

厚生科学研究費補助金  
脳科学研究事業（H12 脳-011）

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13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中福 雅人

平成14（2002）年3月

200/0422

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13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中福 雅人

平成14（2002）年3月

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：神経幹細胞・前駆細胞の生存促進・長期維持の分子機構の一端を明らかにした。また、成体神経組織に存在する神経前駆細胞を操作することにより、外傷性損傷後の脊髄、あるいは虚血損傷後の海馬において、ニューロン新生を誘導する手法を開発した。本研究により、種々の神経疾患に対する神経幹細胞を用いた新しい再生誘導療法の開発に道が開けた。

## 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、痲痺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は、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。また特定の遺伝子を欠損した変異マウスや疾患モデルラットを用いた解析をおこなった。尚、実験動物の使用にあたっては全て学内実験動物取扱規程を遵守した。

## C. 研究結果

2年目にあたる平成13年度では、主任研究者の中福が脊髄切断損傷ラット、海馬虚血損傷ラット等の解析を中心に、また分担研究者の後藤、島崎は神経幹細胞に関する分子レベルでの解析を集中的におこなった。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、さらに、それらが損傷に応答して増殖し、組織の修復機能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およびBMP、CNTF等のサイトカインシグナル伝達系が関与することを明らかにした。そこで、この抑制シグナルを解除するため、ニューロン誘導活性を持つ転写因子Ngn2を損傷組織内の神経前駆細胞に強制発現させたところ、ニュー

ロンの新生を誘導し得た。現在、この新生ニューロンによる脊髄機能の回復を目指した研究を進めている。中福はさらに、成体脳内の神経前駆細胞の再生能を明らかにするため、一過性全脳虚血ラットをモデルとした解析をおこなった。虚血損傷に応答して脳内の神経前駆細胞は増殖、移動、分化し、特に海馬領域ではCA1錐体ニューロンを一部再生することを見出した。さらに、脳室内への増殖因子の投与により内在前駆細胞の増殖を亢進させ、海馬ニューロンの再生を著明に促進することに成功した。最適条件では、損傷後1日(ほぼ全てが死滅するCA1錐体ニューロンを、虚血後1ヶ月で正常レベルの40%程度まで再生させることが可能であった。この再生ニューロンはシナプス形成を介して既存の神経回路に組み込まれ、虚血によって傷害される海馬依存的な空間学習・記憶機能の回復に貢献していることを明らかにした。

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解析を進め、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、マウス胎児終脳由来神経上皮培養系において、Notch細胞内ドメインを発現すると生存促進するが、この時RAMドメイン周辺領域が欠失したNotchでは生存促進活性が観察されなかった。また、Notchの同じ領域に依存してNHKの活性化と幾つかのBcl-2ファミリーメンバーの誘導が起こることが明らかになった。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際に、RAMドメイン周辺領域が重要であることが明らかになった。

また、分担研究者の島崎は、神経幹細胞の増殖因子であるEGFのレセプターの下流で働くシグナル伝達分子であり、MAP kinase経路の活性化に関与しているGablの欠失変異体マウスにおける神経幹細胞の動態を解析した。その結果、Gablのホモ欠失変異体(gab<sup>-/-</sup>)では、胎生14日目の線系体由来神経幹細胞のEGFに対する反応性が消失していることを見出した。また、オリゴデンドロサイト前駆細胞の減少が観察された。さらに、ヘテロ欠失変異体(gab<sup>+/-</sup>)の成体の側脳室周囲に存在している神経幹細胞の数が野生型に比べて約80%増加していた。また、gp130を介したシグナルによってその発現が亢進されるGFAPの発現は、生後7日目の脊髄および成体脳で低下していた。以上の結果から、Gablが主に生後から成体に至るまでの神経幹細胞の維持

に負に作用しており、胎生期では主にオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化増殖あるいは生存に必要であると考えられた。

#### D. 考察

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といった基本的な性質が明らかとなってきた。また、これまでほとんど明らかにされていなかった神経幹細胞・前駆細胞の生存維持機構について、幾つかの重要な知見が得られた。さらに、再生医療の観点から最も重要な成果として、虚血損傷後の海馬ニューロンの再生誘導による脳機能の回復に成功した。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と考えている。

