

200500165A

厚生労働科学研究費補助金  
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「成体脳に内在する神経幹細胞の賦活化に関する開発的研究」

平成 17 年度

総括・分担研究報告書

主任研究者 高坂 新一

平成 18 年 (2006 年) 3 月

# 目 次

<b>I. 総括研究報告書</b>	
成体脳に内在する神経幹細胞の賦活化に関する開発的研究 .....	1
高坂 新一（国立精神・神経センター神経研究所）	
<b>II. 分担研究報告書</b>	
1. 成体神経幹細胞の賦活化を指標とした NMDA 受容体阻害剤 .....	5
の探索ならびにその分子基盤の解明	
高坂 新一（国立精神・神経センター神経研究所）	
2. 成体脳神経幹細胞の分化増殖を制御する G 蛋白共役型受容体 .....	7
リガンドの探索	
和田 圭司（国立精神・神経センター神経研究所）	
3. 成体脳神経幹細胞の増殖、分化、シナプス新生に関する .....	9
形態学的基盤の解析	
湯浅 茂樹（国立精神・神経センター神経研究所）	
<b>III. 研究成果の刊行に関する一覧表</b> .....	11
<b>IV. 研究成果の刊行物・別刷</b> .....	15

# Ⅰ. 総括研究報告書

成体脳に内在する神経幹細胞の賦活化に関する開発的研究

主任研究者 高坂 新一 国立精神・神経センター神経研究所 所長

研究要旨：本研究では、再生医療に基づいた新たな治療手段として、内在性神経幹細胞を賦活化させる低分子化合物の薬剤開発を目的としている。そのため、神経幹細胞の分裂や増殖、分化に関わるとされる NMDA 受容体や神経幹細胞に特異的に発現している G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) に焦点をあて、そのリガンドにおける薬理効果を検討した。その結果、NMDA 受容体阻害剤であるメマンチンが、海馬歯状回における内在性の神経幹細胞の増殖を亢進させることを確認した。また、成体脳内の神経幹細胞およびその周囲に存在する環境因子の受容体として発現が高いと考えられる GPCR を 34 個同定し、そのうち 10 種類の GPCR リガンドがニューロスフェアの増殖や運動性を亢進させることが判明した。さらに増殖した神経幹細胞からの神経新生を形態学的に解析するため、転写因子である Pax6 に着目し、神経前駆細胞の動態を解析する手法を開発した。

(分担研究者)

和田圭司： 国立精神神経センター神経研究所  
疾病研究第四部 部長  
湯浅茂樹： 国立精神神経センター神経研究所  
微細構造研究部 部長

A. 研究目的

パーキンソン病を代表とする神経変性疾患では、脳内の特定の部位におけるニューロンが変性脱落することにより重篤な機能障害が生じることが知られている。これら神経難病とも言える神経変性疾患の治療としては、主に薬剤を中心とした対象療法が行われているが、治療効果には限界があるのが現状である。そこで、本研究では、再生医療に基づいた新たな治療手段として、より効率的かつ安全と考えられる内在性神経幹細胞を賦活化させる低分子化合物の薬剤開発を目的とする。そのため、成体脳内在性の神経幹細胞の分裂や増殖、分化に関わる分子（例えば、NMDA 受容体やその関連分子、G 蛋白質共役型受容体等）に着目しその分子基盤を解明するとともに、これらの分子を標的とする薬剤の開発を行う。

B. 研究方法

個々の研究方法に関しては、添付した分担研究報告書を参照されたい。

C. 研究結果および考察

1. 成体脳神経幹細胞の賦活化を指標とした NMDA 受容体阻害剤の探索ならびにその分子基盤の解明

欧米でアルツハイマー型認知症の治療薬として市販されているメマンチン（非競合的 NMDA 受容体阻害剤）を成体のマウスに投与することで、海馬歯状回における内在性の神経幹細胞の増殖が亢進することを確認した。また、CNS-1102（非競合的 NMDA 受容体阻害剤）を投与したマウス胎児の大脳皮質から cRNA プローブを調整し、マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った結果、CNS-1102 の投与で Delta1 等 Notch シグナル系に関わる分子の発現が亢進していたことから、脳発達期の NMDA 受容体は Notch シグナル系を介して神経幹細胞の増殖を制御している可能性が示唆された。

2. 成体脳神経幹細胞の分化増殖を制御する G

### 蛋白質共役型受容体リガンドの探索

定量的 RT-PCR を用いて、ニューロスフェアと側脳室周囲の神経幹細胞局在領域において発現が高い GPCR を 34 個同定した。さらに、ニューロスフェアを用いてこれらの GPCR に対するリガンドの薬理効果検討した結果、ニューロスフェアの増殖や運動性を亢進させる 10 種類の薬剤を見出した。

### 3. 成体脳神経幹細胞の増殖、分化、シナプス新生に関する形態学的基盤の解析

Pax6 は、海馬歯状回顆粒細胞下層において神経前駆細胞に発現しており、成熟神経細胞には発現していないことから、成体神経前駆細胞の新たなマーカーとなることを見出した。また、Pax6 遺伝子変異ラットを用いた形態解析から、Pax6 は成体脳における早期神経前駆細胞の維持ならびに引き続き起こる神経新生に重要であることが判明した。

