

平成10年度ヒトゲノム遺伝子治療研究事業

神経系細胞株の開発と品質管理に関する研究

主任研究者：黒葛原 啓

財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

総括研究報告書

神経系細胞株の開発と品質管理に関する研究

(主任研究者) 黒葛原 啓

(財)ヒューマンサイエンス振興財団・
研究資源バンク部長

研究要旨：マウス前脳由来の2種類の神経系前駆細胞株における分化機構を *in vitro* で解析した。1つの細胞株はニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの3方向に分化する能力をもつ神経系幹細胞株、MEB5細胞であり、もう1つの細胞株はアストロサイト前駆細胞株、AP-16細胞である。両細胞株は、未分化な神経系細胞で発現し、分化を制御していると考えられているヘリックス・ループ・ヘリックス型転写制御因子である *Mash-1*、*NeuroD* および *neurogenin* の mRNA を発現していた。*Mash-1* の mRNA は、分化誘導後の両細胞において発現が消失した。transforming growth factor (TGF)- β ファミリーに属するサイトカインである bone morphogenetic protein (BMP)-4/7、TGF- β 1 および TGF- β 2 は両細胞に対し、glial fibrillary acidic protein (GFAP)陽性のアストロサイトに分化を誘導する活性を示した。やはり TGF- β ファミリーに属する activin A は、AP-16細胞の分化を誘導したが、MEB5細胞に対しては分化を誘導せず、両細胞間で反応性の違いがあることがわかった。

分担研究者：

真下喜世彦 (財)ヒューマンサイエンス振興
財団・研究資源バンク部長

池田 弘美 同・研究資源バンク部員

樽松 美治 同・研究資源バンク部員

就いたばかりで、これらの因子の解明には多分化能をもつ神経系幹細胞株やアストロサイト前駆細胞株のような特定の細胞にのみ分化が誘導される前駆細胞株が有用である。

我々は、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの3方向に分化する神経系幹細胞株 (MEB5) とアストロサイトにのみ分化する前駆細胞株 (AP-16) をマウス前脳から樹立している。両細胞株の特徴として、以下の4点があげられる。1)epidermal growth factor(EGF)を増殖因子とする。2)無血清培養株であり、サイトカインなど分化制御因子の解析が容易である。3)アポトーシスが誘導される。4)leukemia inhibitory

A. 研究目的

哺乳動物の脳を構成する多様な細胞群は、共通の前駆細胞である神経系幹細胞から生み出される。この神経系幹細胞は各種の前駆細胞へ分化し、最終的には機能細胞であるニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトとなる。これらの発生過程を制御している遺伝的、環境的因子についての研究は緒に

factor(LIF)によりアストロサイトへの分化が誘導される。その他、両細胞株はnestinやGD3など共通の細胞マーカーを発現しており、MEB5細胞とAP-16細胞の違いは分化能以外は現在のところ見出されていない。

今回、MEB5細胞とAP-16細胞をモデル系として未分化な神経系細胞における分化機構の解析を試みた。その結果、未分化な神経系細胞で分化制御に働くと考えられている転写因子、*Mash-1*が両細胞で発現しており、分化誘導にともない発現が消失すること。また、アストロサイトへの分化を誘導するサイトカインとしてLIF以外に、transforming growth factor (TGF)- β ファミリーが活性を示すことを見出した。また、activin Aに対する反応性がMEB5細胞とAP-16細胞で異なるという興味深い結果が得られた。

B. 研究方法

細胞培養 MEB5 と AP-16 の両細胞株は以下の方法で培養した。用いた無血清培地は、D-MEM 培地を基礎培地としてインスリン (5 $\mu\text{g/ml}$)、亜セレン酸 (30 nM)、トランスフェリン (50 $\mu\text{g/ml}$)、ビオチン (10 ng/ml)、EGF (10 ng/ml) を添加した培地である。細胞の継代維持には、ポリ-L-リジンで表面をコートしたフラスコを用いた。継代は、0.1%の結晶トリプシン液で 1-2 分間処理した後、0.5 mg/ml トリプシンインヒビター液を加え、遠心し、約 2×10^4 個 / cm^2 の細胞密度でまいた。

RT-PCR 細胞から mRNA を精製、逆転写反応後 PCR を行った。PCR の反応条件は 94°C で 5 分間と 60°C で 5 分間反応後、3 つのステップ (72°C で 1.5 分間、94°C で 45 秒間、60°C で 45 秒間) の反応を 35 サイクル繰り返した。最後に 72°C で 10 分間反応させた。各遺伝子

