

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22122009

研究課題名（和文）血管由来の細胞外因子による神経幹細胞の制御

研究課題名（英文）The regulation of neural stem cells niche by the soluble molecule secreted from the blood vessel

研究代表者

太田 訓正（OHTA, KUNIMASA）

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：90244128

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 82,700,000円

研究成果の概要（和文）：Tsukushi KOマウスでは、側脳室下帯領域における神経幹細胞の制御が乱れていました。また、Tsukushi KOマウスでは側脳室拡張が観察されますが、神経特異的なcreマウスや血管特異的なcreマウスを用いたトランスジェニックマウスでは、側脳室の拡張がレスキューされました。さらに、Cre-loxPシステムを用いてTsukushi遺伝子の欠損を行い、血管周皮細胞特異的なマウスを用いた場合には、側脳室の拡張が誘導されましたが、血管内皮細胞特異的なマウスを用いた場合では誘導されませんでした。これらの結果は、Tsukushiが中枢神経系の幹細胞ニッチ制御に関与していることを示唆するものです。

研究成果の概要（英文）：We found that Tsukushi is expressed in the subventricular zone (SVZ) in the lateral ventricles (LV). In the Tsukushi KO mouse brain, both the cell proliferation and the cell death in the SVZ were increase compared to those of the wild type brain. To examine the involvement of Tsukushi protein for niche regulation, we generated the transgenic mice that express the Tsukushi protein. When Tsukushi protein was produced at the SVZ, the expansion of LV was rescued. We used cre-loxp system to specifically delete Tsukushi gene in the SVZ area. When we use SM22-cre mouse, the LV expansion was observed but not with Tie2-cre mouse. We also examined the deletion of Tsukushi gene in the nervous system and found that both the nestin-cre and sox2-cre mice did not show the LV expansion. We are now preparing FOXJ1-cre mouse, which is specifically expressed ependymal cells. Our data suggested that Tsukushi functions as a niche molecule for the regulation of neural stem/progenitor cells.

研究分野：生物学

キーワード：Tsukushi niche neuron blood vessel

1. 研究開始当初の背景

私達は、新規分泌型タンパク質 Tsukushi を単離し、アフリカツメガエル胚を用いた mRNA 微量注入法や生化学的解析により、Tsukushi が新しい BMP アンタゴニストとして初期の形づくりに重要な役割を持つことを明らかにしました (Ohta et al., Dev. Cell 2004; Kuriyama et al., Development 2006)。

網膜において、Tsukushi が Wnt 受容体である Frizzled に細胞外で結合して、Wnt が持つ細胞増殖活性を阻害し、網膜幹細胞の未分化性維持に関与していることを報告しました (Ohta et al., PNAS 2011)。

脳において、Tsukushi は神経幹細胞が局在する成体側脳室下帯と海馬・歯状回に強い発現していました。また、毛包の幹細胞が局在するバルジ領域にも、Tsukushi の強い発現が観察されました。これらの領域の幹細胞の増殖・分化は Wnt シグナルによって制御されているので、Tsukushi が幹細胞に共通した未分化性維持に関与していることが示唆されました。

2. 研究の目的

成体の脳室下帯に存在する神経幹細胞が正しく維持されるためには、近傍血管に由来する成分 (血管性ニッチ) が重要な働きをもっています。血管性ニッチは、液性因子や細胞外マトリクスから構成されると考えられ、Wnt や BMP シグナルの関与が示唆されていますが、その分子実体は未解明のままです。本申請では、Tsukushi とその受容体の解析をとおして、神経幹細胞の維持機構を制御する血管性ニッチの分子実体に迫ることを目的としました。

3. 研究の方法

(1) Tsukushi 遺伝子過剰発現マウスを用いた in vivo 解析

Tsukushi 遺伝子欠損マウスの脳では、脳室が拡張し、神経幹細胞である B 細胞、B 細胞から分化した C 細胞、さらに A 細胞の増殖が亢進しています。また、同時期に細胞死も誘導されているので、これらの表現型に Tsukushi が関与していることを示すために、トランスジェニックマウスを作製し、細胞増殖や細胞死を調べました。

(2) Cre-loxpシステムを用いた領域特異的 Tsukushi 欠損マウスの解析

Tsukushi を時空間的に欠損させるために、神経系として nestin-cre マウス、sox2-cre マウス、血管系として Tie2-cre マウス、SM22-cre マウスを用いて Tsukushi KO マウスの表現型である脳室の拡張や神経幹細胞