#### D. 結論

NMDA 受容体阻害剤であるメマンチンを成体のマウスに投与することで、海馬歯状回における内在性の神経幹細胞の増殖が亢進することを確認した。また、脳発達期において、NMDA 受容体は Notch シグナル系を介して神経幹細胞の増殖を制御している可能性が示唆された。

成体脳内の神経幹細胞及びその周囲に存在する環境因子の受容体として発現が高いと考えられる GPCR を 34 個同定した。そのうち 10 種類のリガンドがニューロスフェアの増殖や運動性を亢進させることが判明した。

Pax6 は海馬歯状回 SGZ における神経前駆細胞のマーカー分子となり、その役割は分化過程を制御することが明らかになった。

#### E. 健康危険情報

特になし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(高坂新一)

Kamitori, K., Tanaka, M., Okuno-Hirasawa, T., and Kohsaka, S.: Receptor related to tyrosine kinase RYK regulates cell migration during cortical development. BBRC 330 (2005) 446-453

Hirasawa, T., Ohsawa, K., Imai, Y., Ondo, Y., Akazawa, C., Uchino, S. and Kohsaka, S.: Visualization of microglia in living tissues by using Iba1-EGFP transgenic mice. J. Neurosci. Res. 81 (2005) 357-362

Yogosawa, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I., Miyoshi, H., Kohsaka, S. and Akazawa, C.: Ubiquitylation and Degradation of Serum-inducible Kinase by hVPS18, a RING-H2 Type Ubiquitin Ligase. J. Biol. Chem. 280 (2005) 41619-41627

(和田圭司)

Sakurai, M., Ayukawa, K., Setsuie, R., Nishikawa, K., Hara, Y., Ohashi, H., Nishimoto, M., Abe, T., Kudo, Y., Sekiguchi, M., Sato, Y, Aoki, S. and Wada, K.: Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 regulates the morphology of neural progenitor cells and modulates their differentiation. J. Cell Sci. 119 (2006) 162-171

Fukazawa, N., Ayukawa, K., Nishikawa, K., Ohashi, H., Ichihara, N., Hikawa, Y., Abe, T., Kudo, Y., Kiyama, H., Wada, K. and Aoki, S.: Identification and functional characterization of mouse TPO1 as a myelin membrane protein. Brain Res. 1070 (2006) 1-14

(湯浅茂樹)

Maekawa, M., Takashima, N., Arai, Y., Nomura, T., Inokuchi, K., Yuasa, S. and Osumi, N.: Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. Genes to Cells 10 (2005) 1001-1014

Nakahira, E. and Yuasa, S.: Neuronal generation, migration and differentiation in the mouse hippocampal primordium as revealed by in utero electroporation. *J. Comparative Neurology* 483 (2005) 329-340

Kai, N., Iwase, K., Imai, K., Nakahira, E., Soma, M., Ohtsuka, S., Yagi, T., Kobayashi, K., Koga, H., Takiguchi, M. and Yuasa, S.: Altered gene expression in the subdivisions of the amygdala of Fyn-deficient mice as revealed by laser capture microdissection and mKIAA cDNA array analysis. *Brain Res.* 1073 (2006) 60-70

## 2. 学会発表 (国際学会)

Wada, K., Yamauchi, R., Sakurai, M., Furuta, A., Wada, E., Sekiguchi, M. and Aoki, S.: Novel therapeutic targets in glia-neuron interaction: G-Protein coupled receptors and deubiquitinating enzymes. International Society for Neurochemistry jointly with the European Society for Neurochemistry. 20<sup>th</sup> Biennial Meeting, Aug. 22, 2005

Maekawa, M., Yuasa, S., Osumi, N.: Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. Society for Neuroscience Meeting 35th, Washington, USA, Nov. 2005.

Maekawa, M., Matsumata, M., Owada, Y., Yuasa, S., Osumi, N.: FABP7/B-FABP/BLBP is required for maintenance of neural stem/progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. British Society for Developmental Biology, York, Mar. 2006.

## (国内学会)

平澤孝枝、松村直人、内野茂夫、高坂新一: NMDA受容体を介した神経幹細胞増殖制御の解析. 第

20 回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会、大阪、5.28, 2005

内野茂夫、堤も絵、平澤孝枝、伊藤雅之、後藤雄一、高坂新一: マウス中枢神経系における MeCP2 の発現解析. 第 28 回日本神経科学大会、横浜、7.26, 2005

赤澤智宏、都築早美、内山孝由、中村泰子、高坂新一: 活性型 SOX10 を用いた損傷神経の再生修復. 第 28 回日本神経科学大会、横浜、7.27, 2005

星雅人、赤澤智宏、高坂新一: Abnormal development of enteric neural crest cells in the nerve growth factor receptor, p75, knockout mice. 第 48 回日本神経化学会大会、福岡、9.29, 2005

大橋洋輝、君和田友美、西川香里、青木俊介、和田圭司: 成熟個体脳由来の神経系前駆細胞における G 蛋白質共役型受容体の発現解析. 分子生物学会、福岡、12, 2005