の PCR に用いたプライマー (アンチセンス側とセンス側) は以下のとおり。マウス neurogenin (アンチセンス: 5'-GTGGTATGGGATGAAACAGGGC-3'; センス: 5'-CCGACGACACCAAGCTCACCAAGAT-3')、マウス *Mash-1* (アンチセンス: 5'-GCAGCTCTTGTTCTCTGGGCTAAG-3'; センス: 5'-TCACAAGTCGCGGCCAAGCAGGA-3')、マウス *NeuroD* (アンチセンス: 5'-GGAGGATCAAAGCCCAAGAGACGG-3'; センス: 5'-CAGGCAAGAAAGTCCGAGGGTTGAG-3')。

蛍光抗体法 細胞における細胞マーカーの発現については、1 次および 2 次抗体を用いた蛍光抗体法で解析した。ポリ-L-リジン、フィブロネクチン、ラミニンで表面をコーティングしたカバーガラス上で細胞を培養し、室温で 30 分間、抗体液と反応させ、オリンパス BH-2 蛍光顕微鏡下で観察した。

C. 結果および考察

転写制御因子の発現 近年、ショウジョウバエや線虫などを用いて、*Mash-1* や *NeuroD* など、神経系細胞の発生や分化に働くと考えられる転写制御因子が見出されている。しかし、哺乳類中枢神経系におけるこれら因子の機能、発現の時期、発現する細胞については不明な点が多い。今回、MEB5 細胞と AP-16 細胞で発現している転写制御因子について検討した。

EGF を含む無血清培地で培養した未分化状態にある MEB5 細胞と AP-16 細胞から total mRNA を調製し、*Mash-1*、*NeuroD*、および *neurogenin* の各遺伝子について RT-PCR を行った。その結果、いずれの遺伝子の

mRNA も両細胞株で発現していることがわかった。

次に、分化を誘導した後の MEB5 細胞と AP-16 細胞において、各 mRNA の発現をみた。用いた分化誘導後の細胞は 1)MEB5 細胞を EGF を含まない培地に置き換えた 3 日後、ニューロンとアストロサイトに分化した細胞 2)MEB5 細胞を LIF で処理した 3 日後、アストロサイトに分化した細胞、3)AP-16 細胞を LIF で処理した 3 日後、アストロサイトに分化した細胞、の 3 種類である。上記 3 種類の分化誘導後の細胞から total mRNA を調製し、*Mash-1*、*NeuroD*、および *neurogenin* について RT-PCR を行った。その結果、分化誘導後の上記の 3 種類のいずれの細胞においても *Mash-1* の mRNA 発現が認められず、分化誘導に伴い発現が消失することがわかった。*NeuroD* と *neurogenin* は分化誘導後の細胞においても、分化前の細胞と同様に mRNA の発現がみられた。

Mash-1、*NeuroD* および *neurogenin* はヘリックス・ループ・ヘリックス型の転写制御因子で、神経系前駆細胞の発生や分化に関与すると考えられている。*Mash-1* は神経分化の初期に働くと考えられ、蛋白および mRNA は中枢神経系では神経系幹細胞が存在すると考えられている胎児脳室層で発現している。*NeuroD* は *Mash-1* より後の分化段階で働き、神経細胞を特徴づける蛋白の発現を制御すると考えられている。発現は中枢神経系ではすでに神経細胞に分化することが決定づけられている細胞が分布する脳室層の外側の層にみられる。*neurogenin* は主に未分化な神経系細胞で発現し、*NeuroD* の発現の制御に関連すると考えられているが、不明な点が多い。*Mash-1*、*NeuroD* および *neurogenin*

を発現する神経系前駆細胞株についての報告はない。これらの転写制御因子の機能解析に MEB5 細胞と AP-16 細胞は有用な材料となる。特に MEB5 細胞と AP-16 細胞の分化誘導にともない *Mash-1* 遺伝子の発現が消失する系は、*Mash-1* の遺伝子発現の制御機構の解析に有用であろう。

TGF- β ファミリーの分化誘導活性 これまでの我々は、LIF が MEB5 細胞と AP-16 細胞をアストロサイトへ分化誘導させる活性を示すことを明らかにしている。近年、TGF- β ファミリーに属するサイトカインが様々な細胞の増殖と分化に働く例が多く示されている。今回、これら TGF- β ファミリーに属するサイトカインの MEB5 細胞と AP-16 細胞に対する分化誘導活性について検討した。

