

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08396

研究課題名(和文) 一次繊毛に発現するPDGF受容体の神経幹細胞と神経細胞新生における役割の解明

研究課題名(英文) The role of PDGF receptor expressed in primary cilia in neural stem cells and neuronal neogenesis

研究代表者

石井 陽子 (ISHII, Yoko)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号：00361949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：一次繊毛は、機械的および化学的環境変化を感知し、細胞の遊走、分化、分裂を制御する。神経幹/前駆細胞(NSPCs)の一次繊毛においてPDGFRは高発現するが、その役割は解明されていない。本研究はPDGFR-KO NSPCsを解析し、neuronとoligodendrocyteへの分化能、遊走能が著明に抑制されることを見いだした。mRNA-microarray、pathway analysis、qRT-PCRの結果、Axonal guidance signaling関連遺伝子群の有意な発現増減が確認された。これらの遺伝子と、PDGFRおよび一次繊毛の関係についてはさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Primary cilia is a structure that protrudes to the cell surface, acts as a kind of sensor that senses the surrounding mechanical and chemical environmental changes, and controls the migration, differentiation and division of cells. Although high expression of PDGFR has been shown in primary cilia of neural stem/precursor cells (NSPCs), the role of PDGFR in the cells has not been elucidated yet. In this study, the role of PDGFR in NSPCs was examined by analyzing NSPCs conditionally knockout (KO) expression of PDGFR. PDGFR-KO NSPCs were markedly suppressed in differentiation to neuron and oligodendrocyte, and migratory ability. Among the genes related to axonal guidance signaling, differences in Sema 5a, Plexnb 3, Bmp 4, Shh were extracted by mRNA-microarray analysis following pathway analysis. Significant expression change of above genes was observed in PDGFR-KO cells by qRT-PCR. Further studies are needed on the relationship among these genes, PDGFR and Primary cilia.

研究分野：実験病理学

キーワード：PDGF 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

Primary cilium は細胞表面に突出する構造物で、周囲の機械的および化学的環境変化を感知する一種のセンサーとして働き、様々な細胞の遊走、分化や分裂を制御する。Primary cilium からのシグナリングは器官発達から成熟後の組織の恒常性を維持する上で重要であり、その形成障害や機能不全を伴う ciliopathy と総称される疾患は、多くの臓器に影響を及ぼす多面的かつ重篤な障害をもたらす。中枢神経系障害では Hydrolethalus 症候群、Meckel 症候群などがあり、脳の低形成、脳の中心構造の欠失を伴う水頭症、精神異常などの多彩な症状が見られる。同様に Primary cilium 内の輸送を担う IFT 遺伝子の変異により作製された ciliopathy のモデルマウスでも脳室形成異常や神経細胞の配列異常など重篤な脳発達障害が再現されている (Gorivodsky et al., 2009)。中枢神経系障害をもたらす ciliopathy には複数の原因遺伝子が同定されているが、まだ未解明な部分が多く、これらの疾病の予防や治療には脳に発現する primary cilium の機能解明が必須である。

Sonic Hedgehog、Wnt、と並んで PDGF は primary cilium の重要な制御因子である (Jonathan and Anderson, 2007)。二種類の PDGF 受容体 α 、 β のうち、PDGFR α が Primary cilium の細胞膜に高発現しており、間葉系細胞では細胞周期や遊走の制御に深く関与する (Plotnikova et al., 2009; Clement et al., 2012)。生後の神経細胞新生の源となる神経幹細胞は、側脳室脳室下帯 (SVZ) と海馬歯状回顆粒細胞下層 (SGZ) に認められ、神経幹細胞の Primary cilium は周囲環境に反応し、通常は休眠状態である神経幹細胞の細胞周期への移行や機能制御に関与することが推定されている。神経細胞やグリア細胞を生成する神経幹細胞においても Primary cilium が脳脊髄液等に由来する

様々な情報に反応し、当該細胞の機能制御に関与することが推定されている。神経幹細胞および前駆細胞の primary cilium においても EGF 受容体や PDGFR α の高発現が示されているものの (Danilov et al., 2009)、当該細胞における PDGFR α の役割は未だ解明されていない (Han and Alvarez-Buylla, 2010)。