Maekawa, M., Yuasa, S., Osumi, N.: Pax6 is required for maintenance and differentiation of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. 第 28 回日本神経科学会大会、横浜、7, 2005

G. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

【名称】マクロファージ系細胞の活性化抑制物質のスクリーニング方法

【国際出願日】2005 年 2 月 21 日

【国際公開日】2005 年 9 月 29 日

【国際公開番号】WO 2005/090561 A1

【出願人】(財)ヒューマンサイエンス振興財団

【発明者】高坂 新一

## II. 分担研究報告書

成体脳神経幹細胞の賦活化を指標とした NMDA 受容体阻害剤の探索ならびにその分子基盤の解明

分担研究者 高坂新一 国立精神・神経センター神経研究所 所長

研究要旨： パーキンソン病をはじめとする神経変性疾患の新規治療薬の開発にあたり、成体の内在性神経幹細胞を賦活化させる再生医療のコンセプトに基づき、NMDA 受容体阻害剤であるメマンチンの薬理効果を検討した。その結果、本剤の単回腹腔内投与により有意に海馬歯状回の神経幹細胞の増殖が亢進することを確認した。一方、NMDA 受容体阻害剤による神経幹細胞の賦活化の分子基盤を解明するため、マイクロアレイを用いて NMDA 受容体阻害剤投与により発現が変動する分子を探索した結果、Notch シグナル系に関与する分子が取得された。この結果は、NMDA 受容体が Notch シグナル系を介して神経幹細胞の分化・増殖を制御していることを示唆する。

#### A. 研究目的

近年、有効な治療法が確立されていない神経変性疾患に対して、成体脳に内在する神経幹細胞を賦活化させることで、変性部位に神経回路網を再構築させる再生医療に基づいた新たな治療法の開発が期待されている。

NMDA 受容体は、中枢神経系における主要な興奮性情報伝達を担い、記憶・学習等高次脳機能に深く関わっているイオンチャンネル型受容体である。これまでに我々は、NMDA 受容体阻害剤が脳発達期の神経幹細胞の増殖を亢進させることを見出した。そこで、本研究では、成体脳に内在する神経幹細胞の増殖促進を指標に、既存の NMDA 受容体阻害剤の神経幹細胞賦活化に対する薬理効果を検討し、神経変性疾患の治療薬としての有効性を検証することを目的とする。また、マイクロアレイ等を用いて、NMDA 受容体阻害剤がもたらす神経幹細胞賦活化の分子基盤を解明することも目指す。

#### B. 研究方法

##### 1. NMDA 受容体阻害剤がもたらす成体神経幹細胞の増殖亢進効果の検討

12週齢のマウスに NMDA 受容体阻害剤であるメマンチン（10 mg/kg）を腹腔内投与し3日間飼育後、BrdU（75 mg/kg）を数時間おきに3回腹腔内投与し、翌日、麻酔下で還流固定後脳を摘出し

た。その後脳切片を作成し、抗 BrdU 抗体を用いた組織染色から BrdU 陽性細胞数を計測した。

##### 2. NMDA 受容体阻害剤がもたらす神経幹細胞賦活化の分子基盤の解明

妊娠15日齢のマウスに NMDA 受容体阻害剤である CNS-1102（3 mg/kg）を腹腔内投与（1回/日）し、3日後（妊娠17日目）胎児の大脳皮質より RNA を抽出した。この RNA からプローブを調整し、マイクロアレイを用いて NMDA 受容体阻害剤を投与したマウスで特異的に発現が変動する分子を探索した。コントロールとしては、PBS を投与したマウスのサンプルを用いた。

（倫理面への配慮）

本研究における動物実験は全て国立精神・神経センター神経研究所小型動物実験倫理問題検討委員会で審議、承認を受けた。

#### C. 研究結果

##### 1. NMDA 受容体阻害剤がもたらす成体神経幹細胞の増殖亢進効果の検討

メマンチンを投与することで、海馬歯状回の内在性神経幹細胞の増殖が亢進することを確認した。

##### 2. NMDA 受容体阻害剤がもたらす神経幹細胞賦活化の分子基盤の解明

マイクロアレイを用いた解析から、CNS-1102 を投与することで発現が増加する分子として、神



神経幹細胞の分化に関わる delta1 および deltex3 を見出した。

#### D. 考察

メマンチンは興奮毒性の抑制を薬効として、既に欧米でアルツハイマー型認知症の治療薬として市販されている。本研究より、メマンチンには興奮毒性の抑制以外に、神経幹細胞の増殖を亢進させる薬効を有することが確認できた。この結果、現在神経疼痛や脳血管障害の治療薬として開発されつつある NMDA 受容体阻害剤が神経変性疾患の治療薬としても有効であることが期待できる。一方、脳発達期における NMDA 受容体阻害剤の神経幹細胞の賦活化の分子基盤として、これまでに我々が見出していた Notch 受容体の下流に位置する Hes 分子の発現亢進に加え、Notch 受容体のリガンドである delta1 の発現の亢進がみられたことから、神経幹細胞の維持・分化に深く関わる Notch シグナル系の関与が示唆される。今後、これらの分子の発現細胞の同定等、詳細な検討を進める予定である。