#### E. 結論

動物モデルを用いて、内性神経前駆細胞の活性化による損傷神経組織の機能的再生をおこなう、新たな再生治療法の可能性を開いた。

#### F. 健康危険情報 特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Mizuguchi R, Sugimori M, Takebayashi H, Kosako H, Nagao M, Yoshida S, Nabeshima Y, Shimamura K, Nakafuku M. (2001) Combinatorial roles of Olig2 and Neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron* 31, 757-771.
- 2) Yamamoto S, Yamamoto N, Kitamura T, Nakamura K, Nakafuku M. (2001) Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 172, 115-127.
- 3) Yamamoto N, Yamamoto S, Inagaki F, Kawauchi M, Fukunizu A, Kishi N, Matsuno K, Nakamura K, Weinmaster G, Okano H, Nakafuku M. (2001) Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 45031-45040.
- 4) Yamamoto S, Nagao M, Sugimori M, Kosako H, Nakatomi H, Yamamoto N, Takebayashi H, Nabeshima Y, Kitamura T, Weinmaster G, Nakamura K, Nakafuku M. (2001) Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 21, 9814-9823.
- 5) Kato M, Seki N, Sugano S, Hashimoto K, Masuho Y,

- Muramatsu M, Kaibuchi K, Nakafuku M. (2001) Identification of Sonic hedgehog-Responsive Genes by Using cDNA Microarray. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 472-478.
- 6) Kobayashi D, Kobayashi M, Ogura T, Nakafuku M, Shimamura K. (2002) Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals. *Development* 129, 83-93.
  - 7) Imai T, Tokunaga A, Yoshida T, Hashimoto M, Mikoshiba K, Weinmaster G, Nakafuku M, Okano H. (2001) The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates the *m-namb* gene expression by interacting with its mRNA. *Mol. Cell Biol.* 21, 3888-3900.
  - 8) Nakashima K, Takizawa T, Ochiai W, Yanagisawa M, Hisatsune T, Nakafuku M, Miyazono K, Kishimoto T, Kagiyama R, Taga T. (2001) BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 5868-5873.
  - 9) Fu H, Qi Y, Tan M, Cui J, Takebayashi H, Nakafuku M, Richardson W, Qiu M. (2002) Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of Olig2 and Nfix2.2 in the control of oligodendrocyte differentiation. *Development* 129, 681-693.
  - 10) Kamimori K, Machide M, Tomita K, Nakafuku M, Kohsaka S. Cell-type specific expression of protein tyrosine kinase-related receptor RYK in the central nervous system of the rat. *Mol. Brain Res.* 2002; *in press*.
  - 11) Heins N, Malatesta P, Cocconi F, Nakafuku M, Tucker K L, Hack M A, Chapouton P, Baulieu Y-A, Gisz M. Glial cells generate neurons: The role of the transcription factor Pax6. *Nat. Neurosci.* 2002; *in press*.
  - 12) Higuchi M, Masuyama N, Suzuki A, and Gotoh Y. (2001) Akt mediates Rac/Cdc42-Regulated Cell Motility in Growth Factor-Stimulated Cells and in Invasive PTEN-Knockout Cells. *Curr. Biol.* 11, 1958-1962.
  - 13) Morishima, Y., Gotoh, Y., Barrett, T., Takano, H., Davis, R.J., Shirasaki, Y. and Greenberg, M.E. (2001)  $\beta$ -amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fts ligand. *J. Neurosci.* 21,7551-7560.