2. 研究の目的

独自に開発した PDGFR α の条件的ノックアウト (KO) マウスおよび同マウスより採取した培養神経幹細胞を解析することにより、Primary cilium における PDGFR α シグナリングの神経幹細胞の増殖と分化の制御と、生後の神経細胞新生に果たす役割を解明し、従来ヒトがもつ脳神経再生能力を高める治療戦略に基礎的知見を加えることを目的とする。将来的には PDGFR α が関与する ciliopathy の解明に対する基礎的知見の集積に寄与したい。

3. 研究の方法

PDGFR α -KO 神経幹細胞は、ERTM-Cre^{+/+} PDGFR α floxed^{+/+} mouse から採取した神経幹細胞に 4OH-tamoxifen を投与することにより作成する。Cre が発現した細胞は mCherry による赤色蛍光にてラベルされるレポーターマウスすなわち Rosa26 のゲノムに mCherry (H2B-C) が knock in された Tg マウス (Rosa26 mCherry^{+/-} mouse) と上記 mouse とを交配した mouse (ERTM-Cre^{+/+} Rosa26 mCherry^{+/-} PDGFR α floxed^{+/+} mouse) より採取した神経幹細胞を解析し、同一培養環境で PDGFR α -KO 細胞とコントロール細胞の形態変化を比較する。□

1) primary cilium の形態変化、細胞増殖、細胞周期、分化、遊走を評価、2) 細胞増殖や分化を制御する遺伝子発現を中心としたマイクロアレイ等による網羅的遺伝

子発現を解析、3) Primary cilium における細胞内シグナル伝達の蛋白質レベルでの解析することにより、神経幹細胞における PDGFR α -KO の役割を検証する。

上記の神経幹細胞は、生後1日目と生後8週目の成体期のマウスから採取することにより発達期と成熟脳それぞれにおける PDGFR α の役割を検討する。さらに adult のマウスは、PDGFR α -KO を *in vitro* and/or *in vivo* にて誘導し、KO の方法と時期による差異についても調べる。

4. 研究成果

1) PDGFR α -KO マウスとコントロールマウスにおいて、生後1日目と生後8週目の成体期の2点より神経幹細胞を分離し、各種分化マーカーを用いて、分化能と遊走能を比較検討した。培養した神経幹細胞に4OH-tamoxifen を加えてKOを誘導した場合は、生後1日目および生後8週目のいずれもPDGFR α -KOにより、遊走能が著明に低下し、オリゴデンドロサイトおよび神経細胞への分化能も著明に抑制され、アストロサイトへの分化は亢進した。Rosa26 mCherry $^{+/-}$;ERTM-Cre $^{+/-}$;PDGFR α floxed $^{+/+}$ mouse から採取した神経幹細胞4OH-tamoxifen を投与し、PDGFR α -KO 神経幹細胞/前駆細胞 (NSPCs)を作成し、control細胞と比較評価した。Rosa26 mCherryにより、PDGFR α KOとなった細胞にmCherryが発現し、同一培地の中で非KO細胞と比較できる。PDGFR α -KO NSPCsは、neuronとoligodendrocyteへの分化能が抑制されたが、mCherry 陰性でPDGFR α -KO細胞でありながらneuronとoligodendrocyteへ分化する細胞成分も認められたものの遊走能は著明に低下した。neuronとoligodendrocyteへの分化はPDGFR α シグナリングから影響を受けるものの完全に依存するわけではない、しかしneuronとoligodendrocyteの遊走能はPDGFR α シグナリングに大きく依存することが示唆さ

れた。以上、他の細胞においてPrimary cilium の働きとして示唆される遊走、分化に関する役割が神経幹細胞においても影響する可能性が示唆された。Oligodendrocyteに関する知見は以前から報告されてきたものに概ね一致するが、neuronに関する結果は我々が調べた限りでは、これまでに報告されたことのない新しい発見である。