#### E. 結論

NMDA 受容体阻害剤であるメマンチンを成体のマウスに投与することで、海馬歯状回における内在性の神経幹細胞の増殖が亢進することを確認した。また、脳発達期において、NMDA 受容体は Notch シグナル系を介して神経幹細胞の増殖を制御している可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kamitori, K., Tanaka, M., Okuno-Hirasawa, T., and Kohsaka, S.: Receptor related to tyrosine kinase RYK regulates cell migration during cortical development. BBRC 330 (2005) 446-453

Hirasawa, T., Ohsawa, K., Imai, Y., Ondo, Y., Akazawa, C., Uchino, S. and Kohsaka, S.: Visualization of microglia in living tissues by using Iba1-EGFP transgenic mice. J. Neurosci. Res. 81 (2005) 357-362

Yogotsawa, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I., Miyoshi, H., Kohsaka, S. and Akazawa, C.: Ubiquitylation and Degradation of Serum-inducible Kinase by hVPS18, a RING-H2 Type Ubiquitin Ligase. J. Biol. Chem. 280 (2005) 41619-41627

##### 2. 学会発表

(国内学会)

平澤孝枝、松村直人、内野茂夫、高坂新一: NMDA 受容体を介した神経幹細胞増殖制御の解析. 第 20 回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会、大阪、5.28, 2005

内野茂夫、堤も絵、平澤孝枝、伊藤雅之、後藤雄一、高坂新一: マウス中枢神経系における MeCP2 の発現解析. 第 28 回日本神経科学大会、横浜、7.26, 2005

赤澤智宏、都築早美、内山孝由、中村泰子、高坂新一: 活性型 SOX10 を用いた損傷神経の再生修復. 第 28 回日本神経科学大会、横浜、7.27, 2005

星雅人、赤澤智宏、高坂新一: Abnormal development of enteric neural crest cells in the nerve growth factor receptor, p75, knockout mice. 第 48 回日本神経化学学会大会、福岡、9.29, 2005

#### H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

【名称】マクロファージ系細胞の活性化抑制物質のスクリーニング方法

【国際出願日】2005 年 2 月 21 日

【国際公開日】2005 年 9 月 29 日

【国際公開番号】WO 2005/090561 A1

【出願人】(財)ヒューマンサイエンス振興財団

【発明者】高坂 新一

成体脳神経幹細胞の分化増殖を制御する G 蛋白質共役型受容体リガンドの探索

分担研究者 和田圭司 国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第四部 部長

研究要旨： 成体脳内の脳室周囲には神経幹細胞が局在し毛細血管と上皮細胞に取り囲まれている。この領域には神経幹細胞を維持し育む特殊な環境が存在しており、その環境因子の分子の実体を解明し制御することは幹細胞の賦活化による神経再生の鍵となる。脳スライス上の幹細胞局在領域からニューロスフェア法によって神経幹細胞を単離し培養する実験系を用い、このニューロスフェアと幹細胞局在領域における G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) の大量遺伝子発現解析を行なった。この解析結果をもとに成体脳内の神経幹細胞に発現が高い GPCR を 34 個同定することに成功し、これら GPCR は神経幹細胞の周囲に存在する環境因子の受容体である可能性が考えられた。これらの GPCR のうち入手可能であった 20 種類の GPCRS 作用薬剤を培養神経幹細胞に添加して細胞生物学的に生理活性を検討したところ、半数の 10 種類の作用薬剤において生理活性を見出すことに成功した。

#### A. 研究目的

難治性神経疾患に対する有効な治療法は現在確立されておらず、神経幹細胞を用いた神経再生医療は新たな治療法として期待されている。我々は成体脳内の神経幹細胞に着目し、神経幹細胞とその局在領域における環境因子の分子の実体を解明することで内性神経幹細胞を賦活化し、治療効果のある薬剤を見いだすことができるのではないかと考えた。G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) はヒトゲノムにコードされた最大の受容体ファミリーであり、医療に用いられる治療薬剤の半分以上が GPCR を標的としていることから治療薬を同定する上で重要なターゲット分子群である。我々はこれまでに胎児神経前駆細胞において GPCR の大量遺伝子発現解析系を確立しており、同様の手法にて成体神経幹細胞に発現する GPCR 遺伝子発現プロファイルを決定し、その特異的リガンドの中から成体神経幹細胞制御に利用可能な薬剤の探索を行うこととした。

#### B. 研究方法

C57BL/6J マウス 6 週齢オスの脳のスライス切

片から側脳室周囲の微小な幹細胞局在領域を顕微鏡下に切り出し、ニューロスフェア法によって神経幹細胞を単離し培養を行った。このニューロスフェアと幹細胞局在領域よりそれぞれ mRNA を抽出し、GPCR 遺伝子 284 個の primer を作製して、定量的 RT-PCR を行った。その遺伝子発現レベルを scatter 解析することで成体脳内の神経幹細胞に発現が高い GPCR を同定した。その中で入手可能な GPCR リガンドを培養神経幹細胞/前駆細胞に添加することで、その増殖や分化、運動性を制御する薬剤がないか検討した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験はすべて国立精神・神経センター神経研究所小型動物実験倫理問題検討委員会で審議・承認を受けた。実際の使用に当たっては国の定める法律・指針、米国の NIH(National Insutitute of Health)の実験動物利用に関するガイドラインに従い、実験動物に対する動物愛護に配慮して実験を行った。