- 14) Masuyama, N., Oishi, K., Mori, Y., Ueno, T., Takahama, Y. and Gotoh, Y. (2001) Akt Inhibits the Orphan Nuclear Receptor Nur77 and T cell Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 32799-32805.
- 15) Ura, S., Masuyama, N., Graves, J. and Gotch, Y. (2001) Caspase Cleavage of MST1 Promotes Nuclear Translocation and Chromatin Condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10148-10153.
- 16) Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, Taga T, Okano H, Hata J, Umezawa A. (2001) Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* 68, 235-244.
- 17) Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. (2001) Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci.* 21, 9733-9743.
- 18) Shimazaki T, Shingo T, Weiss S. (2001) The ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/gp130 receptor complex operates in the maintenance of mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci.* 21, 7642-7653.
- 19) Represa A, Shimazaki T, Simmonds M, Weiss S. (2001) EGF-responsive neural stem cells are a transient population in the developing mouse spinal cord. *Eur J Neurosci.* 14, 452-462.
2. 学会発表
- 1) Nakafuku M. Molecular biology of neural stem cells: generation and regeneration of specific neuronal subtypes in the embryonic and adult brain. In: The 4th Annual Meeting of the Korean Society for Brain and Neural Sciences. 2001 (Seoul) 招待講演
- 2) Nakafuku M. Generation of specific neuronal subtypes in the embryonic and adult nervous system: Mechanisms and implications. In: The Laudat Conference on: Neural stem cells: From development to the Clinic. (organized by INSERM, France) 2002 (Aix-Les-Bains) 招待講演
- 3) Nakafuku M. Adult neural progenitors and their latent regenerative potential in the spinal cord. In: Motor neuron development and Antynotrophic lateral Sclerosis. (organized by the ALS Association, the USA) 2002 (Boston) 招待講演
- 4) 中富浩文、山本真一、杉森道也、川原信隆、桐野高明、中福雅人 成体脳に内在する神経幹細胞、前駆細胞の動態解析 - 中枢神経組織の再生を目指して - 日本脳外科学会総会 2001 (岡山)
- 5) 加藤真樹、中福雅人、菅野純夫、橋本雄之、村松正明、増保安彦、貝瀬弘三、関直彦 領域特異的転写制御因子群による発育期脳における特異的神経回路形成の制御機構 第24回日本分子生物学会 2001 (横浜)
- 6) 水口留美子、杉森道也、小迫英尊、竹林浩秀、吉田松生、鍋島陽一、中福雅人 Olig2 と Neurogenin2 の運動ニューロン発生における協調的役割 第24回日本分子生物学会 2001 (横浜)
- 7) 長尾元史、山本真一、北村俊雄、中福雅人 Notch シグナルによる神経幹細胞の増殖と分化の制御機構の解析 第24回日本分子生物学会 2001 (横浜)
- 8) 哺乳類神経系前駆細胞の生存維持機構の解析、大石康二、鎌倉 幸子、増山 典久、岡野 崇之、中福 雅人、後藤 由季子、第24回日本分子生物学会年会 (横浜市)
- 9) 神経系前駆細胞の生死の制御機構、後藤 由季子、大石康二、鎌倉 幸子、砂澤 裕子、増山 典久、Neuro2001 (京都市)
- 10) 島崎琢也、古崎崇仁、岡野崇之 E-S細胞由来中枢神経幹細胞の分化 第106回日本解剖学会総会・全国学術集会 2001 (高知)
- 11) 松本義人、長尾省吾、島崎琢也、岡野崇之 胚性幹細胞移植による記憶障害モデルマウスの機能回復の試み 日本脳外科学会総会 2001 (岡山)
- 12) 島崎琢也、岡野崇之 神経幹細胞の自己複製、長期維持、分化のメカニズム 第15回細胞生物学シンポジウム 2001 (大阪) 招待講演
- H. 知的所有権の出願・登録状況なし

## 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：成体神経組織に多数の神経前駆細胞が残存していることを明らかにした。また、外傷性損傷後の脊髄内で、内在性前駆細胞からのニューロン新生を誘導する手法を開発した。さらに、脳室内への増殖因子をより内在性前駆細胞を活性化し、虚血性損傷後の海馬において著明なニューロン再生を誘導する手法を開発した。本研究により、外傷性脊髄損傷、虚血性脳損傷をはじめとする種々の神経疾患に対する新しい再生誘導療法の開発に道が開けた。

## A. 研究目的

パーキンソン病を代表とする神経変性疾患に対する有効な治療法として、神経幹細胞の脳内移植法が期待されている。しかしながら、脳卒中、外傷など、比較的広範な領域の多様なニューロンが同時に傷害される疾患に対しては、細胞移植療法は必ずしも効果が期待できない。そこで本研究では、成体中枢神経組織に内在する神経幹細胞・前駆細胞を人為的に操作することにより損傷組織の修復をおこなう、新しい再生治療法の開発を目指している。

## B. 研究方法

種々の神経疾患モデルの作成が容易なラットを用いて、脊髄切断損傷および大脳海馬領域の虚血性損傷における内在性神経前駆細胞の再生能について検討した。成体に残存する神経前駆細胞を、特異的な転写因子の発現を指標として、免疫組織化学染色法により同定した。また、神経前駆細胞を neurosphere 法を用いて培養し、その性質を分子レベルで詳細に解析した。尚、実験動物の使用にあたっては全て学内実験動物取扱規定を遵守した。

