

200933030A

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業

慢性 C 型肝炎のインターフェロン療法における
幹細胞機能の変化とうつ病発症に関する
基礎・臨床連携研究

(H21 - 肝炎 - 一般 - 006)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

平成 22 年 3 月

研究代表者 澤本 和延

目 次

1. 総括研究報告書

慢性 C 型肝炎のインターフェロン療法における幹細胞機能の変化と うつ病発症に関する基礎・臨床連携研究	1
澤本 和延	

2. 分担研究報告書

マウスモデルを用いたインターフェロン療法における 海馬神経幹細胞機能の変化とうつ病発症に関する基礎研究	11
澤本 和延	

霊長類モデルを用いたインターフェロン治療における幹細胞機能の変化と うつ病発症に関する基礎研究	14
金子 奈穂子	

Sox21 による成体海馬でのニューロン新生の制御	16
岡野 栄之	

インターフェロンシグナルによる神経幹細胞制御の解析	20
中島 欽一	

抑うつ作用を有する薬剤の神経幹細胞に対する効果の検討	24
等 誠司	

慢性 C 型肝炎のインターフェロン療法におけるうつ病発症に関する臨床研究	25
竹内 浩・野尻 俊輔・田中 靖人	

慢性 C 型肝炎のインターフェロン療法における幹細胞機能の変化と うつ病発症に関する基礎・臨床連携研究	28
今村 雅俊	

慢性 C 型肝炎のインターフェロン療法におけるうつ病発症に関する臨床研究	29
早川 達郎	

セロトニントランスポーター関連遺伝子解析について	31
島田 昌一	

3. 資料

第 1 回班会議（平成 21 年 7 月 22 日）	33
----------------------------------	----

第 2 回班会議（平成 22 年 1 月 22 日）	54
----------------------------------	----

4. 研究組織	79
---------------	----

【別冊】

5. 研究成果の刊行に関する一覧表

6. 研究成果の刊行物・別刷

1. 総括研究報告

慢性C型肝炎のインターフェロン療法における幹細胞機能の変化とうつ病発症に関する
 基礎・臨床連携研究

研究代表者 澤本 和延 名古屋市立大学大学院医学研究科 教授

研究要旨（当該年度は3年計画の1年目に当たる）

本研究では、基礎研究と臨床研究の連携により、インターフェロン(IFN)誘発性うつ病の発症メカニズムの解明と、発症に関連する臨床的因子の探索を並行して進め、新たな予防・治療法の確立を目指すことを目的としている。基礎研究においては、IFN誘発性うつ病における神経幹細胞機能の変化に焦点をあて、分子・細胞レベルでの発症メカニズムの解明を目指している。今年度の研究により、成体脳におけるニューロン新生のメカニズムとIFNの作用機構に関する新たな知見が得られた。臨床研究は、慢性C型肝炎患者にIFN療法導入時の抑うつ症状を追跡するコホート研究である。IFN療法の開始から終了までの抑うつ症状と睡眠状態を経時的に測定すると共に、うつ病発症に影響を与えられている因子について測定をすることで、発症メカニズムの解明を目指している。本年度はプロトコルの調整・倫理委員会等の承認など準備を完了し、エントリーを開始した。次年度以降症例の確保を目指すと共に、同じくIFNの副作用を研究している西口班との連携によりより大規模な研究を予定している。これらの研究によって、IFN療法の完遂を妨げるうつ病の予防・治療方法、およびIFN療法に伴ううつ病発症のハイリスク患者を検出する方法の開発に必要な情報を提供し、慢性C型肝炎の医療の発展に貢献することを目指す。

A. 研究目的

慢性C型肝炎の唯一の根治療法はインターフェロン(IFN)療法であるが、IFNはうつ病等の中枢神経系有害作用を高頻度に惹起し、時に治療中止を余儀なくさせられる。しかしその神経病理学的機構や発症に関与する臨床的因子については殆ど分かっておらず、これらの解明は現在の慢性肝炎治療研究における最も重要な課題の1つである。

近年、成体脳でも側脳室周囲の脳室下帯・海馬には神経幹細胞が存在し、ニューロンを産生していることが明らかになった(図1)。研究

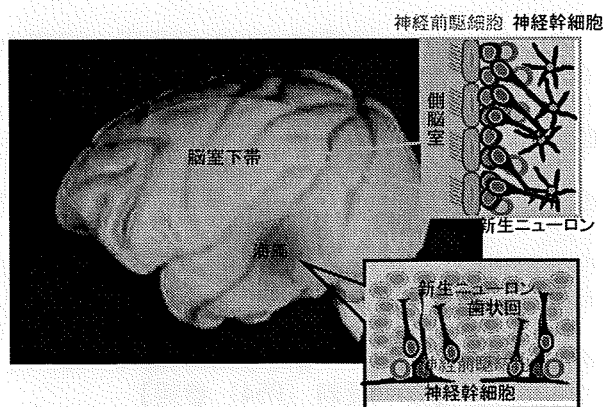


図1 成人脳の脳室下帯と海馬歯状回に神経幹細胞が存在しニューロンを産生する。海馬のニューロン新生はうつ病と深く関連しており、IFNによって変化する。

代表者らは、成体脳の神経幹細胞の機能・制御メカニズムに関する研究を行ってきた。この機

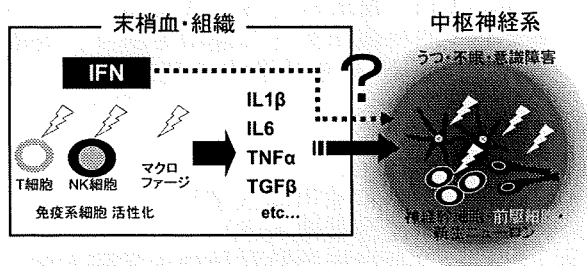


図2 IFNによる幹細胞機能の変化がうつ病発症の原因であるかどうかは不明である。その作用機構にも複数の異なる可能性がある。

構の生理的意義の多くは未解明だが、抑うつ状態の形成や抗うつ薬の効果発現に関与することが報告されている。分担者金子らの研究によって、IFN投与によって海馬の神経幹細胞の増殖が抑制されることが明らかになった。これは、IFN誘発性うつ病においても、神経幹細胞機能の変化が神経病理学的基盤となっている可能性(図2)を強く示唆している。本研究は、IFNによって惹起される神経幹細胞機能の変化を分子・細胞・動物レベルで詳細に解析することによりIFN誘発性うつ病の発症メカニズムを解明し、肝炎医療に貢献することを目的とする。

現行のIFN療法をドロップアウトなく効率よく遂行するには、うつ病発症の可能性を事前に的確に把握し対応することが重要であるが、これらの知見は世界的にも非常に不足している。そこで本研究では、IFN療法導入患者の精神医学的評価・画像診断・生物学的マーカーの追跡により、うつ病発症に関連した臨床的因子の同定を行うことを目的とした臨床研究を並行し

て行う。これは、抑うつ状態を正確に評価する構造化面接によって、INF療法導入時の慢性C型肝炎患者の抑うつ症状を追跡するコホート研究である。年齢・性別・生物学的マーカー、海馬容積等の因子との関連性の探索により、INF誘発性うつ病の発症に影響を与える因子をあきらかにする。

本研究は、神経幹細胞研究を精力的に行っている基礎研究者と、同病院内で連携して診療を行っている内科・精神科臨床医が、相互に情報交換・議論し、協力のもとに遂行することを特色とする。霊長類モデルも含めた詳細な発症メカニズムの解析から得られる知見は、うつ病発症に関連する因子検索に活用する。この体制の構築により、基礎・臨床研究が乖離することなく相乗的に機能し、INF誘発性うつ病の本態に迫ることが可能である。

B. 研究方法

上述の目標を達成するため、以下の10名の分担研究者からなる研究班を組織した。基礎研究では、研究代表者と4名の分担研究者が、相互に関連した課題について様々なアプローチでINFと神経幹細胞および抑うつ症状の関連について、協力して研究に取り組んでいる。臨床研究においては、臨床研究責任者である竹内が他の精神科・内科臨床医との連携を図り、効率良く多施設共同研究を推進する体制となっている。

(基礎研究)

金子 奈穂子 (名古屋市立大学)
岡野 栄之 (慶應義塾大学)
中島 欽一 (奈良先端科学技術大学院大学)
等 誠司 (生理学研究所)

(臨床研究)

竹内 浩 (名古屋市立大学)
野尻 俊輔 (名古屋市立大学)
田中 靖人 (名古屋市立大学)
今村 雅俊 (国立国際医療センター)
早川 達郎 (国立国際医療センター)
島田 昌一 (大阪大学)

基礎研究においては、以下のような様々な手法でINFによる神経幹細胞への作用を多角的に解析している。

- 1) 蛍光レポータートランスジェニックマウスによる神経幹細胞からのニューロン新生の可視化
- 2) 海馬ニューロン新生に関与する転写因子Sox21遺伝子欠損マウスの表現型解析
- 3) INF α またはINF β をマウスに投与し、神経幹細胞の増殖・ニューロンへの分化等を組織学的に解析するとともに、抑うつ症状を行動学的に解析
- 4) 中枢神経系特異的IFNARノックアウトマ