2) 生後1日目mouseより分離したPDGFR α -KO神経幹細胞、およびコントロール神経細胞のそれぞれにおいて、未分化で浮遊neurosphereの状態、分化誘導3日目の細胞を回収し、mRNAマイクロアレイ解析、pathway analysisを行った。コントロール神経幹細胞では、neurosphereの状態から分化誘導3日目の細胞にかけて、Axonal guidance signaling等に関連する遺伝子群の発現増加が見られたが、PDGFR α -KO 神経幹細胞には上記遺伝子群の発現増加は乏しかった。このため、分化誘導3日目の細胞ではコントロール神経幹細胞に比してPDGFR α -KO神経幹細胞は上記遺伝子群の発現低下が見られた。pathway analysisの結果、Axonal guidance signalingに関連する遺伝子群のうち、特にSema5a, Plexn3, Bmp4, Shhの差異が抽出され、qRT-PCRを行ったところ、PDGFR α -KO神経幹細胞でいずれも有意な発現増減が認められた。PDGFR α -KOによる神経幹細胞の遊走能低下は、上記の遺伝子発現の変化が関与することが示唆されたが、これらの遺伝子とPDGFR α との結びつきに関して、さらなる検討が必要である。

3) 以上はIn vitroのNSPCsに4OH-tamoxifen を投与し、PDGFR α -KOを誘導した場合であるが、生後8週目のマウスにtamoxifenを予め投与し、PDGFR α -KOを誘導した状態で、神経幹細胞を分離すると上記と異なる所見が見いだされた。in vivoで脳の状態を染色等で観察すると、KOをエスケープしたoligodendrocyte前駆細胞の旺盛な増殖が誘導されたことが確認された。これらのtamoxifenによるKO抵抗

性前駆細胞は、培養細胞に分離しても4OH-tamoxifenによるKO抵抗性が認められた。PDGFR α KO 誘導後1週間のmouseから培養したNSPCsはin vitroでPDGFR α -KOを誘導したNSPCsに類似した形質となったが、PDGFR α -KO誘導後2週間のmouseから培養したNSPCsはneuronとoligodendrocyteへの分化能力と遊走能力が回復した。培養前のin vivoの脳室下帯を免疫組織学的に解析するとMusashi-1陽性神経前駆細胞が増加していた。PDGFR α -KOはin vivo においてNSPCsの活性化、再動員を刺激する可能性が示唆された。

以上、PDGFR α は、発達期あるいは成熟期、onあるいはoffによる作用を通して複雑なくみで神経幹細胞を制御する可能性がある。これは増殖因子自体が生体の状況次第で発達や修復にかかわる一方で疾病の増悪にも関与する事実につながる。NSPCsの活性化の機序の解明についてはさらなる検討が必要である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Kitahara H, Kajikawa S, [Ishii Y](#), [Yamamoto S](#), Hamashima T, Azuma E, Sato H, Matsushima T, Shibuya M, Shimada Y, [Sasahara M](#). The Novel Pathogenesis of Retinopathy Mediated by Multiple RTK Signals is Uncovered in Newly Developed Mouse Model. EBioMedicine. 査読有, 2018 May;31:190-201. Epub 2018 Apr 25. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.04.021.

Shen J, Xu G, Zhu R, Yuan J, [Ishii Y](#), Hamashima T, Matsushima T, [Yamamoto S](#), Takatsuru Y, Nabekura J, [Sasahara M](#). PDGFR- β restores blood-brain barrier functions in a mouse model of focal cerebral ischemia. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 査読有, 2018 Jan 1:271678X18769515. [Epub ahead of print]

DOI: 10.1177/0271678X18769515.

[Ishii Y](#), Hamashima T, [Yamamoto S](#), [Sasahara M](#). Pathogenetic significance and possibility as a therapeutic target of platelet derived growth factor. Pathology international. 査読有, vol. 66, 2017, p1008-1021.

DOI:10.1177/0271678X18769515.

Zheng Y, [Yamamoto S](#), [Ishii Y](#), Sang Y, Hamashima T, De VN, Nishizono H, Inoue R, Mori H, [Sasahara M](#). Glioma-derived PDGF-BB recruits oligodendrocyte progenitor cells via PDGFR α and remodels cancer stroma. The American Journal of Pathology. 査読有, vol. 186, 2016, p1081-1091.

DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.12.020.

Horikawa S, [Ishii Y](#), Hamashima T, [Yamamoto S](#), Mori H, Fujimori T, Shen J, Inoue R, Nishizono H, Itoh H, Majima M, Abraham D, Miyawaki T, [Sasahara M](#). PDGFR α plays a crucial role in connective tissue remodeling. Scientific Reports. 査読有, vol. Dec 7;5, 2015, p17948.

DOI: 10.1038/srep17948.

