みにれびゅう

GSK3β シグナル経路による神経前駆細胞の自己複製制御

鹿川　哲史[1]，備前　典久[1]，清水　健史[2]，田賀　哲也[1]

1.　はじめに

脊椎動物の脳神経系発生の初期過程では，脳室近傍の神経前駆細胞が未分化状態を維持しつつ分裂する自己複製を繰り返している．やがて，細胞は増殖を停止し，ニューロンなどさまざまな神経系細胞に分化する．増殖停止と分化開始のタイミングが連動することから，細胞内の増殖促進シグナルと分化シグナルが互いにクロストークしていることがわかる（**図 1**）．本稿では，神経前駆細胞の自己複製を支えるシグナル連携の分子機構を紹介する．

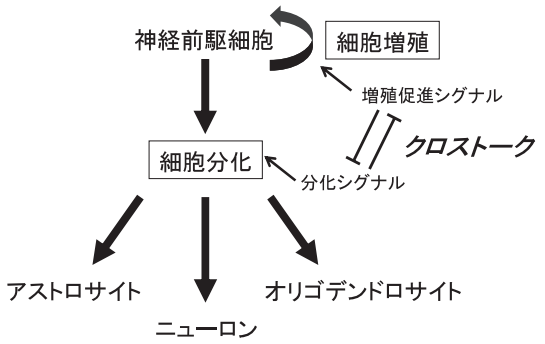

図 1　増殖促進と分化シグナルのクロストークによる神経前駆細胞の自己複製

2.　自己複製における細胞増殖促進シグナル

神経前駆細胞の増殖促進因子である線維芽細胞増殖因子 2（FGF2）と Wnt3a はそれぞれ細胞表面の特異的な受容体への結合を介して細胞内にシグナルを伝えるが，アウトプットがともに細胞増殖促進であることから，シグナル下流に増殖促進に関わる共通のエフェクター分子の存在が予測される．グリコーゲン・シンターゼ・キナーゼ 3β（GSK 3β）は哺乳類のすべての組織で発現している Ser/Thr タンパク質キナーゼで，特に脳神経系での発現が高い．これまでに GSK3β は Wnt 古典的（カノニカル）シグナル経路のエフェクター分子としてよく研究されてきた[1)]．Wnt 非存在下で GSK3β は β カテニンをリン酸化しその分解反応を促進する．Wnt が細胞表面の受容体複合体 Frizzled（Fzd）/LRP（低密度リポタンパク質受容体）に結合すると GSK3β が不活化され，リン酸化修飾を免れた β カテニンは安定化して細胞核に蓄積する．核内の β カテニンは転写共役因子として LEF（lymphoid enhancer factor）/TCF（T-cell factor）転写因子を活性化し，その標的遺伝子であるサイクリン D1 や c-Myc など細胞増殖促進性に働く遺伝子の発現を誘導する．一方，FGF2 シグナルは細胞内の MAP キナーゼ経路とホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ（PI3K）－ Akt 経路を活性化することが知られている．興味深いことに，他の細胞株を用いた実験などから GSK3β は Akt のよい基質としてリン酸化されそのキナーゼ活性を失うことが報告されており，神経前駆細胞を FGF2 刺激した際も GSK3β が不活化される可能性が考えられた．

そこで，我々はマウス胎仔終脳より調製した初代培養神経前駆細胞を FGF2 で刺激し，細胞の応答を生化学的および分子生物学的手法により解析した[2)]．FGF2 刺激した細胞では Akt キナーゼにより GSK3β の 9 番目のセリンがリン酸化され不活化されており，核内 β カテニンの増加が検出された．Wnt 経路と同様に LEF/TCF 転写因子の活性化と，サイクリン D1 の発現誘導も検出された．この現象は PI3K 阻害剤により消失したことからも PI3K-Akt 経路を介して GSK3β が不活性化されるシグナル経路が裏づけられた（**図 2-①**）．以上より，神経前駆細胞の増殖促進因子 FGF2 と Wnt は共通のエフェクター分子である GSK3β の不活化を介して協調的に細胞増殖に働くことが示された[2)]．

[1] 東京医科歯科大学難治疾患研究所幹細胞制御分野
（〒113-8510　東京都文京区湯島 1-5-45）
[2] 自然科学研究機構生理学研究所分子神経生理部門
（〒444-8787　愛知県岡崎市明大寺東山 5-1）