ウスにINF α またはINF β を投与し、神経幹細胞または抑うつ症状への影響を解析

- 5) コモンマームセットにINF α またはINF β を投与し、霊長類における神経幹細胞への影響ならびに抑うつ症状を解析
- 6) ニューロスフェア法により神経幹細胞の増殖・分化能をin vitroで解析
- 7) 成体海馬由来神経前駆細胞を培養し、培地にINFを添加して、増殖・分化への影響を解析
- 8) 内在性のINFの発現に関与する可能性のあるToll様受容体に着目し、その発現と機能を解析

臨床研究は、観察コホート研究である。名古屋市立大学病院肝・膵臓内科にて慢性C型肝炎に対してINF療法を受けるすべての患者を対象に同意を得られた症例について、1. 観察開始時、2. 抑うつ症状、睡眠状態の経時変化、3. INF療法終了時、4. 生物学的マーカーを測定し、これらを解析することにより、INF療法中の抑うつ症状の出現・変化に関連する因子を明らかにしていく。また、野尻、田中は特にウイルス学的・ゲノムワイド関連の解析も行う。島田は、特にセロトニントランスポーター関連遺伝子多型部位の解析を行う。早川、今村は、国立国際医療センターの慢性C型肝炎に対してINF療法を受けるすべての患者を対象に同意を得られた症例について、名古屋市立大学病院と同様のプロトコルを用いて抑うつ症状、睡眠状態の経時変化、各因子の評価を行う。特に睡眠状態については客観的評価のための活動量測定器を用いて測定することとしている。

本研究は名古屋市立大学大学院医学研究科倫理審査委員会および国立国際医療センター倫理審査委員会の承認を得ている。

尚、本研究は、同様にINFの副作用の研究を行っている西口修平班と連携して推進しており、合同で班会議を行うとともに、共同研究を進めている。

班会議は以下の通り、西口班と合同で二回開催した。

平成21年7月22日 第1回班会議 (名古屋市立大学) 【3. 資料 (P33) 参照】

平成22年1月22日 第2回班会議 (メルパルク大阪) 【3. 資料 (P54) 参照】

また、研究の進捗状況を報告し問題点を議論するとともに、基礎と臨床の連携を深めるため、以下の通り、少人数のミーティング等を行った。

平成21年4月14日 19:00 スタートアップミーティング (名古屋市立大学)

参加者：古川、竹内、野尻、田中、等、澤本、

金子

平成 21 年 6 月 3 日 Nathalie Spassky 博士講演「神経幹細胞および上衣細胞の繊毛の役割」(名古屋市立大学)

平成 21 年 7 月 21 日 基礎研究打ち合わせ(名古屋市立大学)
参加者: 澤本、金子、中島、切替

平成 21 年 8 月 18 日 基礎研究打ち合わせ(生理学研究所)
参加者: 等、金子、澤本

平成 21 年 9 月 2 日 第 1 回基礎・臨床合同ミーティング(名古屋市立大学)
参加者: 澤本、金子、竹内、田中、野尻

平成 21 年 11 月 25 日 第 2 回基礎・臨床合同ミーティング(名古屋市立大学)
参加者: 澤本、金子、竹内、田中、野尻、等、鄭

平成 21 年 11 月 25 日 基礎研究打ち合わせ(名古屋市立大学)
参加者: 澤本、金子、等

平成 22 年 1 月 7 日 臨床研究打ち合わせ(国府台病院)
参加者: 早川、今村、正木、今井、溝上、伊藤、亀井、樋上、安井、芦澤、樽谷、貫井、奥平、鶴重、齋藤

平成 22 年 1 月 22 日 第 3 回基礎・臨床合同ミーティング(名古屋市立大学)
参加者: 澤本、金子、竹内、田中、野尻、鄭

C. 研究結果

基礎研究においては、海馬の幹細胞によるニューロン新生に着目して、IFN によるうつ病発症のメカニズム解明に取り組んでいる。3 年計画の 1 年目に当たる H21 年度においては、海馬ニューロン新生のメカニズム解明(岡野)、IFN を投与したマウス(澤本)およびマーマセツト(金子)のニューロン新生及び抑うつ状態の解析、培養実験による神経幹細胞あるいはミクログリアへの IFN の作用の解析(等)、および内在性の IFN の発現誘導に関与する可能性のある受容体の解析(中島)を通して、以下の通り各々の研究の準備を開始するとともに基盤となる重要なデータを取得した。

澤本は金子・鄭とともに、PEG-IFN α をマウスに投与し、脳室周囲に STAT1 の発現が誘導されることを見いだした。また、IFN 受容体(IFNAR1 および IFNAR2) がマウス海馬に発現していることを確認した。

金子は、コモンマーマセツトの成体海馬歯状

回においても増殖してニューロンを産生する幹細胞が存在することを確認した。コモンマーマセツトの抑うつ症状を解析するための行動解析システムを作成中である。

岡野は、Sox21 欠損マウスを用いた解析により、Sox21 が成体海馬に存在する神経前駆細胞の分化を促進することで、成体ニューロン新生の維持に貢献することを明らかにした。また、Sox21 が Hes5 遺伝子の発現を転写レベルで抑制することで成体神経前駆細胞の未分化状態を解除し、ニューロン分化を促すことを明らかにした。

中島は、IFN の発現誘導に関与する Toll 様受容体(TLR)ファミリーのうち、TLR7 および TLR9 の発現について研究し、これらが神経幹細胞ではなく神経幹細胞と隣接して存在するミクログリアに発現することを明らかにした。これらことから、神経系細胞と免疫系細胞が成体海馬内で相互作用する可能性が示唆された。

等は、IFN α および IFN β の神経幹細胞の培養系を用いて解析し、これら IFN が成体脳の神経前駆細胞に直接作用して増殖を阻害する可能性を示した。胎生期の神経幹細胞には IFN 受容体が発現していないため、作用しないことも明らかにした。

臨床研究については、倫理審査委員会の承認を得ること、検体検査の実施について準備期間が必要であったことなどから開始が遅れたため、症例数からも検査項目からも具体的な結果はまだ出るまでにはなっていない。野尻、田中、竹内は名古屋市立大学病院での症例集積を、今村は国立国際医療センターでの症例集積準備を行っている。そこで早川は INF 誘発性うつ病における睡眠障害の重要性について文献的検討を行った。島田は、セロトニントランスポーター関連遺伝子多型部位について健常人によるコントロールの解析を行った。今後臨床研究の分担研究者の施設が共同で行う予定であり、更なる症例数の増加が見込まれる。現在のところ 2 年間で 200 例程度を見込んでいる。

D. 考察

今年度の基礎研究により得られた成果の学術的意義および IFN 療法によるうつ病への対策との関連は以下の通りである。

1) 成体海馬におけるニューロン新生はうつ病との関連が示唆されているものの、その制御機構には不明な点が多い。岡野により明らかにされた転写因子 Sox21 による神経前駆細胞の未分化状態からニューロン分化ステージへの移行のタイミング調節機構は、この点を解明したインパクトのある研究である。このメカニズムが IFN によるうつ病発症においても何らかの関与をしている可能性が考えられる。

2) IFN 投与により抑うつ症状が引き起こされる際の重要なプロセスの一つとして、神経幹細胞による海馬のニューロン新生の変化が関

与している可能性が分担研究者金子の以前の研究により示唆されている。さらに等は、PEG-IFN α をマウスに投与し、神経幹細胞の選択的培養法で解析を行うことによって、神経幹細胞の数が減少することを確認した。この変化がIFNの神経幹細胞へ直接作用によるものか、あるいは別の細胞を介した間接的なものなのかは明らかではない。今年度の金子・等・鄭らの研究により、成体の神経幹細胞や神経幹細胞が存在する組織においてIFN受容体が発現していること、神経幹細胞培養系にIFNを添加すると増殖が阻害されること(等)が明らかになり、IFNが直接作用してニューロン新生に影響を与える可能性が示唆された。

3) IFNによる抑うつ症状を理解するためには、投与されたIFNの作用とともに、内在性IFNの発現調節機構を研究することも重要である。中島の研究により、内在性IFN α の発現誘導に関与するToll様受容体(TLR7とTLR9)が神経幹細胞に隣接するミクログリアに発現していることが明らかになった。今後の研究で、海馬内のミクログリアのToll様受容体の活性化によりIFN α が産生され、周囲の神経幹細胞に影響を与えることが証明されれば、INFによるうつ病の発症に関与する重要な知見となると考えられる。

臨床研究は症例数が少なく具体的な研究成果は今しばらく時間が必要であるが、本研究の特徴は臨床と基礎的研究が絶えず連絡を取り合いお互いの研究成果を検討しあって勤めていくところにある。臨床研究にあつたては、1) 構造化面接まで含めたフルスペックの共同研究(名市大、国際医療センター)及び2) アンケートを中心とした簡素化された多施設共同研究(兵庫医科大学の西口班の5施設)を進めていくことになっており症例の増加が期待される。また新たに基礎研究として加わった鶴飼渉氏の研究室にてbrain-derived neurotrophic factor (BDNF)の測定を加えることによりこのタンパクを介したIFN誘導性うつ病の発症への関与も検討する予定である。

