

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06719

研究課題名(和文) グリア細胞の発生・分化機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of glial development

研究代表者

島崎 琢也 (Shimazaki, Takuya)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：00324749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はグリア前駆細胞、あるいは幹細胞がグリアへ分化する遷移状態を捉える方法の開発を目的として行われた。そして、神経幹細胞発生における時系列特異的なグリア分化能変化に応じて変化する遺伝子発現の比較解析とin situ hybridizationによる発現解析により、グリア前駆細胞、もしくは神経幹細胞のグリアへの分化の指標となるマーカー遺伝子として、内向き整流性K⁺チャネルの一種であるKcnj16を同定した。そして、この遺伝子発現のレポーター系が神経幹細胞がグリア前駆細胞へ分化していく遷移状態を捉えるのに有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We attempted to develop a system to visualize glial-restricted progenitors (GRPs) and/or transition state of neural stem cell (NSC) differentiation into glia. We identified Kcnj16 which is an inward-rectifier type potassium channel as a marker for GRPs or glial differentiation of NSCs via expression profiling to identify genes which respond to the temporal changes of gliogenic potency of NSCs during development and in situ hybridization analysis of expression pattern of candidate genes during central nervous system development. Finally, it has been suggested that a reporter system which can recapitulate the expression pattern of Kcnj16 can be applicable to visualize GRPs or glial differentiation of NSCs.

研究分野：神経発生学

キーワード：神経幹細胞 グリア 分化 マーカー

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系発生において、様々なタイプのニューロンおよびグリア細胞の供給源である神経幹細胞 (NSC) の自己複製および分化の制御機構に関しては、この 20 年で非常に多くの情報の蓄積があり、特に NSC vs ニューロンの分化機構については、詳細な分子機構が明らかになってきている。その一方、NSC vs グリア細胞の分化機構に関しては、その分子機構の詳細において確定的なモデルは成立していない。これは、NSC とグリア前駆細胞を区別する方法が確立していないためである。それどころか、二種類のグリア細胞、すなわちアストロサイトとオリゴデンドロサイトが、NSC から直接分化するのか、あるいはそれらに共通なグリア前駆細胞という過程を経て分化するのかも定かではない。これは、真の幹細胞マーカーやグリア前駆細胞のマーカーが発見されておらず、さらにグリア前駆細胞の存在自体も証明されているわけではないからである。中枢神経系の発生においては、まず神経新生が起こり、その後グリア新生期へ移行するが、これは NSC の時系列特異的な分化能変化によって大きく規定されていると考えられている。例えば、発生初期の神経新生期の NSC はほとんどニューロンのみに分化し、Leukemia Inhibitory Factor (LIF) などのアストロサイト分化因子に反応できず、発生の進行と共にその反応性を獲得することが知られている。しかしながら、*in vivo* でも *in vitro* 培養系においても NSC と見分けのつかないグリア前駆細胞への分化が進行し、それらが反応している可能性も考えられる

2. 研究の目的

哺乳類では、成体脳においても NSCs あるいは前駆細胞が絶対数は少ないものの存在し、脳の領域によっては神経新生を行っていることが明らかとなっている。そして、これら前駆細胞を成長因子等の刺激により動因、つまり増幅および分化させ機能回復を促す治療モデルの開発も行われている。しかしながら、NSC の分化能は発生が進むにしたがって制限されて行き、グリア細胞へ分化しやすくなり、ニューロンへの分化能が低下すると共に、その数や増殖能も加齢とともに低下してゆく。しかしながら、これらの過程を制御している機構については未だ謎が多い。そこで本研究は、特に NSC がグリア細胞へ分化しやすくなる機構の解明を目指し、特に NSC とグリア前駆細胞を区別する方法の開発を目的として行った。

3. 研究の方法

以前、我々が開発したマウス ES 細胞からの NSC 分化誘導系を用い、NSC 発生における時系列特異的グリア分化能獲得を制御する遺伝子群のノックダウンや強制発現を行い、グリア前駆細胞あるいは NSC のグリアへの分