#### C. 研究結果

ニューロスフェアと側脳室周囲の幹細胞局在

領域における GPCR 遺伝子 284 個の定量的 RT-PCR の結果、いずれにおいても発現が高いものを 34 個同定した。これらの GPCR のうち入手可能であった 20 種類の GPCRS 作用薬剤をニューロスフェアに添加し、分化や増殖、運動性に効果を示さないか検討したところ、ATP assay にて増殖に効果を示すものを 6 種類同定した。また接着させたニューロスフェアに添加し、その広がりから顕著に運動性に効果を示す薬剤を 4 種類見いだした。

#### D. 考察

ニューロスフェアと側脳室周囲の幹細胞局在領域それぞれの定量的 RT-PCR による GPCR 遺伝子発現の網羅的な解析の結果、*in vitro* と *in vivo* の条件いずれにおいても発現が高いものとして 34 個同定した。これら GPCR は神経幹細胞及びその周囲に存在する環境因子の受容体である可能性が考えられた。さらにこの GPCR 作用薬剤をニューロスフェアに添加したところ、増殖と運動性に効果を示したものを合わせて 10 個見だし、中には既に報告されている薬剤もあることから我々の実験系が正しい方向にあり、今後の *in vivo* 投与における内在性神経幹細胞への効果を検討する上で期待できると考える。

#### E. 結論

成体脳内の神経幹細胞及びその周囲に存在する環境因子の受容体として発現が高いと考えられる GPCR を 34 個同定した。そのうちこれまでのところ 10 種類の薬剤がニューロスフェアの増殖や運動性に効果を示すことが分かった。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Sakurai, M., Ayukawa, K., Setsuie, R., Nishikawa, K., Hara, Y., Ohashi, H., Nishimoto, M., Abe,

T., Kudo, Y., Sekiguchi, M., Sato, Y, Aoki, S., Wada, K. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 regulates the morphology of neural progenitor cells and modulates their differentiation. **J. Cell Sci.** 119 (2006) 162-171

Fukazawa, N., Ayukawa, K., Nishikawa, K., Ohashi, H., Ichihara, N., Hikawa, Y., Abe, T., Kudo, Y., Kiyama, H., Wada, K. and Aoki, S. Identification and functional characterization of mouse TPO1 as a myelin membrane protein. **Brain Res.** 1070 (2006) 1-14

##### 2. 学会発表

(国際学会)

Wada, K., Yamauchi, R., Sakurai, M., Furuta, A., Wada, E., Sekiguchi, M., Aoki, S., “Novel therapeutic targets in glia-neuron interaction: G-Protein coupled receptors and deubiquitinating enzymes” International Society for Neurochemistry jointly with the European Society for Neurochemistry. 20<sup>th</sup> Biennial Meeting. August 22, 2005

(国内学会)

分子生物学会

成熟個体脳由来の神経系前駆細胞における G 蛋白質共役型受容体の発現解析

○大橋洋輝、君和田友美、西川香里、青木俊介、和田圭司

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)  
特になし

成体脳神経幹細胞の増殖、分化、シナプス新生に関する形態学的基盤の解析

分担研究者 湯浅茂樹 国立精神・神経センター神経研究所 微細構造研究部 部長

研究要旨： 成体神経幹細胞の増殖、分化を制御する分子機構解明の基盤を確立するため、成体ならびに幼若ラットの海馬歯状回顆粒細胞下層(SGZ)における神経新生につき幹細胞の形態ならびに増殖動態の解析を行なった。これをもとにして、神経新生過程の制御にかかわる分子である Pax6 の作用機構について検討した。Pax6 は SGZ において神経前駆細胞に発現しており、Pax6 遺伝子変異ラットにおいては前期神経前駆細胞集団の維持が障害され、その結果として成体神経新生が低下することを明らかにした。

#### A. 研究目的

成体脳における神経新生にかかわる幹細胞の同定と、その増殖と分化を制御する分子機構、分化後の回路形成の機構に関する知見は、脳損傷時に内在性神経幹細胞を誘導して構造ならびに機能の両面から修復をはかる手段を開発するための基盤形成に必須である。本研究では、転写因子 Pax6 の遺伝子変異ラットで成体神経新生が低下しているという所見をもとに、成体神経前駆細胞の新規マーカーとして Pax6 を用いて前駆細胞の動態を研究する手法を開発するとともに、この分子が前駆細胞の増殖と分化の制御にどのように関与しているかを解析した。

#### B. 研究方法

##### 1. 神経前駆細胞の同定

生後の各発達段階から成体にいたる正常ならびに Pax6 遺伝子変異ラットを灌流固定し、ピブラトーム切片あるいは凍結切片を作製して免疫組織化学、免疫電顕的観察を行った。特に前期神経前駆細胞は nestin/GFAP、後期前駆細胞は nestin/PSA-NCAM の2重標識によって同定し、これらと Pax6 発現細胞との相関を検討した。