さらに、これら基礎・臨床の研究成果や準備状況を合同会議で議論し、双方の今後の研究のデザインを再検討した(後述)。

E. 結論

進捗状況:

基礎研究においては、活発な分担研究を行い、IFNによる神経幹細胞機能の変化の解析に関する各自の計画を実施して学術的に重要な成果が得られた。2年目以降に行う予定の動物実験等の準備も順調に進んでおり、今後の進展が期待できる。臨床研究もプロトコルの調整や倫理委員会承認等の準備が整い、症例のエントリーを開始することができた。3年計画の1年目の目標について、概ね達成できたと考えられる。

主な問題点と対策:

1) 班会議およびその他のミーティングにおいて、動物実験や培養実験に用いるIFNとして何を使用すべきかについて、以下のような議論が行われた。

第一に、IFNは受容体との結合性に種特異性があるため、あるいは異種のIFNを投与すると動物体内に免疫ができるために、実験には同種のIFNを用いるべきではないかという議論があった。これまでの動物実験・培養実験においては、ヒトIFNでもある程度の効果が検出されているが、実験に用いるIFNは種特異性を考慮して選択することにした。

第二に、IFNの α と β の作用の違いについて議論された。臨床の研究者によりIFN β はIFN α よりも抑うつ症状の副作用が少ないという可能性が示されているが、その科学的根拠は不十分であり、メカニズムも不明である。そこで、今後基礎研究において、IFN α とIFN β の神経幹細胞等への影響を比較することとした。

2) IFN投与による抑うつ症状が、投与されたIFNが脳内へ移行することによって生じるのかどうかは不明である。班会議において、等は公開されている文献等の情報と自らのデータを分析し、投与されたIFNは、脳内に到達して神経幹細胞に直接影響を及ぼしうる濃度に達する可能性があると考えた。実際に脳内に存在するIFN受容体がIFNにより誘発されるうつ病または神経幹細胞の機能変化に関わっているかどうかを調べるため、中枢神経系特異的にIFN受容体遺伝子を欠損するコンディショナルノックアウトマウスを用いた解析を行うこととし、現在マウスの導入準備を進めている。

3) 臨床研究においては、意義のある結論を得るために十分な症例数を確保できるかどうか最大の課題となっていた。そのため、申請時の参加施設(名市大病院・国府台病院)に加えて、国立国際医療センター戸山病院が参画した。さらに、合同班会議における共同研究の議論によって西口班からも多くの施設が参加し、規模を拡大することができた。これにより、3年間で十分な症例数を確保できる見込みとなった。

展望:

基礎研究により、IFN誘発性うつ病発症メカニズムの解明により、IFN療法の完遂を妨げるうつ病の予防・治療方法を提示できる可能性がある。また、本研究の成果はIFN誘発性うつ病に限らず、より患者数が多く大きな社会問題となっている内因性うつ病の病態解明および治療に役立つ可能性もある。臨床研究により、IFN療法に伴ううつ病発症のハイリスク患者を検出が可能になれば、各患者に適した治療方法を選択することが可能になり、医療経済的な貢献も期待できる。

F. 健康危険情報
該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

[澤本 和延]

Guirao, B., Meunier, A., Mortaud, S., Aguilar, A., Corsi, J.-M., Strehl, L., Hirota, Y., Desoeuvre, A., Boutin, C., Han, Y.-G., Mirzadeh, Z., Cremer, H., Montcouquiol, M., Sawamoto, K., and Spassky, N. Mammalian motile cilia orientation requires coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity. *Nat. Cell Biol.* in press

Kojima, T., Hirota, Y., Ema M., Takahashi, S., Miyoshi, I., Okano, H., Sawamoto, K. Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. *Stem Cells* in press

Oki, K., Kaneko, N., Kanki, H., Imai, T., Suzuki, N., Sawamoto, K., Okano, H. Musashi1 as a marker of reactive astrocytes after transient focal brain ischemia. *Neurosci Res* in press

Tamase A, Muraguchi T, Naka K, Tanaka S, Kinoshita M, Hoshii T, Ohmura M, Shugo H, Ooshio T, Nakada M, Sawamoto K, Onodera M, Matsumoto K, Oshima M, Asano M, Saya H, Okano H, Suda T, Hamada J, Hirao A. Identification of tumor-initiating cells in a highly aggressive brain tumor using promoter activity of nucleostemin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105 (46) :18012-18017, 2009.

Huang S, Hirota Y, Sawamoto K. Various facets of vertebrate cilia: motility, signaling, and role in adult neurogenesis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85: 324-36, 2009.

Kaneko N, Sawamoto K. Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions. *Neurosci Res* 63(3):155-64, 2009.

Enomoto, A., Asai, N., Namba, T., Wang, Y., Kato, T., Tanaka, M. Tatsumi, H., Taya, S., Tsuboi, D., Kuroda, K., Kaneko, N., Sawamoto, K., Miyamoto, R., Jijiwa, M., Murakumo, Y., Sokabe, M., Seki, T., Kaibuchi, K., Takahashi, M. Roles of Disrupted-In-Schizophrenia 1-Interacting Protein Girdin in Postnatal Development of the Dentate Gyrus *Neuron* 63: 774-787, 2009.

Suzuki, T., Miyamoto, H., Nakahari, T., Inoue, I., Suemoto, T., Jiang, b., Hirota, Y., Itohara, S., Saido, T.C., Tsumoto, T., Sawamoto, K., Hensch, T.K., Delgado-Escueta, A.V., Yamakawa, K. Efhc1 deficiency causes spontaneous myoclonus and increased seizure susceptibility *Hum. Mol. Genet.* 18 (6) : 1099-1109, 2009.

金子奈穂子, 澤本和延. 海馬ニューロンの新生と精神神経疾患. *総合リハビリテーション* 38 (2) : 114-120, 2010.

匹田貴夫, 澤本和延. 成体の脳組織における神経幹細胞と再生医療. *医学のあゆみ* 231 (11) :1112-1116, 2009.

加古英介, 金子奈穂子, 祖父江和哉, 澤本和延. 細胞移植を用いない脳死間再生医療の可能性. *生物物理化学* 53 (4) : 103-107, 2009.

黄詩恵, 廣田ゆき, 澤本和延. 神経組織における繊毛の役割. *細胞工学* 28(10): 1016-1020, 2009.

澤本和延. 脳に内在する神経再生機構. *臨床神経学* 49(11): 830-833, 2009.

小島拓郎, 廣田ゆき, 澤本和延. 成体脳におけるニューロン新生. *慶應医学* 85 (2) : 169-177, 2009.

黄詩恵, 廣田ゆき, 澤本和延. 発達期における上衣細胞繊毛の成熟と脳脊髄液循環. *小児の脳神経* 34 (1) : 10-15, 2009.

[金子 奈穂子]

Oki K, Kaneko N, Kanki H, Imai T, Suzuki N, Sawamoto K, Okano H. Musashi1 as a marker of reactive astrocytes after transient focal brain ischemia. *Neurosci Res*, in press

Enomoto A, Asai N, Namba T, Wang Y, Kato T, Tanaka M, Tatsumi H, Taya S, Tsuboi D, Kuroda K, Kaneko N, Sawamoto K, Miyamoto R, Jijiwa M, Murakumo Y, Sokabe M, Seki T, Kaibuchi K, Takahashi M. Roles of Disrupted-In-Schizophrenia 1-Interacting Protein Girdin in Postnatal Development of the Dentate Gyrus. *Neuron*, 63: 774-787, 2009.

金子奈穂子・澤本和延

海馬ニューロンの新生と精神神経疾患. *総合リハビリテーション* 38(2):114-120,2010.

加古英介・金子奈穂子・祖父江和哉・澤本和延
細胞移植を用いない脳疾患再生医療の可能性
生物物理化学 53(4) : 103-107,2009

[岡野 栄之]

Matsuda S, Okano HJ, Tsutsumi S, Aburatani H, Saga Y, Matsuzaki Y, Akaike A, Sugimoto H and Okano H. : Sox21 promotes hippocampal adult neurogenesis through the transcriptional repression of *Hes5* gene (submitted to *Neuron*)

Kanki H, Shimabukuro MK, Miyawaki A and Okano H. :“Color Timer” mice: visualization of neuronal differentiation with fluorescent proteins. *Mol. Brain* (in press) 2010.

Kojima T, Hirota Y, Ema M, Takahashi S, Miyoshi I, Okano H and Sawamoto K. : Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. *Stem Cells*. 2010. [Epub ahead of print]

Tada H, Okano HJ, Takagi H, Shibata S, Matsumoto M, Yao I, Saiga T, Nakayama KI, Kashima H, Takahashi T, Setou M and Okano H. : Fbxo45, a novel ubiquitin ligase, regulates synaptic activity. *J. Biol. Chem.* 2009 Dec 7. [Epub ahead of print]

Kumagai G, Okada Y, Yamane J, Kitamura K, Nagoshi N, Mukaino M, Tsuji O, Fujiiyoshi K, Okada S, Shibata S, Toh S, Toyama Y, Nakamura M and Okano H. : Roles of ES Cell-Derived Gliogenic Neural Stem/ Progenitor Cells in Functional Recovery after Spinal Cord Injury *PLOS ONE*

4(11):e7706, 2009.