Roles of GSK3beta signaling in the self-renewal of neural progenitor cells

Tetsushi Kagawa[1], Norihisa Bizen[1], Takeshi Shimizu[2] and Tetsuya Taga[1]（[1]Department of Stem Cell Regulation, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan; [2]Division of Neurobiology and Bioinformatics, National Institute for Physiological Sciences, National Institutes of Natural Sciences, 5-1 Higashiyama Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan）

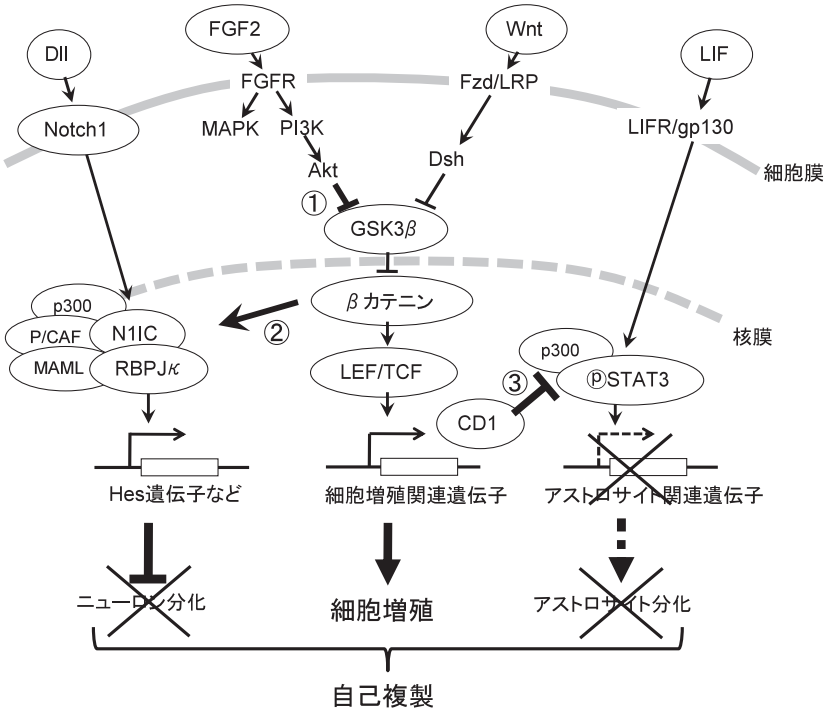

図 2　神経前駆細胞の自己複製を促進するシグナル連鎖

3.　自己複製におけるニューロン分化抑制

神経前駆細胞からニューロンへの分化を抑制する主要な調節機構としてはNotchシグナル経路がよく研究されている．未分化な神経前駆細胞はNotch受容体を発現しており，隣接細胞表面のDeltaやJaggedリガンドと結合するとNotchの細胞内ドメインが切断され核内に移行する．核内のNotch細胞内ドメインはRBPJκを中心とする転写複合体の一員として転写因子*Hes1*遺伝子などの発現を誘導する．Hes1は，ニューロン分化促進に働くbHLH（basic helix-loop-helix）型転写因子群の活性を阻害することでニューロン分化を阻害する．マウス初代培養神経前駆細胞を高密度に播種して培養すると，隣接細胞が発現するDeltaリガンドの刺激を受けてNotchシグナルが活性化される．我々はこの細胞をさらにFGF2で刺激すると*Hes1*遺伝子発現が上昇することを見いだした．一方，Notchシグナルを阻害するとFGF2を添加しても*Hes1*遺伝子の発現誘導は検出されなかった．FGF2の効果はβカテニンcDNAの強制発現により代替可能であり，βカテニンが転写共役因子としてNotch細胞内ドメインに結合しその転写活性を増大させる新たなシグナル経路の存在が明らかとなった（図2–②）．前項と合わせると，神経前駆細胞の増殖促進因子シグナルの下流でGSK3βが不活化されると，細胞増殖促進に関わるLEF/TCF転写複合体とニューロン分化抑制に関わるNotch/RBPJκ転写複合体の二つが同時に活性化されて，増殖と未分化状態維持の両立による神経前駆細胞の自己複製の分子機構の一端が明らかとなった[2]．