## C. 研究結果

まず、神経前駆細胞が成体脊髄実質部に広範に存在していることを明らかにした。さらに、ラット胸髄完全切断モデルを用いた解析から、神経前駆細胞が損傷にตอบสนองして組織内で増殖することを見出した。しかし、損傷組織内では前駆細胞からのニューロン新生は観察されなかった。この組織内でのニューロン新生の制御機構に 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。さらに、この抑制を解除するために、ニューロン分化促進機能をもつ転写因子 Neurogenin2 を組み換えレトロウイルスを用いて脊髄内で強制発現させ、損傷組織内でニューロン新生を誘導することに成功した。

一方、成体脳内の神経前駆細胞の再生能を明らかにするために、一過性全脳虚血ラットをモデルとした解析をおこなった。虚血損傷にตอบสนองして脳内の神経前駆細胞は増殖、移動、分化し、特に海馬領域では CA1 錐体ニューロンを一部再生することを見出した。さらに、脳室内への増殖因子の投与により内在性前駆細胞の増殖を亢進させ、海馬ニューロンの再生を著明に促進することに成功した。麻酔条件では、損傷で一日ほぼ全てが死滅する CA1 錐体ニューロンを、虚血後1ヶ月で正常レベルの40%程度まで再

生させることが可能であった。この再生ニューロンはシナプス形成を介して既存の神経回路に組み込まれ、虚血によって傷害される海馬依存的な空間学習・記憶機能の回復に貢献していることを明らかにした。

## D. 考察

本研究により、成体に残存する神経前駆細胞の同定、制御機構といった、これまで不明のままであった基礎的かつ重要な課題について、分子レベルでの研究が大きく進んだ。また、外傷性脊髄損傷、虚血性脳損傷における内在性前駆細胞の挙動とその再生能に関する研究で、成果を得ることが出来た。これは国内外の他の研究に先駆けた大きな成果であると考える。

脳卒中、外傷、変性など、中枢神経系の疾患はいずれも現時点で根治的治療法のない難病である。本研究によって、成体中枢神経組織に内在する神経幹細胞・前駆細胞を人為的に操作することにより損傷組織の修復をおこなう、新しい再生誘導療法の開発に向けて大きな前進があったと考えている。

## E. 結論

動物モデルを用いて、内在性神経前駆細胞の活性化による損傷神経組織の機能的再建をおこなう、新たな再生治療法の可能性を開いた。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

## 1. 論文発表

1) Mizuguchi R, Sugimori M, Takebayashi H, Kosako H, Nagao M, Yoshida S, Nabeshima Y, Shimamura K, Nakafuku M. (2001) Combinatorial roles of Olig2 and Neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron* 31, 757-771.

2) Yamamoto S, Yamamoto N, Kitamura T, Nakamura K, Nakafuku M. (2001) Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 172, 115-127.

3) Yamamoto N, Yamamoto S, Inagaki F, Kawauchi M.

Fukamizu A, Kishi N, Matsuno K, Nakamura K, Weimaster G, Okano H, Nakafuku M. (2001) Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 45031-45040.

4) Yamamoto S, Nagao M, Sugimori M, Kosako H, Nakatomi H, Yamamoto N, Takebayashi H, Nabeshima Y, Kitamura T, Weimaster G, Nakamura K, Nakafuku M. (2001) Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 21, 9814-9823.

5) Kato M, Seki N, Sugano S, Hashimoto K, Masuho Y, Muramatsu M, Kaibuchi K, Nakafuku M. (2001) Identification of Sonic hedgehog-Responsive Genes by Using cDNA Microarray. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 289, 472-478.

6) Kobayashi D, Kobayashi M, Ogura T, Nakafuku M, Shimamura K. (2002) Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals. *Development* 129, 83-93.

7) Imai T, Tokunaga A, Yoshida T, Hashimoto M, Mikoshiba K, Weimaster G, Nakafuku M, Okano H. (2001) The neural RNA-binding protein Musashi1 translates the *m-numb* gene expression by interacting with its mRNA. *Mol. Cell Biol.* 21, 3888-3900.