Tamase A, Muraguchi T, Naka K, Tanaka S, Kinoshita M, Hoshi T, Ohmura M, Shugo H, Ooshio T, Nakada M, Sawamoto K, Onodera M, Matsumoto K, Oshima M, Asano M, Saya H, Okano H, Suda T, Hamada J and Hirao A. : Identification of tumor-initiating cells in a highly aggressive brain tumor using promoter activity of nucleostemin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 106(40):17163-17168, 2009.

Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Ohnuki M, Ogawa D, Ikeda E, Okano H and Yamanaka S. : Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines *Nature Biotechnol.* 27(8):743-745, 2009. (*H. Okano is the corresponding author in this paper)

Hamanoue M, Matsuzaki Y, Sato Ki, Okano HJ, Shibata S, Sato I, Sadafumi Suzuki S, Ogawara M, Takamatsu K and Okano H. : Cell surface N-glycans mediated isolation of mouse neural stem cells. *J. Neurochem.* 110(5):1575-1584, 2009.

Oishi K, Watatani K, Itoh Y, Okano H, Guillemot F, Nakajima K and Gotoh Y. : Selective induction of neocortical GABAergic neurons by the PDK1-Akt pathway through activation of Mash1. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 106(31):13064-13069, 2009.

Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamioka M, Sotomaru Y, Hirakawa R, Eto T, Shiozawa S, Maeda T, Ito R, Kito C, Yagihashi C, Kawai K, Miyoshi H, Tanioka Y, Tamaoki N, Habu S, Okano H and Nomura T. : Efficient generation of transgenic nonhuman primates using common marmoset embryos. *Nature*, 459(7246):523-527, 2009. (*H. Okano is the corresponding author in this paper)

Kiso M, Tanaka S, Saba R, Matsuda S, Shimizu A, Ohyama M, James-Okano H, Shiroishi T, Okano H and Saga Y. : Cyclic alopecia caused by the disruption of Sox21- mediated hair shaft cuticle differentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 106(23):9292-9297.

Okano H and Temple S. : Cell types to order: Temporal specification of CNS stem cells. *Current Opinion in Neurobiology*, 19: 112-119, 2009.

[中島 欽一]

Kohyama J., Sanosaka T., Tokunaga A., Takatsuka E., Tsujimura K., Okano H., Nakashima K. BMP-induced REST regulates the establishment and maintenance of astrocytic identity. *J Cell Biol* in press.

Juliandi B., Abematsu M., Nakashima K. Epigenetics, Stem cells and Cellular differentiation. in *Handbook of epigenetics: The new molecular and medical genetics* (eds. Tollefsbol T.O.) (Elsevier) in press.

Asano H., Aonuma M., Sanosaka T., Kohyama J., Namihira M., Nakashima K. Astrocyte Differentiation of Neural Precursor Cells is Enhanced by Retinoic Acid Through a Change in Epigenetic Modification. *Stem Cells* 27, 2744-2752 (2009).

Kuwabara T., Hsieh J., Muotri A., Yeo G., Warashina M., Lie D.C., Moore L., Nakashima K., Asashima M., Gage F.H. Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat Neurosci* 12, 1097-1105 (2009).

Tsujimura K., Abematsu M., Kohyama J., Namihira M., Nakashima K. Neuronal differentiation of neural precursor cells is promoted by the methyl-CpG-binding protein MeCP2. *Exp Neurol* 219, 104-111 (2009).

Suzuki A., Raya A., Kawakami Y., Morita M., Matsui T., Nakashima K., Gage F.H., Rodriguez-Esteban C., Izpisua Belmonte J.C. Maintenance of embryonic stem cell pluripotency by Nanog-mediated dedifferentiation of committed mesoderm progenitors. in *Regulatory networks in stem cells* (eds. Rajasekhar, V.K. & Vemuri, M.C.) 37-53 (Humana Press, New York, 2009).

[野尻 俊輔]

Nojiri S, Nakao H, Sugauchi F, Miyaki T, Senda K, Sasaki M, Kataoka H, Kamiya T, Nakazawa T, Ohara H, Orito E, Joh T. Effect of ursodeoxycholic acid on serum liver enzymes and bile acid metabolism in chronic active hepatitis C virus infection. *Hepatol Res.* Jan;39(1):21-30. 2009.

[島田 昌一]

Ueda T, Ugawa S, Ishida Y, Hondoh A, Shimada S. Development of Generic Calcium Imaging Assay for Monitoring Gi-Coupled Receptors and G-Protein Interaction. *J Biomol Screen.* 2009; 14, 781-788.

2.学会発表

[澤本 和延]

澤本和延. Neuronal migration in the adult brain seminar in Chinese Academy of Sciences. 中国科学院生物物理学研究所(北京). 2009.

澤本和延. Ependymal Cilia in the Adult Brain: Development, Movement and Function「成体脳上衣繊毛の発生・運動・機能」第47回日本生物物理学会シンポジウム From protein motors to cell motility: regulation, coordination and integration. 徳島文理大学およびアスティとくしま. 2009.

澤本和延. 成体脳のニューロン新生: 脳に内在する神経再生機構. 第14回静岡健康・長寿学術フォーラム. 2009.

Sawamoto, K. Adult neurogenesis: a conserved mechanism for brain maintenance and repair. Kumamoto University G-COE Summer Retreat. 2009

澤本和延. 脳室上衣繊毛の発生と機能 第61回日本細胞生物学会大会 ミニシンポジウム「繊毛研究の新展開」. 2009

澤本和延. 脳に内在する神経再生機構 第50回日本神経学会総会 シンポジウム「中枢

神経系の再生・次なる半世紀」.
2009

澤本和延. 虚血性脳疾患の再生医療を目指した幹細胞生物学. 第8回再生医療学会 シンポジウム 1 「幹細胞生物学」. 2009.

[金子 奈穂子]

Shinohara R, Kamijo H, Kaneko N, Sawamoto K, Hioki H, Kaneko T, Watanabe K, Takebayashi H, Ishizaki T, Furuyashiki T, Narumiya S. Roles of mDia, a Rho effector, in neural development. 第32回日本分子生物学会年会・パシフィコ横浜・2009

Sawada M, Kaneko N, Wake H, Inada H, Kato Y, Yanagawa Y, Nemoto T, Nabekura J, Sawamoto K. In vivo imaging of sensory input-dependent neurogenesis in the adult olfactory bulb. 第32回日本神経科学大会 名古屋国際会議場・2009

Kako E, Kaneko N, Hida H, Sobue K, Togari T, Sawamoto K. Enhanced oligodendrogenesis and neurogenesis in the subventricular zone of neonatal mouse brain following Hypoxia/ischemia. 第32回日本神経科学大会 名古屋国際会議場・2009

Kaneko N, Marín O, Koike M, Hirota Y, Murakami F, Wu J, Uchiyama Y, Tessier-Lavigne M, Alvarez-Buylla A, Okano H, Rubenstein J and Sawamoto K. Slit-Robo signaling regulates the migration of new neurons under physiological and pathological conditions. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences・国立京都国際会館

Kaneko N, Marín O, Hirota Y, Rubenstein J, Murakami F, Alvarez-Buylla A, Okano H, Tessier-Lavigne M and Sawamoto K. Slit-Robo signaling regulates migration of newly-born neurons under physiological and pathological conditions in the postnatal brain. 第52回日本神経化学会 (2009)、伊香保温泉 (シンポジウム)

金子奈穂子, Marín O, 小池正人, 廣田ゆき, 村上富士夫, Wu J, 内山安男, Tessier-Lavigne M, Alvarez-Buylla A, 岡野栄之, Rubenstein J, 澤本和延. Slit-Robo シグナルによる新生ニューロンの移動制御機構 木曾生物学セミナー・岡崎

[岡野 栄之]

International Society for Stem Cell Research, 7th annual meeting. Concurrent Session. "Sox21, a regulator of adult neurogenesis in mouse hippocampus" 2009年7月10日、Barcelona, Spain

第32回日本神経科学大会 シンポジウム "Distinct roles of Sox family transcription factors in adult neurogenesis" 2009年9月16日、名古屋

Neuroscience 2009. Satellite Symposium. "Sox and Notch signaling interaction regulates adult neurogenesis in mouse hippocampus" 2009年10月19日、Chicago, USA

[中島 欽一]

辻村啓太、鈴木暁也、中島欽一: Rett 症候群原因遺伝子産物 MeCP2 の機能解析、第4回神経発生討論会、岡崎コンファレンスセンター、2010年3月19-20日

高木美智、滝沢琢己、笹岡寛敏、中島欽一: ニューロン活動依存的に発現する遺伝子の核内空間配置解析、第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