ニッチの制御がレスキューされるか検討しました。

4. 研究成果

(1) Tsukushi KO マウスの顕著な表現型として側脳室拡張が観察されますが、この表現型は神経特異的な cre マウス (Emx1, sox2, nestin) や血管特異的な cre マウス (Tie2, MS22) との掛け合わせによりレスキューされました。これらの結果は、Tsukushi タンパク質が上皮細胞と血管周皮細胞から分泌され、中枢神経系の神経幹細胞ニッチ制御に関わる重要な分子であることを示すものです。

(2) 血管周皮細胞特異的な SM-22-Cre マウスを用いた場合には、側脳室の拡張が誘導されましたが、血管内皮細胞特異的な Tie2-Cre マウスを用いた場合には誘導されませんでした。次に、神経系で欠失させる Cre マウスとして nestin-Cre (ほぼ全ての神経幹細胞と神経前駆細胞) と Sox2-Cre (ほぼ全ての神経幹細胞と神経前駆細胞) を用いましたが、本来 Tsukushi が発現していない領域であることから、側脳室の拡張は誘導されませんでした。現在、アメリカの Holtzman 教授のグループから Tsukushi が発現する上皮細胞特異的な FOXJ1-Cre マウスを入手済みであり、今後は上皮細胞特異的に Tsukushi を欠損させ、その影響を検討します。最終的には、神経ニッチを取り囲む上皮細胞や周皮細胞に発現する Tsukushi が、脳神経幹細胞や前駆細胞の制御を行うことを示す "Surround Support Model" の確立を目指します。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

1. Abdulhaleem M FA, Song X, Kawano R, Uezono N, Ito A, Ahmed G, Hossain M, Nakashima K, Tanaka H, Ohta K. Akhirin regulates the proliferation and differentiation of neural stem cells in intact and injured mouse spinal cord. Dev Neurobiol. 査読有, 2015, May; 75(5): 494-504. doi: 10.1002/dneu.22238. Epub 2014 Oct 30.
2. Ito N, Ohta K. Reprogramming of human somatic cells by bacteria. Dev Growth Differ. 査読有, Apr 10, 2015. doi: 10.1111/dgd.12209. [Epub ahead of print]
3. Daisuke N, Kawano R, Niimori-Kita K,

- Ihn H, Ohta K. Tsukushi is involved in the wound healing by regulating the expression of cytokines and growth factors. *J.Cell Communication Signaling*. 査読有, sep;8(3), 2014,173-177. doi: 10.1007/s12079-014-0241-y. Epub 2014 Aug 27.
4. Song X, Tanaka H, Ohta K. Multiple roles of Equarin during lens development. *Dev Growth Differ*. 査読有, 2014 Apr;56(3):199-205. doi: 10.1111/dgd.12121. Epub 2014 Feb 20.
 5. Ohta K. The Role of Tsukushi as an Extracellular Signaling Coordinator. *New Principles in Developmental Processes*. 査読有, 25 Jan,2014, P227- 238. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-54634-4_17
 6. Song X, Sato Y, Sekiguchi K, Tanaka H, Ohta K. Equarin is involved in cell adhesion by means of heparan sulfate proteoglycan during lens development. *Dev Dyn*. 査読有, 2013 Jan;242(1):23-9. doi: 10.1002/dvdy.23902. Epub 2012 Nov 28. Erratum in: *Dev Dyn*. 2013 Mar;242(3):301.
 7. Ohta K, Kawano R, Ito N. Lactic acid bacteria convert human fibroblasts to multipotent cells. *PLoS One*. 査読有, 2012;7(12):e51866. doi: 10.1371/journal.pone.0051866. Epub 2012 Dec 26.
 8. Niimori D, Kawano R, Felemban A, Niimori-Kita K, Tanaka H, Ihn H, Ohta K. Tsukushi controls the hair cycle by regulating TGF- β 1 signaling. *Dev Biol*. 査読有, 2012 Dec 1;372(1):81-7. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.08.030. Epub 2012 Sep 18.
 9. Song X, Sato Y, Felemban A, Ito A, Hossain M, Ochiai H, Yamamoto T, Sekiguchi K, Tanaka H, Ohta K. Equarin is involved as an FGF signaling modulator in chick lens differentiation. *Dev Biol*. 査読有, 2012 Aug 1;368(1):109-17. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.05.029. Epub 2012 May 31.
- [学会発表](計 16 件)
1. Riyadh MD Asrafuzzaman, Disruption of Tsukushi function results in aberrant neurogenesis in mouse.第 8 回神経発生討論会, 2015 年 3 月 19 日, 九州大学(福岡市).
 2. 太田訓正, 分泌型タンパク Tsukushi による脳幹細胞ニッチの制. 新学術領域研究「血管-神経ワイヤリングにおける相互依存性の成立機構」2015 年 1 月 28 日, 関西セミナーハウス<修学院きらら山荘(京都市左京区).
 3. Felemban Athary A.M, Akhirin regulates the proliferation and differentiation of neural stem cells in intact and injured mouse spinal cord,第37回日本分子生物学会, 2014 年11月25日-27日、パシフィコ横浜(横浜市).
 4. 新森大佑, TsukushiはTGF-betaシグナルを制御しながら毛周期を調節する.第 37回日本分子生物学会, 2014年11月 25日-27日、パシフィコ横浜(横浜市).
 5. 太田訓正, Tsukushiによる脳神経幹・前駆細胞の制御. 第57回日本神経化学会大会,2014年9月30日-10月1日、奈良県文化会館(奈良市).
 6. Felemban Athary A.M, Akhirin regulates the proliferation and differentiation of neural stem cells in intact and injured mouse spinal cord,熊本医学・生物科学国際シンポジウム,2014年9月04日、熊本市医師会館(熊本市).
 7. Uzzal Kumar Acharujee, Analysis of Tsukushi during Chick Somitogenesis. 熊本医学・生物科学国際シンポジウム,2014年9月04日、熊本市医師会館(熊本市)
 8. Felemban Athary A.M, Akirin is involved in the neural stem cell regulation in the mouse spinal cord, 第47回日本発生生物学会大会, 2014年 5月27日-30日、ウインクあいち(名古屋市).