8) Nakashima K, Takizawa T, Ochiai Y, Yanagisawa M, Hisatsune T, Nakafuku M, Miyazono K, Kishimoto T, Kagiyama R, Taga T. (2001) BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 5868-5873.

9) Fu H, Qi Y, Tan M, Cai J, Takebayashi H, Nakafuku M, Richardson W, Qiu M. (2002) Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of Olig2 and Nkx2.2 in the control of oligodendrocyte differentiation. *Development* 129, 681-693.

10) Kanimori K, Machide M, Tomita K, Nakafuku M, Kohsaka S. Cell-type specific expression of protein tyrosine kinase-related receptor RYK in the central nervous system of the rat. *Mol. Brain Res.* 2002; in press.

11) Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M, Tucker K L., Huck M A, Chapouton P, Barde Y-A, Götz M. Glial cells generate neurons: The role of the transcription factor Pax6. *Nat. Neurosci.* 2002; in press.

## 2. 学会発表

1) Nakafuku M. Molecular biology of neural stem cells: generation and regeneration of specific neuronal subtypes in the embryonic and adult brain. In: The 4th Annual Meeting of the Korean Society for Brain and Neural Sciences. 2001 (Seoul) 招待講演

2) Nakafuku M. Generation of specific neuronal subtypes in the embryonic and adult nervous system: Mechanisms and implications. In: The Laudat Conference on: Neural stem cells: From development to the Clinic. (organized by INSERM, France) 2002 (Aix-Les-Bains) 招待講演

3) Nakafuku M. Adult neural progenitors and their latent regenerative potential in the spinal cord. In: Motor neuron development and Amyotrophic Lateral Sclerosis. (organized by the ALS Association, the USA) 2002 (Boston) 招待講演

4) 中育浩文、山本真一、杉森道也、川原信隆、樹野高明、中福雅人 成体脳に内在する神経幹細胞、前駆細胞の動態解析 -中脳神経組織の再生を目指して- 日本脳外科学会総会 2001 (岡山)

5) 加藤真樹、中福雅人、菅野純夫、橋本雄之、村松正明、増保安彦、貝瀬弘三、関直彦 領域特異的転写制御因子群による発生期脳における特異的神経回路形成の制御機構 第24回日本分子生物学学会 2001 (横浜)

6) 水口留美子、杉森道也、小迫英華、竹林浩秀、吉出松生、鍋島篤一、中福雅人 Olig2 と Neurogenin2 の運動ニューロン発生における協調的役割 第24回日本分子生物学学会 2001 (横浜)

7) 長尾元史、山本真一、北村俊雄、中福雅人 Notch シグナルによる神経幹細胞の増殖と分化の制御機構の解析 第24回日本分子生物学学会 2001 (横浜)

H. 知的所有権の出願・登録状況なし



## 神経幹細胞の生存機構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を促進する Notch の下流シグナルを解析し、NFκB および Bcl-2 ファミリーメンバーの関与を明らかにした。

## 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。

## B. 研究方法

マウス胎児終脳神経上皮的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およびカスパーゼの活性化で判定した。

## （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、東京大学動物実験指針に従って行われた。

## C. 研究結果

マウス胎児終脳由来神経上皮培養系において、Notch 細胞内ドメインを発現すると生存促進するが、この時 RAM ドメイン周辺領域を欠失した Notch では生存促進活性が観察されなかった。また、Notch の同じ領域に依存して NFκB の活性化と幾つかの Bcl-2 ファミリーメンバーの誘導が起こることが明らかになった。

## 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際に、RAM ドメイン周辺領域が重要であることが明らかになった。この領域依存的に Notch がいかなるメカニズムで生存促進するかを検討し、その生存シグナルに関与する分子の候補を幾つか見いだした。

## E. 結論

Notch は神経幹細胞の生存を RAM ドメイン周辺領域依存的に促進する。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

## 1. 論文発表

Figuchi, M., Masuyama, N., Suzuki, A. and Gotoh, Y. (2001) Akt mediates Rac/Cdc42-Regulated Cell Motility in Growth Factor-Stimulated Cells and in Invasive PTEN-Knockout Cells. *Curr. Biol.* 11, 1958-1962.Morishima, Y., Gotoh, Y., Barrett, T., Takano, H., Davis, R.J., Shirasaki, Y. and Greenberg, M.E. (2001)  $\beta$ -amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J. Neurosci.* 21, 7551-7560.Masuyama, N., Oishi, K., Mori, Y., Ueno, T., Takahama, Y. and Gotoh, Y. (2001) Akt Inhibits the Orphan Nuclear Receptor Nur77 and T cell Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 32799-32805.Ura, S., Masuyama, N., Graves, J. and Gotoh, Y. (2001) Caspase Cleavage of MST1 Promotes Nuclear Translocation and Chromatin Condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10148-10153.

