

別添 2

厚生科学研究費補助金

脳科学研究事業

神経幹細胞を用いた神経再生・修復のための基盤技術の開発に関する研究

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 中福 雅人

平成13(2001)年3月

目 次

I. 総括研究報告書

神経幹細胞を用いた神経再生・修復のための基盤技術の開発に関する研究
中福雅人

II. 分担研究報告

1. 神経幹細胞の増殖・分化の分子機構に関する研究
中福雅人

2. 神経幹細胞の生存維持の分子機構に関する研究
後藤由季子

3. 神経幹細胞の自己複製能維持機構に関する研究
島崎琢也

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

神経幹細胞を用いた神経再生・修復のための基盤技術の開発に関する研究

主任研究者 中福雅人 東京大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨：神経組織の変性を阻止し修復するための治療法を開発することを目的に、増殖能と多分化能を持つ神経幹細胞について分子レベルでの解析をおこなった。その結果、神経幹細胞の長期生存維持に Notch および gp130 受容体を介したシグナル伝達機構が重要な役割を果たすことを明らかにし、また成体脊髄に残存する神経幹細胞・前駆細胞の増殖能、分化能、再生能を明らかにした。

A. 研究目的

急速な高齢化社会を向かえた我が国では、神経変性疾患、痴呆性疾患などの困難な神経疾患が、現在大きな社会問題となっており、有効な治療法の開発が急務である。本研究の目的は、増殖能と多分化能を持つ神経幹細胞・前駆細胞を用いて、神経組織の変性を阻止し修復するための治療法を開発するにあたり、その理論的、技術的な基盤を確立することにある。

B. 研究方法

神経系疾患のモデル系として汎用されているラットおよびマウスを用いて、胎生期あるいは成体神経組織より神経幹細胞・前駆細胞を単離し、培養した。トランスフェクション法あるいはレトロウイルス感染法により遺伝子操作をおこない、神経幹細胞・前駆細胞の増殖、分化、生存維持に働く種々の機能分子の生理機能を試験管内で解析した。また、特異的分子マーカーに対する抗体を用いた免疫組織化学染色法により、神経幹細胞・前駆細胞の遺伝子発現、増殖、分化の動態を個体レベルで解析した。一部の解析では、脊髄切断損傷モデルラットおよび gp130 受容体遺伝子欠損マウスを用いた解析をおこなった。

C. 研究結果

まず、主任研究者の中福は、成体に残存する神経幹細胞・前駆細胞の性質を詳細に解析した。その結果、成体脊髄においては、従来考えられていた中心管周囲のみならず実質部にも多数の神経幹細胞・前駆細胞が残存していることを見いだした。さらに、この実質部の神経幹細胞・前駆細胞は損傷に応答して個体内で増殖し、組織の修復機転に関与することを実験的に初めて明らかにした。しかし、損傷脊髄内では、神経幹細胞・前駆細胞からのニューロンの新生は観察されなかった。この前駆細胞からのニューロン新生を抑制する機構として、Notch 受容体を介したシグナル伝達系が関与することを明らかにした。以上の知見により、ニューロン新生の制限機構を何らかの手法により修飾することで、内在性の神経幹細胞・前駆細胞の持つ潜在的な再生能を高め、損傷組織の再生・修復を促す画期的な治療法の開発に向けた足がかりが得られた。

一方、分担研究者の後藤は、中福との共同研究により、これまでほとんど明らかになっていない神経幹細胞・前駆細胞の生存維持に関わる分子機構について、特に細胞内シグナル伝達の観点から解析を進めた。その結果、マウス胎児終脳の神経幹細胞において、Notch シグナル伝達系が生存促進的に働くことを明らかにした。すなわち、神経幹細胞の培養系において恒常活性化型の Notch 細胞内ドメイン断片を発現すると、細胞の生存率が上昇した。さらにこの際、アポトーシスシグナルの中心分子であるカスパー3の活性化が抑制されていることを見いだした。これらの知見は、神経幹細胞・前駆細胞の生存維持の新しい制御機構を明らかにした点で重要な成果である。また、分担研究者の島崎は、神経幹細胞・前駆細胞が長期にわたり維持されている機構に着目し、解析をおこなった。その結果、マウス成体終脳に存在する神経幹細胞の維持に、Class I サイトカインレセプターの共通サブユニットである gp130 を介したシグナルが関与していることを発見した。gp130 の細胞質内ドメインを欠失させたマウス変異体のヘテロ接合体の成体終脳脳室周囲における神経幹細胞の数を Neurosphere 形成法によって調べたところ、生後1年のマウスでは、野生型マウスに比べてその数が75%減少していた。一方、gp130 を介したシグナルの伝達因子である Gab1 の欠失変異体のヘテロ接合体においては逆に神経幹細胞の数が倍増していた。このことから、神経幹細胞の長期維持に gp130 シグナルが必要であり、Gab1 はその負のフィードバック制御に関与していることが明らかとなった。