9. Ito A, Tsukushi maintains the growth and undifferentiated properties of brain neuronal stem/progenitor cells as a niche molecule, 第47回日本発生生物学学会大会, 2014年5月27日-30日、ウインクあいち(名古屋市)。
10. Ohta K, Tsukushi maintains the growth and undifferentiated properties of neuronal stem/progenitor cells. The 18th International Vascular biology Meeting(IVBM), 2014年4月14日-17日、Kyoto, Miyakomesse(京都市)。
11. 太田訓正, 幹細胞基礎研究の最前線. 2013年度 日本乳酸菌学会 秋季セミナー. 2013年11月29日, 東京農業大学(東京都世田谷区)。
12. 太田訓正, EquarinはFGFシグナルを介してレンズの発生に関与する, 第45回日本結合組織学会学術大会、第60回マトリックス研究大会、合同学術大会, 2013年6月28-29日, 和歌山県立医科大学・生涯教育・地域医療支援センター(和歌山市)。
13. Ito A, Tsukushi maintains the growth and undifferentiated properties of neuronal stem/progenitor cells. 2012年11月12日-13日, Neuro-Vascular Wiring Symposium 2012, Nara Prefectural New Public Hall(奈良市)。
14. Ohta K, Tsukushi Maintains the Growth and Undifferentiated Properties of Neuronal Stem/Progenitor Cells as a Niche Molecule. 2012年9月18日-21日, 第35回 日本神経科学大会, 名古屋国際会議場(名古屋市)。
15. X.Song, Equarin is involved as an FGF signaling modulator in chick lens differentiation. 2012年5月28日-31日 第45回 日本発生生物学学会年会、第64回 日本細胞生物学学会年会 合同大会, 2013年5月28日-31日, 神戸国際会議場(神戸市)。
16. Ito A, Tsukushi maintains the growth and undifferentiated properties of stem/progenitor cells as a niche molecule, 2012年5月28日31日 第45回 日本発生生物学学会年会、第64回 日本細

胞生物学学会年会 合同大会, 2013年5月28日-31日, 神戸国際会議場(神戸市)。

〔図書〕(計 2 件)

太田訓正(Part2 導入部・Glossary 担当), Developmental Biology, Scott. Gilbert 著 tenth edition 監修 阿形清和・高橋淑子, ギルバート発生生物学翻訳出版, 2014.03.20.

Ohta, K.

The role of Tsukushi as an extracellular signaling coordinator. In: New Principles in Developmental Processes (Eds. Kondoh, H. & Kuroiwa, A.) Springer Japan pp. 227-238. (2014)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/department/devneuro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 訓正 (OHTA KUNIMASA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号: 90244128