MEB5 細胞と AP-16 細胞の培養液中に、BMP4/7、TGF- β 1、TGF- β 2 または activin A の各サイトカインを 100 ng/ml 加え培養した。3 日後の細胞について、ニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトへの分化誘導をみた。細胞マーカーとして、未分化状態の細胞は nestin、ニューロンは、class-III β -tubulin、アストロサイトは glial fibrillary acidic protein(GFAP)、オリゴデンドロサイトは galactocerebroside(GalC)を用い、免疫蛍光抗体法でみた。

BMP4/7 で処理した 3 日後の MEB5 細胞と AP-16 細胞では、約 60%が GFAP 陽性細胞であり、アストロサイトに分化したことが示された。GFAP 陽性細胞以外の細胞は、nestin 陽性であり、class-III β -tubulin、GFAP あるいは GalC は陰性であった。GFAP 陽性細胞の形態は、成熟型アストロサイトに類似した扁平の形態を有していた。LIF で処理した 3 日後の MEB5 細胞と AP-16 細胞で

は、GFAP 陽性細胞が約 30%であり、BMP4/7 が LIF に比べ強い分化誘導活性を有することが示された。TGF- β 1、TGF- β 2 処理では MEB5 細胞と AP-16 細胞において約 20%の細胞が GFAP 陽性となった。BMP4/7 で処理した場合と同様、class-III β -tubulin、GFAP あるいは GalC が陽性の細胞は認められなかった。以上の結果から、TGF- β ファミリーに属する BMP4/7、TGF- β 1 および TGF- β 2 は LIF と同様、MEB5 細胞に対し、アストロサイトへの一方向的な分化を誘導し、AP-16 細胞のアストロサイトへの分化も誘導することが分かった。

次に、TGF- β ファミリーに属する activin A の MEB5 細胞と AP-16 細胞に対する効果を検討した。activin A は未分化な MEB5 細胞の増殖に影響を与えなかった。また activin A 処理 3 日後の MEB5 細胞では、無処理の細胞と同様にすべての細胞が nestin 陽性であり、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの分化マーカーは発現しておらず、分化は誘導しなかった。一方、AP-16 細胞に対しては、activin A はアストロサイトへの分化誘導活性を示した。activin A で処理した 3 日後の AP-16 細胞では約 10%が GFAP 陽性のアストロサイトへ分化した。activin A に対する反応性が MEB5 細胞と AP-16 細胞で異なることがわかった。

神経系前駆細胞の分化を制御するサイトカインについては、現在までほとんど明らかにされていない。今回、神経系前駆細胞株である MEB5 細胞と AP-16 細胞に対して、TGF- β ファミリーに属する BMP4/7、TGF- β 1 および TGF- β 2 がアストロサイトへの分化を誘導することがわかった。MEB5 細胞と AP-16 細胞における分化誘導系は TGF- β フ

ファミリーの中枢神経系前駆細胞に対する作用の解明に有用なモデル系となろう。

MEB5 細胞と AP-16 細胞の間で activin A に対する反応能が異なることが見出された。これまでは中枢神経系幹細胞と分化能の制限された前駆細胞は培養下や生体内での分化能の差異などから概念的に想定されていたものであった。今回新たに発見された activin A 反応能の差異は、両者の違いを具体的に説明する新たな視点になる可能性がある。現在、この現象に分子的基盤を与えるため免疫蛍光抗体法や RT-PCR 法を用いて、レセプター、細胞内メッセンジャー、分化特異的転写因子の発現について検討中である。

D. 結論 マウス中枢神経系前駆株 (MEB5, AP-16) の性状を検討した。両細胞はヘリックス・ループ・ヘリックス型転写制御因子である *Mash-1*、*NeuroD* および *neurogenin* の mRNA を発現しており、*Mash-1* の mRNA は、分化誘導にともない発現が消失した。TGF- β ファミリーに属するサイトカインである BMP4/7、TGF- β 1 および TGF- β 2 は両細胞に対し、アストロサイトに分化を誘導する活性を示した。activin A は、AP-16 細胞の分化を誘導したが、MEB5 細胞に対しては分化を誘導せず、両細胞間で反応性の違いがあることがわかった。以上の結果から、MEB5 細胞と AP-16 細胞は中枢神経系前駆細胞の分化を制御する遺伝子や因子を解析する上で有用な研究材料となりうることを示された。

E. 研究発表 該当なし