##### 2. 神経前駆細胞の増殖動態

BrdU によるパルスチェイス標識ならびに累積標識を行い、経時的に標本を作製して標識細胞の動態を解析した。

(倫理面への配慮)

神経研究所小型動物実験倫理問題検討委員会で審査をうけ許可された。

#### C. 研究結果

1. Pax6 は海馬歯状回顆粒細胞下層(SGZ)において早期ならびに後期神経前駆細胞の一部に発現するが、成熟神経細胞における発現は認められなかった。SGZ における S 期の細胞の大部分が Pax6 陽性であり、この分子は成体神経前駆細胞サブセットのマーカーとなることが分かった。

2. Pax6 遺伝子変異ラットの SGZ においては S 期の細胞が野生型の 70%に低下し、また、アストロサイトの減少と形態変化、歯状回の低形成が認められた。さらに、早期神経前駆細胞の減少と後期前駆細胞の増加が認められた。

#### D. 考察

1. Pax6 は成体海馬 SGZ の早期神経前駆細胞集団

の維持に必要で、この細胞集団は成体神経新生の維持に関与すると考えられる。Pax6 遺伝子変異ラットの社会行動異常には、神経新生低下による海馬の形態並びに機能障害が少なくとも一つの要因になっていると推測される。

2. 今後、海馬 SGZ に限局して Pax6 によって発現が制御される遺伝子を網羅的に解析し、このような候補遺伝子を局所へ導入して発現を制御し機能を解明することにより、成体神経幹細胞に特徴的な増殖と分化の分子機構がより明らかになると考えられる。

#### E. 結論

Pax6 遺伝子は海馬歯状回 SGZ における神経前駆細胞の分化過程を制御することが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis.

Maekawa M, Takashima N, Arai Y, Nomura T, Inokuchi K, Yuasa S, Osumi N.  
Genes to Cells, 10: 1001-1014, 2005

Neuronal generation, migration and differentiation in the mouse hippocampal primordium as revealed by in utero electroporation.

Nakahira E, Yuasa S  
Journal of Comparative Neurology, 483:329-340, 2005

Altered gene expression in the subdivisions of the amygdala of Fyn-deficient mice as revealed by laser capture microdissection and mKIAA cDNA array analysis.

Kai N, Iwase K, Imai K, Nakahira E, Soma M, Ohtsuka S, Yagi T, Kobayashi K, Koga H, Takiguchi M, Yuasa S.  
Brain Res. 1073: 60-70, 2006

##### 2. 学会発表

(国際学会)

Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis.

Maekawa, M., Yuasa, S., Osumi, N.:  
Society for Neuroscience Meeting 35th,  
2005. Nov. (Washington)

FABP7/B-FABP/BLBP is required for maintenance of neural stem/progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis.

Maekawa, M., Matsumata, M., Owada, Y., Yuasa, S., Osumi, N.:  
British Society for Developmental Biology, 2006.  
Mar. (York)

(国内学会)

Pax6 is required for maintenance and differentiation of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis.

Maekawa M, Yuasa S, Osumi N:  
日本神経科学学会第 28 回大会  
2005 年 7 月 (横浜)

#### H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 国立精神・神経センター

氏 名 高坂 新一

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kamitori, K., Tanaka, M. Okuno-Hirasawa, T., and Kohsaka, S.:	Receptor related to tyrosine kinase RYK regulates cell migration during cortical development.	BBRC	330	446-453	2005
Hirasawa, T., Ohsawa, K., Imai, Y., Ondo, Y., Akazawa, C., Uchino, S. and Kohsaka, S.:	Visualization of microglia in living tissues by using Iba1- EGFP transgenic mice.	J. Neurosci. Res.	81	357-362	2005
Yogosawa, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K I., Miyoshi, H., Kohsaka, S. and Akazawa, C.:	Ubiquitylation and Degradation of Serum- inducible Kinase by hVPS18, a RING-H2 Type Ubiquitin Ligase.	J. Biol. Chem.	280	41619-41627	2005

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 国立精神・神経センター

氏 名 和田 圭司

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakurai, M., Ayukawa, K., Setsuie, R., Nishikawa, K., Hara, Y., Ohashi, H., Nishimoto, M., Abe, T., Kudo, Y., Sekiguchi, M., Sato, Y, Aoki, S., Wada, K.	Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 regulates the morphology of neural progenitor cells and modulates their differentiation.	J. Cell Sci.	119	162-171	2006
Fukazawa, N., Ayukawa, K., Nishikawa, K., Ohashi, H., Ichihara, N., Hikawa, Y., Abe, T., Kudo, Y., Kiyama, H., Wada, K. and Aoki, S.	Identiofication and functional characterization of mouse TPO1 as a myelin membrane protein.	Brain Res.	1070	1-14	2006