D. 考察

成体脊髄内に内在する神経前駆細胞は、胎児由来前駆細胞と多くの共通した転写制御因子を発現していることから、その増殖、分化の制御には、発生期と同様の機構が働いていることが強く示唆された。さらに組織内では、損傷に応答して神経前駆細胞が増殖し、また特異的な転写因子を発現することから、内在性の前駆細胞は組織の修復機転に関与することが示唆された。しかし、これら前駆細胞は培養下にはニューロンへと分化する能力を持つにも関わらず、生体内ではニューロンの

新生は観察されなかった。従って、損傷組織の外界環境は神経前駆細胞のニューロン分化に対して阻害的に働いており、このことが損傷脊髄の再生能が低い要因となっていると考えられた。

回日本細胞生物学会大会 (2000)

H. 知的所有権の取得状況
なし

F. 健康危険情報
特になし

E. 結論

本年度の研究結果により、成体神経組織に残存する神経幹細胞・前駆細胞について、これまでほとんど不明のままであった実際の残存数や分布、潜在的な再生能力といった基本的な性質が明らかとなってきた。また、生涯にわたって神経幹細胞・前駆細胞が維持される機構の分子レベルでの理解が大きく進んだ。これらの知見は、神経幹細胞・前駆細胞の治療法への応用に当たり、その理論的、技術的な基盤として極めて重要な成果である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 中福雅人 神経幹細胞-脳再生医学への応用 脳神経外科の最先端 NO.2 先端医療技術研究所, 192-199 (2000).
- 2) 鶴田文憲、増山典久、誤答由季子 生存シグナルとアポトーシスシグナルのクロストーク 実験医学, 18, 1348-1390 (2000)
- 3) Takebayashi H, Yoshida S, Kominami R, Nakafuku M, Nabeshima Y. Dynamic expression of basic helix-loop-helix Olig family members: implication of Olig2 in neuron and oligodendrocyte differentiation and identification of a new member, Olig3. *Mech. of Dev.* 99, 143-148 (2000).
- 4) Ura, S., Masuyama, N., Graves, J. and Gotoh, Y. MST1-JNK promotes apoptosis via caspase-dependent and -independent pathways. *Genes to Cells*. in press (2001)
- 5) Nakamura, Y., Sakakibara S., Miyata, T., Ogawa, M., Shimazaki, T., Weiss, S., Kageyama, R. and Okano, H. The bHLH gene Hes 1 as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells. *J. Neurosci.* 20, 283-293 (2000)

2. 学会発表

- 1) 中福雅人 脳神経系の幹細胞とその分化制御 第63回日本生化学会シンポジウム (2000)
- 2) 中福雅人 脳の発生から再生へー神経幹細胞の分子生物学 第43回日本神経化学会シンポジウム (2000)
- 3) 鎌倉幸子、大石康二、増山典久、川口綾乃、岡野栄之、中福雅人、後藤由季子、哺乳類神経系前駆細胞の生存維持機構の解析、第23回日本分子生物学会年会 (2000)
- 4) 大石康二、鎌倉幸子、増山典久、後藤由季子、神経幹細胞の生存機構の解析、第53

神経幹細胞の増殖・分化の分子機構に関する研究

主任研究者 中福雅人 東京大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨：成体ラット脊髄に内在する神経幹細胞・前駆細胞について、その性質を分子レベルで詳細に解析した。その結果、成体脊髄内の神経前駆細胞が、培養下および個体内で胎児由来細胞と同様に多くの転写制御因子を特異的に発現することが明らかになった。

A. 研究目的

近年、成体神経組織内に神経幹細胞・前駆細胞が存在することが明らかとなり、再生医学の点から注目を集めている。損傷組織の再生・修復には、前駆細胞を移植する手法とともに、内在前駆細胞の活性化によって組織の再生能を高める手法が考えられる。いずれの場合も、成体幹細胞・前駆細胞の性質を明らかにすることが不可欠であるが、従来の研究では多くの点が不明のままであった。本研究では、成体ラット脊髄に内在する神経前駆細胞の性質を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

成熟ラットの脊髄より神経前駆細胞を単離し、Neurosphere法を用いて培養した。成体前駆細胞に発現する分化制御因子群について、胎児由来細胞と比較した。また、胸髄レベルで脊髄を完全切断した損傷モデルを作製し、内在性の神経前駆細胞の挙動を、種々の分子マーカーを用いた組織染色により解析した。以上の実験動物の使用にあたっては、学内実験動物取扱規定を遵守した。