Sasaoka, H., Takizawa, T., Kimura, H., Nakashima, K.: Analysis of chromatin modifications and transcriptional regulations of activity-dependent genes in post-mitotic neurons、第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

Urayama, S., Takizawa, T., Hori, Y., Kohyama, J., Nakashima, K.: Analysis of DNA methylation-independent regulatory mechanisms of astrocyte specific gene expression、第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

Sanosaka, T., Inubushi, H., Kohyama, J., Takizawa, T., Nakashima, K.: A source of astrocyte-inducing cytokines in the developing mouse brain、第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

Berry, J., Tsujimura, K., Abematsu, M., Kohyama, J., Nakashima, K.: The Role of Histone Acetylation on Cortical Development、第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

浅野弘嗣、青沼真、佐野坂司、神山淳、波平昌一、中島欽一: レチノイン酸誘導性ヒストンアセチル化による神経幹細胞のアストロサイト分化促進機構、第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

畑田出穂、波平昌一、森田純代、堀居拓郎、木村美香、中島欽一: Astrocyte-specific genes are generally demethylated in neural precursor cells prior to astrocytic differentiation、第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

中島欽一: 脊髄損傷に対するエピジェネティック治療、第32回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2009年9月16-18日 (シンポジウム、口頭)

精松昌彦、辻村啓太、山野真利子、斉藤美知子、河野憲二、神山淳、波平昌一、小宮節郎、中島欽一: 移植神経幹細胞のエピジェネティック制御による損傷脊髄再生治療、第32回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2009年9月16-18日

佐野坂司、波平昌一、神山淳、蟬克憲、田賀哲也、中島欽一: 神経幹細胞のアストロサイト分化能獲得を制御するエピジェネティクス機構、第32

- 回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2009年9月16-18日(シンポジウム、口頭)
- 中島欽一:メチル化DNA結合タンパク質による神経系細胞の分化・可塑性制御、神経化学会-GRT研究会連携オープンシンポジウム、伊香保温泉ホテル天坊、2009年6月21日(シンポジウム、口頭)
- 滝沢琢己、中島欽一:アストロサイト特異的遺伝子GFAP発現制御に関するDNAメチル化と遺伝子座核内配置、第52回日本神経化学会大会、伊香保温泉ホテル天坊、2009年6月21-24日(シンポジウム、口頭)
- 中島欽一:神経幹細胞が生み出す細胞の順番付けの仕組み、第52回日本神経化学会大会、伊香保温泉ホテル天坊、2009年6月21-24日(シンポジウム、口頭)
- 滝沢琢己、Tom Misteli、中島欽一:アストロサイト特異的遺伝子GFAPの核内配置と転写活性、第3回日本エピジェネティクス研究会年会、東京学術総合センター、2009年5月22-23日
- 辻村啓太、精松昌彦、神山淳、波平昌一、中島欽一:メチル化DNA結合タンパク質MeCP2によるニューロン分化誘導機構と中枢神経系再生医療への応用、第3回日本エピジェネティクス研究会年会、東京学術総合センター、2009年5月22-23日
- 笹岡寛敏、滝沢琢己、中島欽一:ニューロンでの遺伝子発現におけるエピジェネティック修飾の解析、第3回日本エピジェネティクス研究会年会、東京学術総合センター、2009年5月22-23日
- 蟬克憲、波平昌一、神山淳、佐野坂司、中島欽一:第7回幹細胞シンポジウム、Committed neuronal precursors confer astrocyte-differentiation potential on neural stem cells through Notch-signal mediated DNA demethylation during mouse brain development、泉ガーデンギャラリー、2009年5月15-16日(シンポジウム、口頭)
- (国際学会)
- Nakashima, K.: Mechanism in sequential differentiation of neural stem cells mediated by neuron-stem cell interaction. The 1st International Global COE Symposium. Gonryo Hall, Sendai, Japan. December7-8, 2009 (oral)
- Takizawa, T., Sasaoka, H., Takagi, M., Kimura, H., Nakashima, K.: The spatio-temporal regulation of activity-dependent genes in post-mitotic neurons. The 4th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest. OIST Seaside House. Okinawa, Japan. November29-December 3, 2009
- Nakashima, K.: Mechanism for sequential acquisition of differentiation potential of neural stem cells. The 22nd Biennial Meeting of the ISN/PSN 2009. Busan, Korea. August 23-25, 2009 (Symposium oral)
- Nakashima, K.: Epigenetic Regulations for Neural Cell Differentiation and Plasticity. Lasker/IRRF Initiative for Innovation in Vision Research, J.Erik Jonsson Center, Woods Hole, Massachusetts. July13-15, 2009 (oral)
- Sanosaka, T., Namihira, M., Kohyama, J., Semi, K., Benjamin, D., Taga, T., Nakashima, K.: COMMITTED NEURONAL PRECURSORS CONFER ASTROCYTE-DIFFERENTIATION POTENTIAL ON NEURAL STEM CELLS THROUGH NOTCH SIGNAL MEDIATED DNA DEMETHYLATION DURING MOUSE BRAIN DEVELOPMENT. ISSCR 7th Annual Meeting. Barcelona, Spain. July8-11, 2009
- Asano, H., Namihira, M., Kohyama, J., Aonuma, M., Sanosaka, T., Nakashima, K.: RETINOIC ACID-INDUCED CHROMATIN REMODELING PROMOTES ASTROCYTE DIFFERENTIATION OF NEURAL STEM CELLS. ISSCR 7th Annual Meeting. Barcelona, Spain. July8-11, 2009
- Kohyama, J., Tsujimura, K., Kirikae, J., Abematsu, M., Takebayashi, H., Nakashima, K.: REGULATION OF NEURAL CELL DIFFERENTIATION PLASTICITY IN ADULT CENTRAL NERVOUS SYSTEM. ISSCR 7th Annual Meeting, Barcelona, Spain. July8-11, 2009
- Takizawa, T., Taga, T., Misteli, T., Nakashima, K.: DYNAMIC CHANGES IN DNA METHYLATION AND SPATIAL POSITIONING OF AN ASTROCYTE SPECIFIC GENE, GFAP DURING ASTROCYTE DIFFERENTIATION. ISSCR 7th Annual Meeting. Barcelona, Spain. July8-11, 2009
- Nakashima, K.: Neuro-to-gliogenic switch triggered by Notch-induced demethylation in neural stem cells. CREST Neuroscience International Symposium. Awaji Yumebutai International Conference Center. June2-3, 2009 (oral)
- [島田 昌一]
- 植田高史、鶴川真也、石田雄介、島田昌一 Gタンパク質との会合を指標にした Gi 共役型受容体アッセイ系の確立. 第52回日本神経化学会大会. 2009年6月21~24日、会場: 群馬県伊香保温泉

H. 知的財産権の出願・登録状況

[岡野 栄之]

1. 特許取得

【平成21年度】国内3件 海外4件

【国内】

(1)

発明の名称 神経幹細胞の増殖誘導方法

出願番号 特願 2003-578547

特許番号 特許第 03984959 (2009.7.13)

出願人 株式会社G B S 研究所

発明者 戸田 正博、岡野 栄之、河上 裕、戸山 芳昭、三上 裕嗣、坂口 正徳

(2)

発明の名称 脊髄損傷サルモデルの作成法及びそ

の利用

出願番号 特願 2003-546653

特許番号 特許第 4332650 (2009.7.3)

出願人 独立行政法人科学技術振興機構、学校法人慶應義塾

発明者 岡野 栄之、戸山 芳昭、中村 雅也、野村 達次、谷岡 功邦、安東 潔、金村 米博

(3)

発明の名称 記憶障害治療剤

出願番号 特願 2003-559527

特許番号 特許第 4374469 (2009.9.18)

出願人 独立行政法人科学技術振興機構、学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、島崎琢也、長尾省吾、松本義人

【海外】

(1)

発明の名称 インターロイキン-6 アンタゴニストを含有する脊髄損傷治療剤

出願番号 ロシア 2005130011

特許番号 ロシア 2358761 (2009.6.20)

出願人 中外製薬(株)、学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、岡田誠司、中村雅也、吉崎和幸

(2)

発明の名称 インターロイキン-6 アンタゴニストを含有する脊髄損傷治療剤

出願番号 オーストラリア 2004212843

特許番号 オーストラリア

2004212843(2009.10.08)

出願人 中外製薬(株)、学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、岡田誠司、中村雅也、吉崎和幸

(3)

発明の名称 神経幹細胞の増殖抑制剤

出願番号 アメリカ 11/704,185

特許番号 特許査定 (2009.9.29)

出願人 学校法人慶應義塾、(独)産業技術総合研究所

発明者 岡野栄之、坂口昌徳、澤本和延、平林淳

2.実用新案登録

なし

3.その他

[岡野 栄之]

出願特許

【平成21年度】(国内2 国外4)

【国内】

(1)

発明の名称 シュワン前駆細胞の製造方法及び増殖方法

出願番号(出願日):特願 2009-178340 (2009.7.30)

出願人名 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、中村雅也、戸山芳昭、石井賢、高木岳彦

(2)

