細胞および特定の時期に欠損させることがマウスで可能になり、これまで明らかにされなかったさまざまな Rb ファミリーの役割が解明されつつある。また、その表現型を最新の技術 (ゲノム解析技術等) を用いて解析することで、これまで解析困難であった腫瘍悪性化の仕組みも明らかにされつつある。今後は、細胞周期を進めた後に細胞死を起こすといわれている神経変性疾患モデルを用いた解析などにより、神経系腫瘍と神経変性疾患の統合的な理解も進むかもしれない。

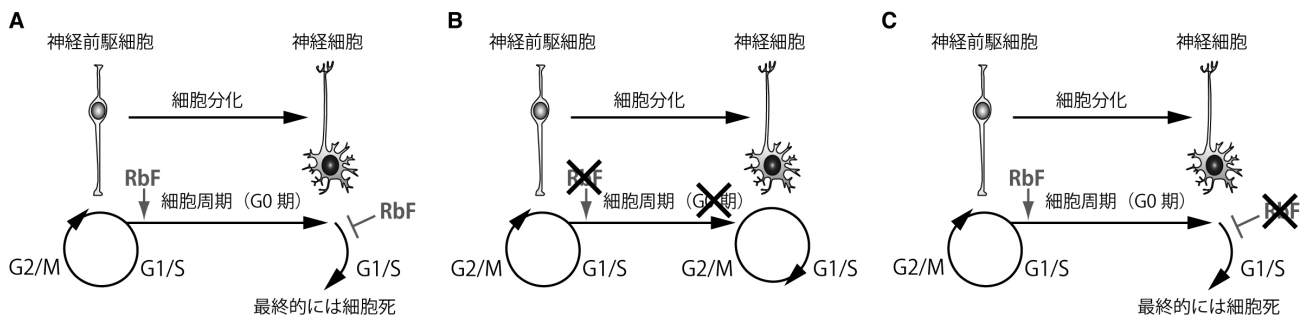


図 2 大脳神経前駆細胞および幼若神経細胞における Rb ファミリーの役割

(A) Rb ファミリーは、神経前駆細胞において細胞周期からの離脱 (G0 期移行) に必須で、幼若神経細胞において、細胞周期への再侵入阻止に必須である。(B) 神経前駆細胞で Rb ファミリーを欠損させると、その細胞は細胞周期から離脱せずに分化を開始し、幼若神経細胞が増殖する。(C) 幼若神経細胞で Rb ファミリーを欠損させると、その細胞は細胞周期を S 期まで進め、最終的には細胞死を起こす。なお、Rb ファミリーを欠損した幼若神経細胞は、細胞遊走にも異常がある。

- 1) Burkhart, D.L. & Sage, J. (2008) *Nat. Rev. Cancer*, 8, 671–682.
- 2) Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E.M., Bronson, R.T., Goodell, M.A., & Weinberg, R.A. (1992) *Nature*, 359, 295–300.
- 3) Lee, E.Y., Chang, C.Y., Hu, N., Wang, Y.C., Lai, C.C., Her-rup, K., Lee, W.H., & Bradley, A. (1992) *Nature*, 359, 288–294.
- 4) De Bruin, A., Wu, L., Saavedra, H.I., Wilson, P., Yang, Y., Rosol, T.J., Weinstein, M., Robinson, M.L., & Leone, G. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 6546–6551.
- 5) Ferguson, K.L., McClellan, K.A., Vanderluit, J.L., Mcintosh, W.C., Schuurmans, C., Polleux, F., & Slack, R.S. (2005) *EMBO J.*, 24, 4381–4391.
- 6) Johnson, D.A., Donovan, S.L., & Dyer, M.A. (2006) *J. Comp. Neurol.*, 498, 112–128.
- 7) Chen, D., Opavsky, R., Pacal, M., Tanimoto, N., Wenzel, P., Seeliger, M.W., Leone, G., & Bremner, R. (2007) *PLoS Biol.*, 5, e179.
- 8) Robanus-Maandag, E., Dekker, M., Van Der Valk, M., Car-rozza, M.L., Jeanny, J.C., Dannenberg, J.H., Berns, A., & Te Riele, H. (1998) *Genes Dev.*, 12, 1599–1609.
- 9) Donovan, S.L., Schweers, B., Martins, R., Johnson, D., & Dyer, M.A. (2006) *BMC Biol.*, 4, 14.
- 10) Oshikawa, M., Okada, K., Nakajima, K., & Ajioka, I. (2013) *Development*, 140, 2310–2320.
- 11) Ajioka, I., Martins, R.A., Bayazitov, I.T., Donovan, S., Johnson, D.A., Frase, S., Cicero, S.A., Boyd, K., Zakharenko, S.S., & Dyer, M.A. (2007) *Cell*, 131, 378–390.
- 12) Ajioka, I. & Dyer, M.A. (2008) *Cell Cycle*, 7, 735–740.
- 13) McEvoy, J., Flores-Otero, J., Zhang, J., Nemeth, K., Brennan, R., Bradley, C., Krafcik, F., Rodriguez-Galindo, C., Wilson, M., Xiong, S., Lozano, G., Sage, J., Fu, L., Louhibi, L., Trimarchi, J., Pani, A., Smeyne, R., Johnson, D., & Dyer, M.A. (2011) *Cancer Cell*, 20, 260–275.
- 14) Zhang, J., Benavente, C.A., Mcevoy, J., Flores-Otero, J., Ding, L., Chen, X., Ulyanov, A., Wu, G., Wilson, M., Wang, J., Brennan, R., Rusch, M., Manning, A.L., Ma, J., Easton, J., Shurtleff, S., Mullighan, C., Pounds, S., Mukatira, S., Gupta, P., Neale, G., Zhao, D., Lu, C., Fulton, R.S., Fulton, L.L., Hong, X., Dooling, D.J., Ochoa, K., Naeve, C., Dyson, N.J., Mardis, E.R., Bahrami, A., Ellison, D., Wilson, R.K., Downing, J.R., & Dyer, M.A. (2012) *Nature*, 481, 329–334.
- 15) Herrup, K. & Yang, Y. (2007) *Nat. Rev. Neurosci.*, 8, 368–378.

## 著者寸描



### ●味岡逸樹 (あじおか いつき)

東京医科歯科大学脳統合機能研究センター  
准教授。博士 (工学)。

■略歴 1973年東京都に生る。96年東京  
工業大学生命理工学部生体分子工学科卒  
業。2001年同大学院生命理工学研究科バ  
イオテクノロジー専攻博士課程修了・博士

(工学)。01～02年日本学術振興会特別研究員 (PD)。02～05  
年慶應義塾大学医学部解剖学教室助手。05～09年米国セント  
ジュード小児研究病院発生神経生物学部門ポスドク。09年慶  
應義塾大学医学部総合医科学研究センター特別研究講師。09  
年より東京医科歯科大学脳統合機能研究センター准教授。

■研究テーマ 損傷した脳が再生しない仕組みの解明 (理学研  
究) と、その知見を活かした脳再生技術の開発 (工学研究)。  
前者のメインプロジェクトとして神経細胞が増殖しない仕組み  
の解明をめざしています。

■ウェブサイト <http://www.tmd.ac.jp/med/cbir/ajioka.html>

■趣味 料理