## 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、大石 康二、鎌倉 幸子、増山 典久、岡野 栄之、中福 雅人、後藤 由季子、第 24 回日本分子生物学会年会（横浜市）

神経系前駆細胞の生死の制御機構、後藤 由季子、大石 康二、鎌倉 幸子、砂澤 裕子、増山 典久、Neuro2001（京都市）

## F. 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

## 神経幹細胞の長期維持機構に関する研究

分担研究者：島崎琢也 鹿野義孝 大阪大学医学部 助手

研究要旨 gp130 や EGF レセプターのシグナル伝達分子である Gab1 が神経幹細胞の維持だけでなくグリア細胞の発生を制御していることを明らかにした。本研究により、神経幹細胞の維持およびグリア細胞の発生を制御するシグナル伝達機構の一端が解明された。

## A. 研究目的

これまで、我々は IL-6, LIF, CNTF などの IL-6 ファミリーに共通のレセプターサブユニットである gp130 を介するシグナルが、特に生後から成体にかけての神経幹細胞の自己複製を促進していることを見出している。そこで本研究では、この gp130、そして神経幹細胞の mitogen である EGF のレセプターの下流で働くシグナル伝達分子であり、MAP kinase 経路の活性化に関与している Gab1 の欠失変異体マウスにおける神経幹細胞の動態を含めた中枢神経系発生を解析することによって、神経幹細胞の長期維持機構の本質に更に関連することを目的としている。

## B. 研究方法

Gab1 遺伝子を欠失したマウスの発生期における神経幹細胞とグリア細胞の発生を、neurosphere 法等の培養法を利用して細胞生物学的に、そして、特定の細胞系譜に特異的な転写因子等の免疫組織化学染色等によって組織学的に解析した。

## C. 研究結果

Gab1 のホモ欠失変異体 (gab<sup>-/-</sup>) は胎生 16 日目までに胎盤の発達異常により死亡してしまう故に、まず、胎生 14 日目の線条体における神経幹細胞の数を neurosphere 法によって野生型と比較したところ、顕著な差は見られなかったが、EGF に対する反応性は消失していた。また、この時期に現れ始めるオリゴデンドロサイト前駆細胞の数が減少していた。しかしながら、ニューロンの分化および生存に変化は見られなかった。さらに、ヘテロ欠失変異体 (gab<sup>+/-</sup>) の成体の脳室周囲に存在している神経幹細胞の数を、これも neurosphere 法によって調べたところ、野生型に比べて約 80% その数が増加していた。また、gp130 を介したシグナルによってその発現が促進される GFAP の発現は生後 7 日目の脊髄および成体脳でも低下していた。一方、これまで ubiquitous に発

現すると考えられていた Gab1 の中枢神経系の発生過程における発現を組織免疫化学染色によって確かめたところ、驚いたことに神経幹細胞が最も多く存在すると考えられる脳室周囲での発現が、生後 2 日目では非常に低く、それ以外の領域で強く発現していた。しかしながら、生後 19 日目および成体においては脳室周囲に強く発現していた。

## D. 考察

上記の結果から、Gab1 が主に生後から成体に至るまでの神経幹細胞の維持に負に作用しており、胎生期では主にオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化増殖あるいは生存に必要であることが示唆された。これらのことは、神経幹細胞の維持およびグリア細胞の発生を制御するシグナル伝達機構の一端を明らかにしているものと考えられ、今後、その全容を知るための大きな一歩であると思われる。

## E. 結論

gp130 や EGF レセプターを介したシグナルである Gab1 は神経幹細胞の維持や GFAP の発現を負に制御し、オリゴデンドロサイトの発生を正に制御する。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

## 1. 論文発表

1) Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, Taga T, Okano H, Hata J, Umehara A. (2001) Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* 68, 235-244.

2) Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S.