発明の名称 分化細胞由来多能性幹細胞の樹立方法

出願番号(出願日):特願 2009-181009 (2009.8.3)

出願人名 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、松崎有未、新部邦透、森川暁、馬淵洋、永井康夫

【国外】

(1)

発明の名称 人工多能性幹細胞の選択方法

出願番号(出願日): アメリカ 61/217,362

(2009.5.29)

出願人名 学校法人慶應義塾、国立大学法人京都大学

発明者 岡野栄之、岡田洋平、山中伸弥、三浦恭子

(2)

発明の名称 分化細胞由来誘導多能性幹細胞由来の二次ニューロスフェアの選択方法、その選択方法によって選択されたクローン、及びそのクローンの使用方法

出願番号(出願日): PCT/JP2009/003755 (2009.8.5)

基礎出願(優先日):アメリカ 61/086,369 (2008.8.5)

出願人名 学校法人慶應義塾、国立大学法人京都大学

発明者 岡野栄之、中村雅也、辻取彦、山中伸弥、三浦恭子

(3)

発明の名称 神経分化促進剤

出願番号(出願日): PCT/JP2009/003195 (2009.7.8)

基礎出願(優先日):アメリカ 61/088,521 (2008.8.13)

出願人名 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、島崎琢也、仲勇人

(4)

発明の名称 神経幹細胞製造方法

出願番号(出願日): PCT/JP2009/005856 (1009.11.4)

基礎出願(優先日):アメリカ 61/198,365 (2008.11.5)

出願人名 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、赤松和土

2. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

マウスモデルを用いたインターフェロン療法における海馬神経幹細胞機能の変化と
うつ病発症に関する基礎研究

研究代表者 澤本 和延 名古屋市立大学大学院医学研究科再生医学分野・教授
研究分担者 金子 奈穂子 名古屋市立大学大学院医学研究科再生医学分野・助教
研究協力者 鄭 蓮順 名古屋市立大学大学院医学研究科再生医学分野・助教

研究要旨

タイプ I インターフェロン (IFN- α 、 β) は抗ウイルス効果として C 型肝炎治療に有効性が認められているが、うつ等の精神症状が治療中断に至る副作用として問題となっている。しかしながら、IFN 投与によるうつ発症のメカニズムは未解明である。我々はこれまでに IFN- α が海馬神経幹細胞の増殖を抑制することを報告した。本研究では、IFN の神経幹細胞・前駆細胞・新生ニューロンへの作用を個体・細胞・分子レベルで詳細に解析し、各種 IFN の作用の差異、抑うつ行動との関連を明らかにし、IFN 療法におけるサブタイプ選択・うつ病予防/対策に関する科学的基盤となる情報を提示する。

A.研究目的

タイプ I インターフェロン (IFN- α 、 β) は非常に有用な抗ウイルス薬として慢性 C 型肝炎治療に汎用されているが、高頻度にうつ病などの精神症状を惹起する。しかしながら、これらの有害作用の発症機序は同定されておらず、重大な治療阻害因子となっている。

成体脳の一部では、ニューロンが生涯にわたって産生され続けており、これらが感情・情動や記憶・学習など様々な脳機能に影響を与えることが近年の研究で明らかになってきた。我々はこれまでに、IFN- α が成体海馬の神経幹細胞の増殖を抑制することを報告したが (Kaneko et al, Neuropsychopharmacology, 2006)、そのメカニズムは不明である。本研究では、IFN の神経幹細胞・前駆細胞・新生ニューロンへの作用をマウス個体・培養細胞を用いて、行動学的・組織学的解析とともに、細胞レベル・分子レベルで詳細に解析し、各種 IFN の作用の差異、抑うつ行動との関連を明らかにし、臨床現場での IFN 療法におけるサブタイプ選択・うつ病予防や対策に関する科学的基盤となる情報を提示する。

B.研究方法

1) IFN 投与マウスモデルの作製・組織学的解析

成体マウスにチミジン類似体で細胞周期 S 期特異的に DNA に取り込まれる BrdU を 2 時間毎に 3 回腹腔内投与して新生細胞の標識を行い、ヒト PEG-IFN- α (3 μ g/kg・15 μ g/kg) または生理食塩水を週一回、4 週にわたって皮下投与した。

IFN 投与終了後のマウスを灌流固定し、脳組織切片を作製し、海馬・脳室下帯において BrdU 標識された新生細胞の成熟ニューロンへの分化について、増殖マーカー Ki67、成熟ニューロンマーカー NeuN の免疫染色を用い、これらを顕微鏡下で定量した。また、脳における IFN シグナル活性化の可能性について検討するため、IFN シグナルの下流分子である STAT1 についても免疫染色を行った。

2) RT-PCR・ウェスタンブロッティング(WB)

IFN 受容体の成体脳における発現パターンの解析のため、海馬を含む各領域について RT-PCR・ウェスタンブロッティングにより mRNA・タンパク質の検出を行った

(倫理面への配慮)

本実験は名古屋市立大学動物実験規定に基づき行ったものである。

C.研究結果

1)高用量のヒト PEG-IFN- α (15 μ g/kg)により、BrdU 標識された成熟新生ニューロン数・BrdU 標識細胞における成熟ニューロンマーカー発

現率ともに減少傾向であったが、統計学的な有意差は認めなかった。

ヒト PEG-IFN- α 投与により、神経幹細胞の存在する側脳室周囲組織において STAT1 陽性細胞が見られ、その発現レベルは投与量依存性に上昇した。

2)成体マウス海馬では、IFN 受容体 (IFNAR1・IFNAR2)mRNA・蛋白質が発現していることを RT-PCR と WB を用いて確認した。また嗅球、大脳皮質、小脳においても IFNAR1・IFNAR2 の発現が見られた。

D. 考察

今回の実験では、PEG-IFN- α の投与により、ニューロン新生が抑制される傾向は認められたが、統計学的に有意なものではなかった。これについては、新生細胞の標識効率が悪かったことや、IFN の投与期間・作用の種特異性が原因として考えられる。現在、BrdU 投与方法の変更し、マウス IFN α を用いた実験を施行中である。

しかし、PEG-IFN α の末梢投与によって、脳室周囲組織で IFN シグナルの下流分子である STAT1 発現が濃度依存的に上昇しており、IFN シグナルが脳内で活性化されたことが示唆された。側脳室壁は神経幹細胞を豊富に含んでおり、この現象は大変興味深い。今後 STAT1 発現細胞の細胞種・分布について詳細に解析していく。

IFN 受容体は、中枢神経系細胞でもユビキタスに発現していることが知られており、我々の実験でも海馬を含む脳内各領域において IFN 受容体の発現が確認された。次年度は、これらの部位における受容体発現細胞の同定を行う。

次年度は、今年度の研究結果に基づき IFN の投与量・投与期間を変更したマウスモデルの解析とともに、IFN β 製剤についても同様の実験を行い、比較検討する。

E. 結論

ヒト PEG-IFN- α を投与したマウスでは、脳室周囲において IFN シグナルの活性化が生じ、ニューロン新生が抑制される可能性が示唆された。今後、IFN の種類・投与量・投与期間を検討する必要があると判断した。

G. 研究発表

1. 論文発表

(英文)

Guirao, B., Meunier, A., Mortaud, S., Aguilar, A., Corsi, J.-M., Strehl, L., Hirota, Y., Desoeuvre, A., Boutin,

C., Han, Y.-G., Mirzadeh, Z., Cremer, H., Montcouquiol, M., Sawamoto, K., and Spassky, N. Mammalian motile cilia orientation requires coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity. *Nat. Cell Biol.* in press Kojima, T., Hirota, Y., Ema M., Takahashi, S., Miyoshi, I., Okano, H., Sawamoto, K.

Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. *Stem Cells* in press

Oki, K., Kaneko, N., Kanki, H., Imai, T., Suzuki, N., Sawamoto, K., Okano, H. Musashi 1 as a marker of reactive astrocytes after transient focal brain ischemia. *Neurosci Res* in press

Tamase A, Muraguchi T, Naka K, Tanaka S, Kinoshita M, Hoshii T, Ohmura M, Shugo H, Ooshio T, Nakada M, Sawamoto K, Onodera M, Matsumoto K, Oshima M, Asano M, Saya H, Okano H, Suda T, Hamada J, Hirao A.

Identification of tumor-initiating cells in a highly aggressive brain tumor using promoter activity of nucleostemin.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105

(46):18012-18017, 2009.

Huang S, Hirota Y, Sawamoto K. Various facets of vertebrate cilia: motility, signaling, and role in adult neurogenesis.

Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 85: 324-36, 2009.

Kaneko N, Sawamoto K.

Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions.

Neurosci Res 63(3):155-64, 2009.

Enomoto, A., Asai, N., Namba, T., Wang, Y., Kato, T., Tanaka, M. Tatsumi, H., Taya, S., Tsuboi, D., Kuroda, K., Kaneko, N., Sawamoto, K., Miyamoto, R., Jijiwa, M., Murakumo, Y., Sokabe, M., Seki, T., Kaibuchi, K., Takahashi, M.