4.　自己複製におけるグリア細胞分化抑制

神経前駆細胞が自己複製するためには，グリア細胞に分化しないことも重要である．神経前駆細胞からアストロサイトへの分化は少なくとも二段階で抑制されている．一つは，細胞内因性のプログラムとも呼ぶべきDNAメチル化というエピジェネティック修飾によるアストロサイト特異的遺伝子群発現抑制である[3,4]．神経発生初期から中期にかけて，アストロサイト特異的遺伝子のDNAは高度にメチル化修飾され，転写因子の結合が妨げられているため発現が抑制されている．発生後期にはこのDNAメチル化が外れるため，神経前駆細胞が自己複製するためにはアストロサイト分化促進シグナル伝達経路を抑制する二つ目の分子機構の存在が必要である．最近，我々は初代培養神経前駆細胞にFGF2やWntなど細胞外来性増殖シグナルが入るとアストロサイト分化が抑制されることを見いだした．FGF2やWntシグナルの代用としてGSK3β活性阻害剤を添加してもアストロサイト分化抑制効果がみられることからGSK3βのシグナル下流のいずれかの分子がアストロサイト分化に対して抑制的に働くことが予測された．実際に，βカテニン/LEF/TCF転写複合体によって発現誘導を受けるサイクリンD1は細胞周期進行に非依存的な作用によりLIF（leukaemia inhibitory factor）/BMP2（bone morpho-

genetic protein 2）刺激によるアストロサイト分化を抑制した．サイクリンD1はLIFで活性化されるSTAT3の転写活性を減弱することによりアストロサイト特異的遺伝子の発現を抑制していることもわかった（図2–③）[5]．

神経前駆細胞初代培養系にFGF2やWntを添加するとオリゴデンドロサイトの出現も押さえられるが[6]，その分子機序には不明な点が多い．GSK3βシグナル経路の下流でLEF/TCFの標的遺伝子として誘導されるId2（inhibitor of differentiation protein 2）転写因子は，オリゴデンドロサイトの分化抑制活性を示すことが知られている[7]．ところが，GSK3β阻害剤でそのキナーゼ活性を阻害するとcAMP response element-binding protein（CREB）が活性化されオリゴデンドロサイト分化や生存が促進されることも報告されている[8]．また，FGF2シグナルは神経前駆細胞にOlig2転写因子の発現を誘導しオリゴデンドロサイト細胞系譜への分化能力を賦与する[9]ことなどから，FGF2はオリゴデンドロサイト分化誘導因子として論じられることもある[10, 11]．この他，オリゴデンドロサイト分化は細胞密度やほかのサイトカインとの組み合わせにも大きく影響されるため複雑である[12]．神経前駆細胞増殖シグナルとオリゴデンドロサイト分化抑制の相関については今後の研究で明らかにされることを期待したい．

5. 生体におけるGSK3α/β機能と神経精神疾患

培養系で観察されたGSK3βの不活性化による神経前駆細胞の自己複製亢進は生体でも検証された．マウス胎生脳にはGSK3βと機能重複を示すGSK3αが存在しているため，子宮内電気穿孔（エレクトロポレーション）法を用いて大脳皮質神経前駆細胞のGSK3αとβの双方をノックダウンしたところ，ニューロンへの分化が遅延し，未分化細胞層にとどまることがわかった[5]．同様に，GSK3α/βダブルノックアウトマウスの解析からも胎仔脳室の表面積が拡大する異常形態が検出され，未分化細胞の増殖傾向が示された[13]．このように，生体神経前駆細胞もGSK3α/β（以下GSK3）機能の低下により未分化状態を維持しつつ増殖することが示された．

中枢神経系におけるGSK3の機能については，これまでにも神経突起伸長，シナプス形成，神経伝達，神経新生など神経機能に関わるさまざまな事象を調節することが報告されている[1]．またGSK3の基質として遺伝子発現，代謝，細胞死，細胞骨格，シグナル伝達，脂質膜，輸送に関わる多くのタンパク質が報告されている．GSK3機能の重要性を裏づけるように，GSK3と多くの神経精神疾患との関連性が報告されている[14, 15]．アルツハイマー病患者にみられる神経原線維形成はGSK3によるタウタンパク質の異常リン酸化が深く関わっている．また，アルツハイマー病患者ではGSK3による微小管結合タンパク質CRMP2のリン酸化が亢進していることも報告されている[15]．さらにアミロイド前駆体タンパク質もGSK3の基質であり，Aβペプチド産生への関与も議論されている．