C. 研究結果

成体脊髄組織に内在する神経前駆細胞の増殖、分化を効率よく再現する初代培養系を確立した。成体前駆細胞は約8週間にわたって増殖能を維持し、またニューロン、グリアへの分化能を保持していた。また、特異抗体を用いた免疫染色により、胎児脊髄由来の前駆細胞と同様に、その増殖・分化の過程で多くのホメオドメイン型 (Pax6, Pax7, Nkx2.2, Prox1) ならびに bHLH 型 (Mash1, Ngn2, NeuroD1, Olig2) の転写因子を特異的に発現することが明らかとなった。

次に、胸髄切断モデルラットを用いた個体レベルでの解析を行った。損傷脊髄内では、実質に存在する多数の前駆細胞が反応性に増殖していた。これらの細胞は、前駆細胞の特異的分子マーカーであるネスチンおよび転写因子 Pax6, Pax7, Nkx2.2 を一過的に発現することが明らかとなった。しかし、損傷組織内での bHLH 型転写因子の発現は検出されず、またニューロンの新生を示す所見も得られなかった。

D. 考察

成体脊髄内に内在する神経前駆細胞は、胎児由来前駆細胞と多くの共通した転写制御因子を発現していることから、その増殖、分化の制御には、発生期と同様の機構が働いていることが強く示唆された。さらに組織内では、損傷に反応して神経前駆細胞が増殖し、また特異的な転写因子を発現することから、内在性の前駆細胞は組織の修復機転に関与する

ことが示唆された。しかし、これら前駆細胞は培養下にはニューロンへと分化する能力を持つにも関わらず、生体内ではニューロンの新生は観察されなかった。従って、損傷組織の外界環境は神経前駆細胞のニューロン分化に対して阻害的に働いており、このことが損傷脊髄の再生能が低い要因となっていると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

E. 結論

成体脊髄内の神経前駆細胞は、胎児由来細胞と同様の分子機構によって制御されていることが示唆された。今後は生体内で前駆細胞からのニューロン新生を阻害している環境要因を明らかにし、それを克服することによって、成体神経組織の再生能を高める手法の開発に繋げていきたいと考えている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takebayashi H, Yoshida S, Kominami R, Nakafuku M, Nabeshima Y. Dynamic expression of basic helix-loop-helix Olig family members: implication of Olig2 in neuron and oligodendrocyte differentiation and identification of a new member, Olg3. *Mech. of Dev.* 99, 143-148 (2000).
- 2) Yamamoto S, Yamamoto N, Kitamura T, Nakamura K, Nakafuku M. Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. *submitted for publication.*
- 3) Yamamoto S, Nagao M, Kitamura T, Nakatomi H, Sugimori M, Kosako H, Yamamoto N, Takebayashi H, Yoshida S, Weinmaster G, Nakamura K, Nakafuku M. Molecular property and regenerative potential of neural progenitors in the adult rat spinal cord. *submitted for publication.*
- 4) 中福雅人 神経幹細胞—脳の再生医学への応用 脳神経外科の最先端 NO.2 先端医療技術研究所, 192-199 (2000).

2. 学会発表

- 1) 中福雅人 脳神経系の幹細胞とその分化制御 第63回日本生化学会シンポジウム (2000)
- 2) 中福雅人 脳の発生から再生へ—神経幹細胞の分子生物学 第43回日本神経化学会シンポジウム (2000)

H. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

神経幹細胞の生存維持の分子機構に関する研究

分担研究者 後藤由季子 東京大学分子細胞生物学研究所 助教授

研究要旨 マウス胎児終脳の神経幹細胞の生存に、細胞間相互作用に関わる Notch を介したシグナルが関与していることを見いだした。

A. 研究目的

胎児神経幹細胞の生存維持を可能にしている分子メカニズムの解明

F. 健康危険情報
特になし。

B. 研究方法

マウス胎児終脳神経上皮の培養系に各シグナル伝達分子を発現し、その生存維持への効果を検討する。細胞の生死は核の凝集の有無で判定した。

G. 研究発表

(倫理面への配慮)

本報告書の内容にはヒトを用いた研究は含まれない。マウスを用いた研究は、東京大学動物実験指針に従って行われた。

1. 論文発表

Ura, S., Masuyama, N., Graves, J. and Gotoh, Y. MST1-JNK promotes apoptosis via caspase-dependent and -independent pathways. *Genes to Cells*. in press (2001)

Kawasaki, H., Fujii, H., Gotoh, Y., Morooka, T., Shimohama, S., Nishida, E. and Hirano, T. (1999) Requirement for mitogen-activated protein kinase in cerebellar long term depression. *J. Biol. Chem.* 274, 13498-13502.