Roles of Disrupted-In-Schizophrenia

1-Interacting Protein Girdin in Postnatal

Development of the Dentate Gyrus

Neuron 63: 774-787, 2009.

Suzuki, T., Miyamoto, H., Nakahari, T., Inoue, I., Suemoto, T., Jiang, b., Hirota, Y., Itohara, S., Saido, T.C., Tsumoto, T., Sawamoto, K., Hensch, T.K., Delgado-Escueta, A.V., Yamakawa, K.

Efhc1 deficiency causes spontaneous myoclonus and increased seizure susceptibility

Hum. Mol. Genet. 18(6): 1099-1109, 2009.

(和文)

金子奈穂子, 澤本和延. 海馬ニューロンの新生と精神神経疾患. *総合リハビリテーション* 38

- (2): 114-120, 2010.
- 匹田貴夫, 澤本和延. 成体の脳組織における神経幹細胞と再生医療. *医学のあゆみ* 231 (11): 1112-1116, 2009.
- 加古英介, 金子奈穂子, 祖父江和哉, 澤本和延. 細胞移植を用いない脳死間再生医療の可能性. *生物物理化学* 53(4): 103-107, 2009.
- 黄詩恵, 廣田ゆき, 澤本和延. 神経組織における繊毛の役割. *細胞工学* 28(10): 1016-1020, 2009.
- 澤本和延. 脳に内在する神経再生機構. *臨床神経学* 49(11): 830-833, 2009.
- 小島拓郎, 廣田ゆき, 澤本和延. 成体脳におけるニューロン新生. *慶應医学* 85(2): 169-177, 2009.
- 黄詩恵, 廣田ゆき, 澤本和延. 発達期における上衣細胞繊毛の成熟と脳脊髄液循環. *小児の脳神経* 34(1): 10-15, 2009.

2.学会発表

- 澤本和延. Neuronal migration in the adult brain seminar in Chinese Academy of Sciences. 中国科学院生物物理研究所 (北京). 2009.
- 澤本和延. Ependymal Cilia in the Adult Brain: Development, Movement and Function 「成体脳上衣繊毛の発生・運動・機能」第47回日本生物物理学会シンポジウム From protein motors to cell motility: regulation, coordination and integration. 徳島文理大学およびアステイトくしま. 2009.
- 澤本和延. 成体脳のニューロン新生: 脳に内在する神経再生機構. 第14回静岡健康・長寿学術フォーラム. 2009.
- Sawamoto, K. Adult neurogenesis: a conserved mechanism for brain maintenance and repair. Kumamoto University G-COE Summer Retreat. 2009
- 澤本和延. 脳室上衣繊毛の発生と機能 第61回日本細胞生物学会大会 ミニシンポジウム「繊毛研究の新展開」. 2009
- 澤本和延. 脳に内在する神経再生機構 第50回日本神経学会総会 シンポジウム「中枢神経系の再生・次なる半世紀」. 2009
- 澤本和延. 虚血性脳疾患の再生医療を目指した幹細胞生物学. 第8回再生医療学会 シンポジウム1「幹細胞生物学」. 2009.

H.知的財産権の出願・登録状況
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

霊長類モデルを用いたインターフェロン治療における幹細胞機能の変化と
うつ病発症に関する基礎研究

研究分担者 金子 奈穂子 名古屋市立大学大学院医学研究科再生医学分野・助教

研究要旨

インターフェロン(IFN)は抑うつをはじめとする精神症状を惹起し、これらの有害作用は治療完遂の妨げとなっているが、そのメカニズムは不明である。近年、成体脳に存在する神経幹細胞・新生ニューロンの機能と抑うつ状態との関連が示唆されており、我々はこれまでに、げっ歯類脳においてIFNが神経幹細胞・前駆細胞の増殖を抑制することを見いだした。本研究では、IFNが神経幹細胞・前駆細胞機能に与える影響を、霊長類モデルを用いて検証し、抑うつ行動との関連性を明らかにする。

A.研究目的

IFNは抗ウイルス薬として慢性ウイルス性肝炎治療において重要であるが、高頻度に抑うつ状態を惹起し、これらは治療完遂の妨げとなっている。しかしその発症メカニズムは不明である。

近年、発達期を終えた成体脳にも神経幹細胞が存在することが明らかになった。これらが産生した新生ニューロンは神経の可塑性・再生に寄与し、精神症状との関連も示唆されている。我々はこれまでに、IFN- α がげっ歯類の海馬において神経幹細胞・前駆細胞の増殖を抑制することを明らかにしており(Kaneko et al, 2006)、この作用は抑うつ状態の誘発と関連するものであると考えられる。

霊長類脳とげっ歯類では、脳の基本構造は非常に類似しているが、多くの差異も認められる。そこで本研究では、霊長類であるコモンマーモセットを用い、神経幹細胞機能へのIFNの作用の解析を行う。マーモセットは、家族単位で生活する高い社会性を有し、精神症状の観察に非常に有用である。本研究では、脳組織学的解析と同時に行動学的変化の関連についても検討を行う。

B.研究方法

IFN投与モデルの作製に向けて、新生細胞標識法・免疫染色法の検討を行った。増殖細胞の核に取り込まれるチミジン類似体であるBrdUを用いて新生細胞の標識を行った。BrdUを14日間投与し、投与終了28日後に灌流固定した成体マーモセット脳をピプラトームで薄切し、実験に用いた。BrdU染色による新生細胞の検

出、ニューロン・アストロサイト・オリゴデンドロサイト各種細胞系譜のマーカーとの二重染色を行い、マーモセット脳の染色条件の検討・新生細胞のBrdU標識効率・新生細胞の分化を、共焦点顕微鏡を用いて観察した。

(倫理面への配慮)

本実験は名古屋市立大学動物実験規定に基づき行ったものである。

C.研究結果

マーモセット脳において、BrdU14日間投与により、解析に十分な新生細胞数を標識することができた。BrdU標識細胞の多くは海馬歯状回の顆粒下層または顆粒細胞層の下部に位置し、海馬門にも少数存在した。

免疫染色法により、成熟ニューロン・幼若ニューロン・神経幹細胞・前駆細胞、成熟オリゴデンドロサイト・オリゴデンドロサイト前駆細胞、アストロサイトを同定することができた。BrdUとの二重染色により、歯状回顆粒細胞層のBrdU標識細胞のほとんどは成熟ニューロンに分化しているが、幼若ニューロンのマーカーを発現する新生細胞も少数存在することが分かった。顆粒下層・海馬門には、成熟ニューロン・幼若ニューロンのマーカーを発現しない細胞が混在していた。これらの一部は神経幹細胞/アストロサイトのマーカーであるGFAPを発現していた。

D.考察

成体マーモセット海馬でも活発にニューロンが新生されており、今回行ったBrdU標識法により、多数の新生細胞を検出することができ

た。また、これらの細胞は、げっ歯類と同様に大部分はニューロンに分化することが確認できた。しかし、新生細胞の一部は幼若ニューロンマーカーを発現しており、28日間では成熟しない細胞も存在することが考えられた。

これらの結果に基づき、次年度に行う IFN 投与モデル作製における BrdU 投与法・IFN 投与期間・固定時期の決定を行った。

E. 結論

本年度の研究で、マーマセツト海馬における BrdU を用いた新生細胞の標識効率・分化を解析し、IFN モデル作製プロトコルの検討を行った。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Oki K, Kaneko N, Kanki H, Imai T, Suzuki N, Sawamoto K, Okano H.

Musashil as a marker of reactive astrocytes after transient focal brain ischemia.

Neurosci Res, in press

2) 金子奈穂子・澤本和延

海馬ニューロンの新生と精神神経疾患.

総合リハビリテーション

38(2):114-120(2010)

3) Enomoto A, Asai N, Namba T, Wang Y, Kato T, Tanaka M, Tatsumi H, Taya S, Tsuboi D, Kuroda K, Kaneko N, Sawamoto K, Miyamoto R, Jijiwa M, Murakumo Y, Sokabe M, Seki T, Kaibuchi K, Takahashi M.

Roles of Disrupted-In-Schizophrenia 1-Interacting Protein Girdin in Postnatal Development of the Dentate Gyrus.

Neuron, 63: 774-787 (2009)

4) 加古英介・金子奈穂子・祖父江和哉・澤本和延

細胞移植を用いない脳疾患再生医療の可能性
生物物理化学 53(4): 103-107 (2009)

2. 学会発表

1) Shinohara R, Kamiyo H, Kaneko N, Sawamoto K, Hioki H, Kaneko T, Watanabe K, Takebayashi H, Ishizaki T, Furuyashiki T, Narumiya S.
Roles of mDia, a Rho effector, in neural development.

第32回 日本分子生物学会年会・パシフィコ横浜・2009

2) Sawada M, Kaneko N, Wake H, Inada H, Kato Y, Yanagawa Y, Nemoto T, Nabekura J, Sawamoto K. In vivo imaging of sensory input-dependent neurogenesis in the adult olfactory bulb.