化過程に特異的に発現している遺伝子の候補を、DNA マイクロアレイによる *in vitro* における比較解析と *in situ hybridization* によるマウス中枢神経系発生における発現パターンの解析により同定し、該当遺伝子のゲノム座へレポーター遺伝子として Kusabira-Orange (KO) と細胞系譜解析のための ERT2-Cre-ERT2 (組換え酵素である Cre がタモキシフェン依存的に核移行して働く融合遺伝子) を挿入したノックイン ES 細胞の作成し、グリア分化時におけるその発現パターンの解析を行った。

4. 研究成果

以前、我々が開発したマウス ES 細胞からの NSC 分化誘導系では、胚様体形成を介して NSC を含む前駆細胞群を neurosphere 法という細胞凝集塊を形成する浮遊培養系によって選択的に培養増殖させることが可能であるが、その 1 次 neurosphere はほとんどニューロンにのみ分化し、継代培養を繰り返すことによってグリアへの分化が優位になっていく^{1,2)}。我々は既に、この分化能変化にはオーファン型核内受容体の一種である COUP-TFI および COUP-TFII の発現上昇が必須であり、その下流でマイクロ RNA の一種である miR-17/106 の発現抑制が必要であることを示していた^{2,3)}。また、グリア分化優位になった neurosphere に miR-17/106 を強制発現すると神経分化優位に戻り、逆に 1 次 neurosphere に miR-17/106 によって発現が抑制される p38 MAP-Kinase を強制発現させるとグリア分化能が現れる³⁾。そこでまず、miR-17 の強制発現、Coup-tf1/II のノックダウンの有無、および p38 の強制発現によって変化する遺伝子発現の DNA マイクロアレイによる比較解析を neurosphere 集団で行い、さらに公共の遺伝子発現データベースも活用することによって、グリア前駆細胞、もしくは神経幹細胞のグリアへの分化の指標となる可能性のあるマーカー遺伝子候補を 12 個まで絞り込んだ。そしてそれらのマウス中枢神経系発生における発現パターンを、*in situ hybridization* (ISH) によりより詳細に解析した結果、マーカー遺伝子候補として、内向き整流性 K⁺ チャネルの一種である Kcnj16 (Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 16) を同定した (図 1)。そして、この遺伝子発現を模倣するように KO と ERT2-Cre-ERT2 を発現するマウス ES 細胞を、遺伝子ノックイン (KI) によって作成し (図 2) *in vitro* 分化系を用いて KO 発現細胞の細胞系譜を調べたところ、神経系前駆細胞の一部と分化したグリア細胞に特異的に発現していた。このことから、このレポーター系が神経幹細胞がグリア前駆細胞へ分化していく遷移状態を捉えるのに有用であることが示唆された (図 3)。

< 引用文献 >

- 1) Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T et al. Stem cells 26, 3086-98, 2008.
- 2) Naka H, Nakamura S, Shimazaki T et al. Nat Neurosci 11, 1014-23, 2008.
- 3) Naka-Kaneda H, Nakamura S, Igarashi M et al. Proc Natl Acad Sci USA 111, 1604-9, 2014.

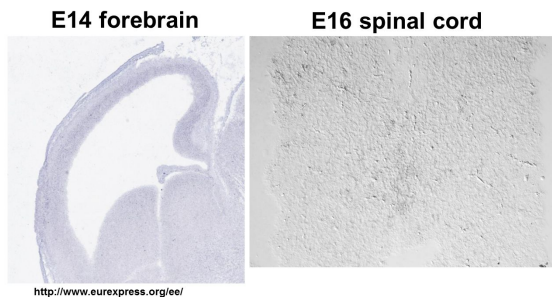


図 1 . グリア分化を開始した胎生中期マウス前脳(胎生期 14 日目 : E14)と脊髄(E16)における Kcnj16 の発現パターン . 前脳の ISH データは <http://www.eurexpress.org> より取得 .