しかしながら，アルツハイマー病を含む神経精神疾患では疾患に直接結びつくGSK3遺伝子変異や連鎖関係は見つかってはいない．ヒトにおけるGSK3の先天的な活性異常は胎生致死となるのかもしれない．一方で，GSK3が細胞環境のセンサーとして細胞外からの刺激（成長因子，Wntやインスリン）を細胞内シグナルに変換し細胞運命決定に関わる遺伝子発現を制御することから，GSK3はさまざまな神経性心疾患治療薬の創薬標的分子として注目されている[15]．一般にGSK3キナーゼ活性が阻害されると神経前駆細胞の増殖が促進され，GSK3キナーゼ活性が上がるとニューロン分化促進とニューロン機能の亢進がみられる．ゆえに，GSK3に変異のない神経精神疾患患者に対しても，GSK3活性を標的とした薬剤により細胞生存，増殖，分化を操作することによる治療効果が報告されている．一方で，GSK3の基質が多種類存在するためGSK3活性を操作することによる副作用も問題となっている[15]．GSK3の下流標的分子は各々特異的な神経活動（神経新生や神経伝達など）に関わっていると考えられる．今後の展望として，GSK3と特異的に相互作用する分子や基質の同定および特性解析を進めることにより，各々の神経活動に特化されたより副作用の少ない神経精神疾患治療薬の開発が期待される．

1）Hur, E.M. & Zhou, F.Q.（2010）*Nat. Rev. Neurosci.*, **11**, 539–551.
2）Shimizu, T., Kagawa, T., Inoue, T., Nonaka, A., Takada, S., Aburatani, H., & Taga, T.（2008）*Mol. Cell Biol.*, **28**, 7427–7441.
3）Takizawa, T., Nakashima, K., Namihira, M., Ochiai, W., Uemura, A., Yanagisawa, M., Fujita, N., Nakao, M., & Taga, T.（2001）*Dev. Cell*, **1**, 749–758.
4）Namihira, M., Kohyama, J., Semi, K., Sanosaka, T., Deneen, B., Taga, T., & Nakashima, K.（2009）*Dev. Cell*, **16**, 245–255.
5）Bizen, N., Inoue, T., Shimizu, T., Tabu, K., Kagawa, T., & Taga, T.（2013）*Stem Cells*, DOI: 10.1002/stem.1613.
6）Shimizu, T., Kagawa, T., Wada, T., Muroyama, Y., Takada, S., & Ikenaka, K.（2005）*Dev. Biol.*, **282**, 397–410.
7）Chen, X., Zhang, Y., Cai, Q., & Yao, Z.（2012）*J. Neurosci. Res.*, **90**, 925–932.
8）Azim, K. & Butt, A. M.（2011）*Glia*, **59**, 540–553.
9）Abematsu, M., Kagawa, T., Fukuda, S., Inoue, T., Takebayashi, H., Komiya, S., & Taga, T.（2006）*J. Neurosci. Res.*, **83**, 731–743.
10）Naruse, M., Nakahira, E., Miyata, T., Hitoshi, S., Ikenaka, K., & Bansal, R.（2006）*Dev. Biol.*, **297**, 262–273.
11）Furusho, M., Kaga, Y., Ishii, A., Hebert, J.M., & Bansal, R.（2011）*J. Neurosci.*, **31**, 5055–5066.
12）He, L. & Lu, Q.R.（2013）*Neurosci. Bull.*, **29**, 129–143.

13）Kim, W.Y., Wang, X., Wu, Y., Doble, B.W., Patel, S., Woodgett, J.R., & Snider, W.D.（2009）*Nat. Neurosci.*, **12**, 1390–1397.
14）Ishizuka, K., Kamiya, A., Oh, E.C., Kanki, H., Seshadri, S., Robinson, J.F., Murdoch, H., Dunlop, A.J., Kubo, K., Furukori, K., Huang, B., Zeledon, M., Hayashi-Takagi, A., Okano, H., Nakajima, K., Houslay, M.D., Katsanis, N., & Sawa, A.（2011）*Nature*, **473**, 92–96.
15）Cole, A.R.（2012）*Front Mol. Neurosci.*, **5**, 4.

著者寸描

●鹿川哲史（かがわ　てつし）

東京医科歯科大学難治疾患研究所准教授．博士（理学）．

■略歴　1964年福岡県に生る．87年大阪大学理学部生物学科卒業．92年同大学大学院理学研究科生化学専攻博士課程卒業．93年岡崎国立共同研究機構生理学研究所非常勤の講師，助手．96年米国加州ソーク研究所に2年間留学後復職．2002年熊本大学発生医学研究センター助教授，准教授．09年東京医科歯科大学難治疾患研究所准教授．

■研究テーマ　神経発生．

■抱負　グリアの視点から，機能的神経回路構築の分子基盤を解明したい．

■ホームページ　http://www.tmd.ac.jp/mri/scr/index.html

■趣味　テニス観戦．