第32回日本神経科学大会 名古屋国際会議場・2009

3) Kako E, Kaneko N, Hida H, Sobue K, Togari T, Sawamoto K.

Enhanced oligodendrogenesis and neurogenesis in the subventricular zone of neonatal mouse brain following Hypoxia/ischemia.

第32回日本神経科学大会 名古屋国際会議場・2009

4) Kaneko N, Marin O, Koike M, Hirota Y, Murakami F, Wu J, Uchiyama Y, Tessier-Lavigne M, Alvarez-Buylla A, Okano H, Rubenstein J and Sawamoto K.

Slit-Robo signaling regulates the migration of new neurons under physiological and pathological conditions.

The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences・国立京都国際会館

5) Kaneko N, Marin O, Hirota Y, Rubenstein J, Murakami F, Alvarez-Buylla A, Okano H, Tessier-Lavigne M and Sawamoto K.

Slit-Robo signaling regulates migration of newly-born neurons under physiological and pathological conditions in the postnatal brain.

第52回日本神経化学会 (2009)、伊香保温泉(シンポジウム)

6) 金子奈穂子, Marin O, 小池正人, 廣田ゆき, 村上富士夫, Wu J, 内山安男, Tessier-Lavigne M, Alvarez-Buylla A, 岡野栄之, Rubenstein J, 澤本和延.

Slit-Robo シグナルによる新生ニューロンの移動制御機構

木曾生物学セミナー・岡崎

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

Sox21 による成体海馬でのニューロン新生の制御

研究分担者 岡野 栄之 慶應義塾大学医学部生理学 教授

研究要旨

成体哺乳類動物の海馬におけるニューロン新生と抗うつ薬の効果との関連が明らかになり、うつ病発症の機序解明を目指し、成体ニューロン新生の制御メカニズムの解明が望まれてきた。研究分担者らは Sox21 欠損マウスを用いた解析により、Sox21 が成体海馬に存在する神経前駆細胞の分化を促進することで、成体ニューロン新生の維持に貢献することを明らかにした。また、ChIP-sequencing 解析などを駆使することで、Sox21 が *Hes5* 遺伝子の発現を転写レベルで抑制することで成体神経前駆細胞の未分化状態を解除し、ニューロン分化を促すことが明らかとなった。以上の結果から、うつ病発症機序の解明に向け、Sox21 の担う生理的意義についての検討の価値が見出された。

A. 研究目的

「哺乳類の中樞神経系は一度損傷を受けると二度と再生しない」というセントラルドグマは、ヒトを含む成体哺乳類動物の脳における神経幹細胞の存在、そして生涯にわたるニューロン新生の発見によって覆された。近年になり、既存の抗うつ薬(SSRI)が海馬・歯状回に存在する神経前駆細胞を標的として成体ニューロン新生を亢進し、抗うつ効果を発揮することが報告された。この知見から、未分化状態にある神経前駆細胞からニューロンへの分化を制御するメカニズムの解明が、うつ病の発症のメカニズムの解明に直結するものと期待される。

転写因子である Sox21 はニワトリ胎仔脊髄において、Sox1/2/3 の作用に拮抗することでニューロン新生を促進し、また、成体海馬の神経前駆細胞においても発現することが確認されている。これらの知見から、Sox21 は成体海馬でのニューロン新生においてもニューロン分化を促進する役割を担うのではないかと推察されるが、実際の Sox21 の機能、およびその分子メカニズムについては不明な部分が多い。そこで研究分担者らは、Sox21 に着目して成体ニューロン新生を司るメカニズムを解明することを試みた。

B. 研究方法

Sox21 の機能を *in vivo* で明らかにするため、Sox21 欠損マウスを作製した。主に BrdU による増殖細胞の標識と、分化マーカーの発現解析により、成体海馬でのニューロン新生を野生型マウスと Sox21 欠損マウスを比較、評価した。

また、Sox21 の機能を分子生物学的に検討するために、全ゲノム免疫沈降シークエンス(ChIP-sequencing)を利用した Sox21 の標的遺伝子の網羅的探索を基盤に、Sox21 の下流で動く分子メカニズムの解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で使用した実験動物の取り扱いは全て慶應義塾大学医学部動物実験委員会の承認の下に行われた。

C. 研究結果

Sox21 は成体マウス海馬において、歯状回の顆粒細胞下帯に位置する神経幹細胞と神経前駆細胞に選択的に発現していた。成体 Sox21 欠損マウスの海馬では、野生型マウスと比較してニューロン新生の効率が大きく低下する一方で、神経前駆細胞数は異常に拡大していた。また、Sox21 を欠損した神経前駆細胞では、ニューロンへの分化ステージへの移行が阻害された。さらに、成体海馬に存在する神経前駆細胞への Sox21 の強制発現により、ニューロン分化が亢進することが確認された。以上から、Sox21 は成体海馬でのニューロン新生を亢進する役割を担うことが明らかとなった。

ChIP-sequencing による網羅的解析の結果、Sox21 は *Hes5* 遺伝子の新規の転写調節領域に結合し、*Hes5* の発現を転写レベルで抑制することが明らかとなった。加えて、成体マウス歯状回における *Hes5* の強制発現は、Sox21 によるニューロン分化亢進作用を抑制し、一方で *Hes5* の発現抑制はニューロン分化を促進することを見出した。以上の結果から、成体マウス

歯状回において Sox21 は Hes5 の発現を抑制することで、神経前駆細胞からニューロンへの分化を促すことが明らかとなった。

D. 考察

本研究により、Sox21 が成体ニューロン新生を制御する因子の一つであることが証明された。in vivo において Sox21 は神経前駆細胞のニューロン分化の促進を担うことから、Sox21 は未分化状態から分化ステージへの移行のタイミングを調節すると考えられ、新生ニューロンの数や性質を決定づける役割を担うのではないかと推察される。SSRI の抗うつ効果と成体神経前駆細胞の分化の関連を踏まえると、Sox21 とうつ病発症のメカニズムの関連に注目することは高い価値があると考えられる。今後は、Sox21 のプロモーター解析による Sox21 の発現制御の解明、あるいは条件付き Sox21 欠損マウスを用いた行動解析などにより、成体ニューロン新生とうつ病発症メカニズムの関連についてのさらなる基礎的知見を提供することが目標である。

E. 結論

Sox21 は成体マウス海馬におけるニューロン新生の制御を担う転写因子であった。Sox21 は成体海馬に存在する神経前駆細胞に選択的に発現しており、Hes5 の発現を抑制することによりその未分化状態を解除し、ニューロンへの分化ステージへの移行を亢進していた。Sox21 が成体ニューロン新生に対して担う生理的意義についてのさらなる検討が、うつ病発症機序の解明に貢献するものと期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1)

Matsuda S, Okano HJ, Tsutsumi S, Aburatani H, Saga Y, Matsuzaki Y, Akaike A, Sugimoto H and Okano H. : Sox21 promotes hippocampal adult neurogenesis through the transcriptional repression of Hes5 gene (submitted to *Neuron*)

2)

Kanki H, Shimabukuro MK, Miyawaki A and Okano H. : "Color Timer" mice: visualization of neuronal differentiation with fluorescent proteins. *Mol. Brain* (in press) 2010.

3)

Kojima T, Hirota Y, Ema M, Takahashi S, Miyoshi I, Okano H and Sawamoto K. : Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. *Stem Cells*. 2010. Jan 13. [Epub ahead of print]

4)

Tada H, Okano HJ, Takagi H, Shibata S, Matsumoto M, Yao I, Saiga T, Nakayama KI, Kashima H, Takahashi T, Setou M and Okano H. : Fbxo45, a novel ubiquitin ligase, regulates synaptic activity. *J. Biol. Chem.* 2009 Dec 7. [Epub ahead of print]

5)

Kumagai G, Okada Y, Yamane J, Kitamura K, Nagoshi N, Mukaino M, Tsuji O, Fujiyoshi K, Okada S, Shibata S, Toh S, Toyama Y, Nakamura M and Okano H. : Roles of ES Cell-Derived Gliogenic Neural Stem/ Progenitor Cells in Functional Recovery after Spinal Cord Injury *PLOS ONE* 4(11):e7706, 2009.

6)

Tamase A, Muraguchi T, Naka K, Tanaka S, Kinoshita M, Hoshi T, Ohmura M, Shugo H, Ooshio T, Nakada M, Sawamoto K, Onodera M, Matsumoto K, Oshima M, Asano M, Saya H, Okano H, Suda T, Hamada J and Hirao A. : Identification of tumor-initiating cells in a highly aggressive brain tumor using promoter activity of nucleostemin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106(40):17163-17168, 2009.

7)

Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Ohnuki M, Ogawa D, Ikeda E, Okano H and Yamanaka S. : Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines *Nature Biotechnol.* 27(8):743-745, 2009. (*H. Okano is the corresponding author in this paper)

8)

Hamanoue M, Matsuzaki Y, Sato Ki, Okano HJ, Shibata S, Sato I, Sadafumi Suzuki S, Ogawara M, Takamatsu K and Okano H. : Cell surface N-glycans mediated isolation of mouse neural