(2001) Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci.* 21, 9733-9743.

3) Shimazaki T, Shingo T, Weiss S. (2001) The ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/gp130 receptor complex operates in the maintenance of mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci.* 21, 7642-7653.

4) Represa A, Shimazaki T, Simmonds M, Weiss S. (2001) EGF-responsive neural stem cells are a transient population in the developing mouse spinal cord. *Eur J Neurosci.* 14, 452-462.

## 2. 学会発表

1) 島崎 琢也、古崎 崇仁、岡野 栄之 E S細胞由来中枢神経幹細胞の分化 第106回日本解剖学会総会・全国学術集会 2001(高知)

2) 松本 義人、長尾 省吾、島崎 琢也、岡野 栄之 胚性幹細胞移植による記憶障害モデルマウスの機能回復の試み 日本脳外科学会総会 2001(岡山)

3) 島崎 琢也、岡野 栄之 神経幹細胞の自己複製、長期維持、分化のメカニズム 第15回細胞生物学シンポジウム 2001(大阪) 招待講演

## 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

## 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

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Mizaguchi R. et al.	Combinatorial roles of Olig2 and Neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons.	Neuron	31	757-771	2001
Yamamoto S. et al.	Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord.	Exp. Neurol.	172	115-127	2001
Yamamoto S. et al.	Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord.	J. Neurosci.	21	9814-9823	2001
Yamamoto N. et al.	Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor.	J. Biol. Chem.	276	45031-45040	2001
Kato M. et al.	Identification of Sonic hedgehog-Responsive Genes by Using cDNA Microarray.	B.B.R.C.	289	472-478	2001
Imai T. et al.	The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates the <i>m-numb</i> gene expression by interacting with its mRNA.	Mol. Cell Biol.	21	3888-3900	2001
Nakashima K. et al.	BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrogliogenesis.	Proc. nat. Acad. Sci. USA	98	5868-5873	2001
Kobayashi D. et al.	Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals.	Development	129	83-93	2002
Fu H. et al.	Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of Olig2 and Nkx2.2 in the control of oligodendrocyte differentiation.	Development	129	681-693	2002
Kamimori K. et al.	Cell-type specific expression of protein tyrosine kinase-related receptor RYK in the central nervous system of the rat.	Mol. Brain Res.		in press	2002
Heins, N. et al.	Glial cells generate neurons: The role of the transcription factor Pax6.	Nat. Neurosci.		in press	2002
Ura S. et al.	The PI3K-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria.	Genes to Cells.	6	519-530	2001
Fujishiro M. et al.	MKK6/3 and p38 MAPK Pathway Activation is not Necessary for Insulin-Induced Glucose Uptake, but Regulates Glucose Transporter Expression.	J. Biol. Chem.	276	19800-19806	2001

Graves J.D. et al.	Both phosphorylation and caspase-mediated cleavage contribute to regulation of the Ste-20-like Protein Kinase Mst1 during CD95/Fas-induced apoptosis.	J. Biol. Chem.	276	14909-14915	2001
Ura S. et al.	Caspase Cleavage of MST1 Promotes Nuclear Translocation and Chromatin Condensation.	Proc.Natl. Acad.Sci. USA	98	10148-10153	2001
Masuyama N. et al.	Akt Inhibits the Orphan Nuclear Receptor Nur77 and T cell Apoptosis.	J. Biol. Chem.	276	32799-32805	2001
Morishima Y. et al.	$\beta$ -amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand.	J. Neurosci.	21	7551-7560	2001
Higuchi M. et al.	Akt mediates Rac/Cdc42-Regulated Cell Motility in Growth Factor-Stimulated Cells and in Invasive PTEN-Knockout Cells.	Curr. Biol.	11	1958-1962	2001
Tsuruta F. et al.	The PI3K-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria.			in press	2002
Kobayama J. et al.	Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent.	Differentiation	68	235-244	2001
Shimazaki T. et al.	The ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/gp130 receptor complex operates in the maintenance of mammalian forebrain neural stem cells.	J. Neurosci.	21	7642-7653	2001
Shingo T. et al.	Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells.	J. Neurosci.	21	9733-9743	2001
Repreas A. et al.	EGF-responsive neural stem cells are a transient population in the developing mouse spinal cord.	Eur. J. Neurosci.	14	452-462	2001

20010622

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。