研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 国立精神・神経センター

氏 名 湯浅 茂樹

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Maekawa, M., Takashima, N., Arai, Y., Nomura, T., Inokuchi, K., Yuasa, S., Osumi, N.	Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis.	Genes to Cells	10(10)	1001-1014	2005
Nakahira, E., Yuasa, S.	Neuronal generation, migration, and differentiation in the mouse hippocampal primordium as revealed by enhanced green fluorescent protein gene transfer by means of in utero electroporation.	J. Comparative Neurology	483(3)	329-340	2005
Kai, N., Iwase, K., Imai, K., Nakahira, E., Soma, M., Ohtsuka, S., Yagi, T., Kobayashi, K., Koga, H., Takiguchi, M., Yuasa, S.	Altered gene expression in the subdivisions of the amygdala of Fyn-deficient mice as revealed by laser capture microdissection and mKIAA cDNA array analysis.	Brain Res.	1073	60-70	2006

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷



## Receptor related to tyrosine kinase RYK regulates cell migration during cortical development

Kazuyo Kamitori, Mayumi Tanaka, Takae Okuno-Hirasawa, Shinichi Kohsaka \*

*Department of Neurochemistry, National Institute of Neuroscience, 4-1-1 Ogawa-higashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan*

Received 9 February 2005  
Available online 14 March 2005

### Abstract

Mammalian RYK is a receptor related to tyrosine kinase without detectable catalytic activity. We have previously reported that rat RYK is dominantly expressed in neural progenitor cells and mature neurons in the developing central nervous system. Mouse RYK has been found to bind to EphB2/B3 receptors, which have diverse functions during development. In this study, we demonstrated that RYK, EphB2, EphB3, ephrinB1, and ephrinB2 are expressed in embryonic brain. In vitro analysis using COS-7 cells revealed binding between rat RYK and EphB3, and that the RYK deletion mutant without extracellular leucine-rich motifs lacked this binding ability. To investigate the function of RYK in vivo, embryonic cortical slice cultures were analyzed after electroporation of expression plasmids for RYK or its deletion mutants. The results showed that overexpression of RYK suppressed cell migration from the ventricular zone to the pial surface, however, overexpression of the RYK deletion mutant without leucine-rich motifs had no effect on cell migration. These results suggest that RYK regulates cell migration during mammalian cortical development through the binding to Eph receptors.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Cortical slice culture; Eph receptor; Leucine-rich motif

The receptor related to tyrosine kinase RYK has two characteristic features. First, its tyrosine kinase domain possesses amino acid substitutions that lead to impaired nucleotide binding, and the kinase activity of RYK is thought to have been lost as a result of these substitutions [1,2]. Second, its extracellular domain contains two leucine-rich motifs (LRMs), which could participate in cell adhesion or cell migration through protein–protein interactions [3–5]. The extracellular domain also contains a region related to the Wnt-inhibitory-factor-1 (WIF-1) [6,7]. We previously reported its distribution in the developing cerebral cortex of rats, and the results of that study showed that RYK is highly expressed in neural progenitor cells in the ventricular zone and in mature neurons in the cortical plate, however, hardly any

expression was detected in migrating neurons in the intermediate zone [8,9]. A RYK homolog, the *derailed* receptor, in the nervous system of *Drosophila* plays a key role in axon guidance [10–13]. Recent analyses showed that the RYK homologs *derailed* and LIN-18, in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans*, respectively, act as receptors for Wnt family molecules [13,14], and mammalian RYK function as a receptor for Wnt in axon guidance [15].

An independent analysis showed that RYK-deficient mice had developmental defects, such as abnormal craniofacial features with cleft palate and short limbs [16]. The similar phenotype had been observed in mice lacking EphB2/B3 receptors [17], and mutations in ephrinB1, a ligand for B-type Eph receptors, cause similar craniofacial defects [18,19]. Moreover, binding of mouse or human RYK to EphB2/B3 receptors has been reported [16,20]. These observations suggest that RYK is essential for normal morphogenesis, possibly through

\* Corresponding author. Fax: +81 42 346 1741.  
E-mail address: [kohsaka@ncnp.go.jp](mailto:kohsaka@ncnp.go.jp) (S. Kohsaka).

the Eph signaling pathway. Eph receptors have diverse functions in the mammalian nervous system, including in axon guidance, dendritic morphogenesis, and synaptogenesis [21–27], and interestingly, the signaling pathway involving ephrinB1 has been implicated in neuronal migration in the developing neocortex [28]. These findings, in addition to the expression pattern of RYK in developing brains [8,9], imply some function of RYK in cortical development. In this study, we demonstrated the importance of RYK in cortical cell migration in experiments using embryonic slice cultures, and an *in vitro* analysis suggested that RYK could act through the binding to Eph receptors.

## Materials and methods

**Animals.** All experiments were performed in accordance with the Guidelines for Animal Experiments of the National Institute of Neuroscience, NCNP, Japan. The number of animals used was kept to a minimum. ICR mice and Wistar rats were obtained from Japan CLEA (Shizuoka, Japan). To minimize suffering, before the experiments the mice were deeply anesthetized by injection of sodium pentobarbital (50 µg/g of body weight), and the rats were deeply anesthetized with diethyl ether.