Sato H, [Ishii Y](#), [Yamamoto S](#), Azuma E, Takahashi Y, Hamashima T, Umezawa A, Mori H, Kuroda S, Endo S, [Sasahara M](#).

PDGFR- β Plays a Key Role in the Ectopic Migration of Neuroblasts in Cerebral Stroke.

Stem Cells. 査読有, vol. 34, 2016, p685-698.

DOI: 10.1002/stem.2212. Epub 2015 Oct 4.

〔学会発表〕(計12件)

Nguyen Van De, [石井陽子](#), [山本誠士](#), [濱島丈](#), [笹原正清](#). PDGFR-alpha may control the stem cell activities in the adult subventricular zone. (PDGF- alpha 受容体は脳室下帯の神経

幹細胞活性を制御する。)第 107 回日本病理学会総会 2018 年

濱島 丈, 石井陽子, 山本誠土, 笹原正清 . PDGFR α is a non-redundant survival factor of postnatal oligodendrocyte lineage cells. (PDGFR α は生後の髄鞘形成性細胞の生存に必須である。) 第 107 回日本病理学会総会 2018 年

Nguyen Van De, 石井陽子, 山本誠土, 濱島 丈, 笹原正清 . Involvement of PDGFR-alpha in neural stem cell activities in subventricular zone of adult mouse. 第 106 回日本病理学会総会 2017 年

桑 洋, 石井陽子, 山本誠土, 濱島 丈, 笹原正清 . Glioma-derived PDGF-B and host PDGF-receptor signaling remodel cancer stroma. 第 106 回日本病理学会総会 2017 年

山本誠土, 北原英幸, 梶川清芽, 石井陽子, 濱島 丈, 東 英梨月, 松島貴子, 澁谷正史, 嶋田 豊, 笹原正清 . PDGFR and VEGFR signalings play key roles in the onset and progression of retinopathy. 第 106 回日本病理学会総会 2017 年

石井陽子, 山本誠土, 鄭 陽, 桑 洋, 濱島 丈, 笹原正清 . Glioma 由来 PDGF-BB は、PDGFR α を介してオリゴデンドロサイト前駆細胞を動員し、腫瘍間質を改変する . (Glioma-derived PDGF-BB recruits oligodendrocyte progenitor cells and remodels cancer stroma.) 第 105 回日本病理学会総会 2016 年

Nguyen Van De, 石井陽子, 山本誠土, 濱島 丈, Dang Thanh Chung, 倉茂洋一, 松島貴子, 笹原正清 . ネスチン陽性の未熟な細胞はオリ

ゴデンドロサイト前駆細胞の再生に関与する . (Nestin+immature cells are involved in the regeneration of oligodendrocyte progenitor cells.) 第 105 回日本病理学会総会 2016 年

濱島 丈, 石井陽子, 山本誠土, 布村晴香, Nguyen Van De, 松島貴子, 倉茂洋一, 笹原正清 . 条件的PDGFR- α ノックアウトマウスにおける稀突起膠細胞の発生 . 第105回日本病理学会総会 2016年

Ishii Y, Yamamoto S, Sato H, Hamashima T, Sasahara M. PDGFR- β signaling is involved in CXCL12/SDF-1 mediated neuroblast migration in ischemic brain. The 38th annual meeting of the Japan neuroscience society 2015 年

鄭 陽, 桑 洋, 石井陽子, 山本誠土, 濱島 丈, 笹原正清 . Distinctive involvement of PDGF receptor subunits in microenvironments of glioma. 第 104 回日本病理学会総会 2015 年

Huang Ting Ting, 石井陽子, 山田浩太, 山本誠土, 濱島 丈, 笹原正清 . PDGF-receptor dimers differentially regulate the cell shape of migrating fibroblast. 第 104 回日本病理学会総会 2015 年

北原英幸, 山本誠土, 梶川清芽, 濱島 丈, 石井陽子, 笹原正清 . PDGF 受容体- β 抑制マウスによる進行期のヒト糖尿病網膜症モデルの確立 . 第 104 回日本病理学会総会 2015

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石井 陽子 (ISHII Yoko)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号 : 00361949

(2)研究分担者

笹原 正清 (SASAHARA Masakiyo)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
教授

研究者番号： 20154015

山本 誠士 (YAMAMOTO Seiji)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
助教

研究者番号： 10456361