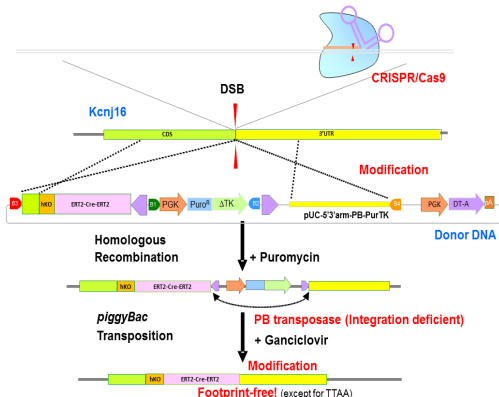


図 2 . Kcnj16-KI ES 細胞の作成ストラテジー . ゲノム編集システムの 1 つである CRISPR-Cas9 系を利用して、Kcnj16 遺伝子のコーディング領域に 2 A ペプチド配列で KO と ERT2-Cre-ERT2 を連結させ、さらに Puromycin 耐性遺伝子と単純ヘルペスウィルスのデルタチミジンキナーゼ遺伝子の融合遺伝子の発現ユニット (PGK promoter-Pac ΔTK) を挿入し、最終的に Piggyback トランスポゾンの遺伝子組換えシステムを用いて PGK promoter-Pac ΔTK を取り除いた .

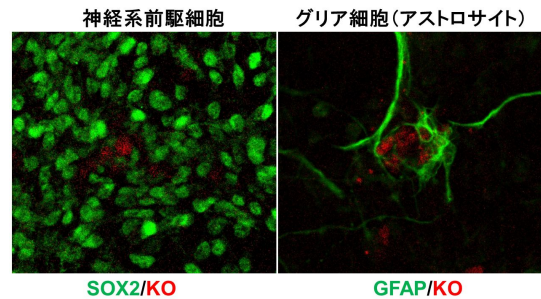


図 3 . Kcnj16-KI-ES 細胞由来神経系前駆細胞およびグリア細胞におけるレポーター遺伝子の発現 . SOX2 陽性 (緑) 神経系前駆細胞と GFAP 陽性アストロサイト(緑)における KO(赤)の発現 .

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 3 件)

Shimazaki T, Okano H. Heterochronic microRNAs in temporal specification of neural stem cells: application toward rejuvenation. npj Aging and Mechanisms of Disease 2, 15014, 2016; doi:10.1038/npjamd.2015.14. (査読有)

Shimazaki T. Vertebrate Neural Stem Cells: Development, Plasticity, and Regeneration. Keio J Med. 65, 1-15, 2016; doi: 10.2302/kjm.2015-0005-IR. (査読有)

Tsuyama J, Bunt J, Richards LJ, Iwanari H, Mochizuki Y, Hamakubo T, Shimazaki T, Okano H. MicroRNA-153 regulates the acquisition of gliogenic competence by neural stem cells. Stem Cell Rep. 5, 365-377, 2015; doi: 10.1016/j.stemcr.2015.06.006. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

津山 淳, 島崎 琢也, 岡野 栄之. 神経幹/前駆細胞においてニューロン新生からグリア新生への切り替えを制御する調節因子 (Regulators for switch from neurogenesis to gliogenesis by neural stem/progenitor cells). 第 38 回日本神経科学大会 2015 年 7 月

津山 淳, 島崎 琢也, 岡野 栄之. 神
経幹細胞のグリア分化能を制御する発生
時期特異的な因子の同定. 第 36 回日本炎
症・再生医学会 2015 年 7 月

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1 件)

名称: 神経分化促進剤
発明者: 岡野栄之、島崎琢也、仲 勇人
権利者: 学校法人慶應義塾
種類: 特許
番号: 特許第 5794693 号
取得年月日: 平成 27 年 8 月 21 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.okano-lab.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島崎 琢也 (SHIMAZAKI, Takuya)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 00324749

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

津山 淳 (TSUYAMA, Jun)