C. 研究結果

マウス胎児終脳由来神経上皮培養系に、Notch 細胞内ドメインを発現すると、細胞の生存率が上昇することが明らかになった。この時、アポトーシスシグナルの中心分子であるカスパーゼ 3 の活性化が抑制されていた。また、Notch の下流で活性化する転写因子 RBP-J、あるいは RBP-J の制御下で転写誘導される Hes1, Hes5 を発現した場合には、生存促進効果は認められなかった。更に、Notch による生存促進効果は、優性阻害型 RBP-J によって阻害されなかった。

2. 学会発表

哺乳類神経系前駆細胞の生存維持機構の解析、鎌倉 幸子、大石 康二、増山 典久、川口 綾乃、岡野 栄之、中福 雅人、後藤 由季子、第 23 回日本分子生物学会年会（神戸市）

神経幹細胞の生存機構の解析、大石 康二、鎌倉 幸子、増山 典久、後藤 由季子、第 53 回日本細胞生物学会大会（福岡市）

D. 考察

上記の結果から、神経幹細胞において Notch が生存促進的に働くことが明らかになった。これまで Notch の下流シグナルとして RBP-J-Hes 経路が神経分化抑制に働くことが知られていたが、RBP-J-Hes 経路は Notch の生存促進作用においては関与していない可能性が示唆された。

E. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし

2. 実用新案登録 特になし

3. その他 特になし

E. 結論

Notch は神経幹細胞の生存を促進し、この時神経分化抑制とは異なるシグナル伝達を介する。

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

神経幹細胞の自己複製能維持機構に関する研究

分担研究者 島崎琢也 大阪大学大学院医学系研究科 助手

研究要旨 マウス成体終脳に存在する神経幹細胞の維持に Class I サイトカインレセプターの共通サブユニットである gp130 を介したシグナルが関与していることを発見した。

A. 研究目的

成体神経幹細胞の長期維持を可能にしているシステムの解明

B. 研究方法

マウス gp130 遺伝子および gp130 シグナルの伝達因子のうちの1つである Gab1 遺伝子を欠失したマウスのヘテロ接合体の成体終脳の神経幹細胞の数およびその性質を浮遊培養系を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本報告書の内容にはヒトを用いた研究は含まれない。マウスを用いた研究は、大阪大学動物実験指針に従って行われた。

C. 研究結果

まず、gp130 の細胞質内ドメインを欠失させたマウス変異体のヘテロ接合体の成体終脳脳室周囲における神経幹細胞の数を Neurosphere 形成法によって調べた。その結果、生後1年のマウスでは、野生型マウスに比べてその数が75%減少していた。これは gp130 と会合する他のレセプターサブユニットを利用するサイトカインシグナルも神経幹細胞の維持に関与していることが示唆された。一方、gp130 を介したシグナルの伝達因子である Gab1 の欠失変異体のヘテロ接合体においては逆に神経幹細胞の数が倍増していた。

D. 考察

上記の結果から、神経幹細胞の長期維持に gp130 シグナルが必要であり、Gab1 はその負のフィードバック制御に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

gp130 を介したサイトカインシグナルは神経幹細胞の維持に必要であり、Gab1 はそれを負に制御する。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakamura, Y., Sakakibara S., Miyata, T., Ogawa, M., Shimazaki, T., Weiss, S., Kageyama, R. and Okano, H. The bHLH gene Hes 1 as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells. *J Neurosci.* 20:283-293, 2000.

Nishino, J., Mochida, K., Ohfuji, Y., Shimazaki, T., Meno, C., Ohishi, S., Matsuda, Y., Fujii, H., Saijoh, Y. and Hamada, H. GFR alpha3, a component of the artemin receptor, is required for migration and survival of the superior cervical ganglion. *Neuron* 23: 725-736, 1999.

Shimazaki, T., Arsenijevic, Y., Ryan, AK., Rosenfeld, MG. and Weiss, S. A role for the POU-III transcription factor Brn-4 in the regulation of striatal neuron precursor differentiation. *EMBO J.* 18: 444-456, 1999.

2. 学会発表

特になし

E. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし

2. 実用新案登録 特になし

3. その他 特になし

別添 6

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
中福雅人	神経幹細胞ー脳の再生医学への応用	高倉公朋	脳神経外科の最先端 NO.2	先端医療技術研究所	東京	2000	192-199

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Takebayashi H. et al.	Dynamic expression of basic helix-loop-helix Olig family members: implication of Olig2 in neuron and oligodendrocyte differentiation and identification of a new member, Olig3.	Mech. of Dev.	99	143-148	2000
Ura, S. et al.	MST1-JNK promotes apoptosis via caspase-dependent and -independent pathways.	Genes to Cells		in press	2000
Nakamura, Y. et. al.	The bHLH gene Hes 1 as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells.	J. Neurosci.	20	283-293	2000

20000444

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。