**Western blot analysis.** Brains of rats or mice were collected and solubilized in lysis buffer [50 mM Tris–HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 10% glycerol, and 1× Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)] on ice for 30 min. They were then centrifuged at 14,000g for 15 min, and the supernatants were used as total protein extracts. The protein concentration was determined with a BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), and 50 µg of the protein was separated by SDS–PAGE and transferred to a Protran nitrocellulose filter (Schleicher and Schuell GmbH, Dassel, Germany). Immunoblotting analysis was performed, and signals were visualized with an ECL chemiluminescence detection system (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden). The primary antibodies were anti-RYK rabbit antiserum [8] diluted to 2 µg/ml, anti-EphB2 and anti-EphB3 goat polyclonal antibody (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) diluted to 2 µg/ml, and anti-ephrinB1 and anti-ephrinB2 goat polyclonal antibody (R&D systems) diluted to 2 µg/ml. The secondary antibodies were HRP (horseradish peroxidase)-conjugated anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences AB) diluted to 1:2000 and HRP-conjugated anti-goat IgG (ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA) diluted to 1:1000.

**Plasmids.** The rat RYK cDNA fragment (GenBank Accession No. AY669340) was cloned into the *XbaI*–*Bam*HI site of p3XFLAG-CMV-8 (Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO, USA) to be in-frame with the preprotrypsin leader sequence and the three FLAG tags. The following FLAG-tagged RYK deletion mutants were also inserted into the same vector: dTK, which lacks the tyrosine kinase domain in the intracellular domain; and dLRM, which lacks both LRMs. Plasmid pEphB3HA, the HA-tagged human EphB3 cDNA inserted into the plasmid pCI (Promega, Madison, WI, USA), was a gift from Dr. S. Hattori (The Institute of Medical Science, The University of Tokyo). The retrovirus vector pCLIG was a gift from Dr. R. Kageyama (Institute for Virus Research, Kyoto University) [29]. The rat RYK cDNA fragment, described as above, was inserted into the *Eco*RI–*Bam*HI site of pCLIG to express the RYK-EGFP fusion protein. The RYK deletion mutants dTK and dLRM were also cloned into the same site to express EGFP fusion proteins in the same manner. These plasmids derived from pCLIG were used as expression vectors for slice cultures.

**Transfection and immunoprecipitation.** COS-7 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> and transfected by using Lipofectamine PLUS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The cells were collected 24 h after transfection, and protein extracts were prepared as described above. The protein extract was mixed with 1 µg of antibody described below, and after rotating overnight at 4 °C, 10 µl of protein A–Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences AB) and 10 µl of protein G–Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences AB) were added to the samples, and they were incubated for an additional 3 h at 4 °C. The complex was then washed with TBS (50 mM Tris–HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) three times, and the Western blot analysis was performed as above. The primary antibodies were anti-FLAG mouse monoclonal antibody clone M2 (Sigma–Aldrich) diluted at 1:1000 and anti-HA rat monoclonal antibody clone 3F10 (Roche Diagnostics GmbH) diluted at 1:1000. The secondary antibodies were HRP-conjugated anti-mouse IgG (Amersham Biosciences AB) diluted to 1:2000 and HRP-conjugated anti-rat IgG (Amersham Biosciences AB) diluted to 1:1000.

**Electroporation of DNA into embryonic brains and cortical slice cultures.** Electroporation experiments were performed as described previously [30]. Briefly, pregnant ICR mice at E15 were deeply anesthetized, and the embryos were transferred into Tyrode's solution (136.8 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.7 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.38 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11.9 mM NaHCO<sub>3</sub>, and 5.5 mM glucose). Plasmid solution at a concentration of 5 µg/µl was injected into the lateral ventricle of the embryo, and the head was placed between the tweezers-type electrode CUY650-5 (Nepagene, Ichikawa, Chiba, Japan). The direction of the electrode was adjusted so that DNA could enter cells in the ventricular zone of the neocortex. Electronic pulses (25 V, 50 ms) were delivered five times at intervals of 950 ms with CUY21 edit (Nepagene).

Cortical slice cultures were prepared as described with some modifications [31]. After electroporation the brain was immediately removed and placed into the pre-warmed 1% agarose/PBS solution. When the agarose had hardened, 220 µm coronal slices were prepared with the microtome (VT 1000S; LEICA, Solms, Germany), and after transfer onto Millicell-CM filters (Millipore, Bedford, MA, USA) placed in 35-mm dishes filled with 1 ml DMEM/F-12 (1:1) containing 10% horse serum and 5% FBS, they were incubated at 37 °C in 10% CO<sub>2</sub>.

**Immunohistochemistry.** Slice cultures were fixed in 4% paraformaldehyde/PBS overnight, treated with ice-cold acetone/methanol (1:1) for 1 min, and washed in PBS. They were then sequentially incubated in 2% skim milk/0.3% Tween 20/PBS for 1 h and in the primary antibody overnight, and after washing in PBS for 2 h, they were incubated in the secondary antibody for 3 h and washed in PBS overnight. Anti-GFP rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) diluted at 1:500 was used as the primary antibody, and Alexa Fluor 488-labeled F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes) diluted at 1:500 was used as the secondary antibody. Images were recorded and analyzed with an Evolution MP camera and the imaging software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

## Results

### *Expression of RYK, Eph, and ephrin in mammalian brain*

To investigate whether RYK and Eph receptors play a role in cortical development, we first characterized the expression profile of RYK, EphB2/B3, and B-type ephrins by Western blot analysis (Fig. 1). RYK expres-