

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14346

研究課題名(和文) 合成ポリマーアレイを用いた神経幹細胞自己複製ニッチの分子基盤確立

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular basis of neural stem cell niche using synthetic polymer arrays

研究代表者

田賀 哲也 (TAGA, Tetsuya)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：40192629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は合成ポリマーアレイと蛍光イメージングによる神経幹細胞自己複製評価という斬新な方法を用いたスクリーニング系で、神経幹細胞自己複製ニッチを機能的にミミックするポリマーを得ることを手掛かりとして、神経幹細胞の自己複製の分子基盤を明らかにする目的で実施された。本研究により、神経幹細胞の自己複製に必要なFGF2非添加時においても自己複製能を維持させるポリマーPA518と、そのような機能を有しない対照ポリマーPA417を得た。またPA518特異的結合蛋白質として6種類の分子量のバンドを同定した。これにより今後質量分析による蛋白質同定および神経幹細胞自己複製ニッチ解明への展開が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Neural stem cells (NSCs) require a specific niche for their maintenance. However, its molecular basis is poorly understood. Although conventional approaches have been extensively done, the niche condition is still required to be studied. To solve this problem, we have established a polymer-based microarray system for screening NSC niche-mimicry. NSCs isolated from E14.5 mouse embryos were seeded on a glass slide on which 376 kinds of polymers were spotted. They attached strongly to several kinds of polymers. Among them, one acrylate-based polymer called PA518 maintained self-renewal capacity of NSCs, in spite of the differentiation-inducing FGF2-deficient condition. A control polymer, PA417, without such activity was also selected. Six proteins with different molecular weights were identified by SDS-PAGE of the proteins specifically bound to PA518. These achievements may contribute to the understanding of NSC niche by further study including mass spectrometric analysis.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：神経幹細胞 ニッチ 自己複製 ポリマー 神経科学 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患は人々の健康に大きな影響を与えており多くの研究者が様々な観点で精力的に取り組んでいるが未だ克服には至っておらずブレークスルーを望む声は強い。中枢神経系を構成する主要な3つの細胞種である、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化する能力を有する神経幹細胞の分化制御の解明がその糸口の一つとして期待されていたところである (Sandoe et al., Nat. Neurosci., 2013)。とりわけ神経幹細胞の自己複製を制御する細胞外環境 (ニッチ) は重要であるが全容解明とは言い難い状況にあり、従来の遺伝子発現プロファイリング等がカバーできない新たなアプローチが必要とされていた。

本課題はこのような状況を背景に、研究代表者が海外共同研究者と開発を進めた、ポリマーを数百種類スポットしたアレイ上で神経幹細胞の自己複製を蛍光イメージングすることでニッチをミミックする擬態分子としてのポリマーを評価する方法で取り組むものであった。研究開始当初から現在にいたるまで独創的と位置付けられるこの手法は、ニッチを規定する構造が、糖鎖付加、リン酸化、切断など種々の修飾や複数分子の組み合わせの産物である場合にもニッチ特性を擬態することが可能と考えられる。このユニークな手法に加えて、研究代表者が蓄積した神経幹細胞の自己複製シグナルの研究成果 (Bizen et al., Stem Cells, 2014; Shimizu et al., Mol. Cell. Biol., 2008; Inoue et al., Stem Cells, 2006) も背景として本課題は遂行された。

2. 研究の目的

本研究課題は合成ポリマーアレイと蛍光イメージングによる神経幹細胞自己複製評価という斬新な方法を用いたスクリーニング系で、神経幹細胞自己複製ニッチを機能的にミミックするポリマーを得て神経幹細胞自己複製に寄与するニッチ分子と同分子受容体の同定を行うことで、神経幹細胞の自己複製の分子基盤を明らかにする目的で実施された。

この目的達成により得られる成果は、中枢神経系の形成や機能に重要な役割を担う神経幹細胞の自己複製に関する基本的概念の提示につながる事が予想され、さらには神経変性疾患の新規治療戦略の開発に必要な神経幹細胞ニッチシグナルの分子基盤を得ることに展開可能であることから、学術的にも社会的にも意義も大きいと考える。

3. 研究の方法

神経幹細胞自己複製ニッチ擬態ポリマーは次のような方法で特定する。(a)化学合成モノマーを多種類・多組合せで付加・重合した376種類のポリマー群を1枚のスライドガラス上にトリプリケイトでドット状にアレ

イしたものを作製する。(b)胎生14.5日目マウス終脳から調製した神経幹細胞画分を、同じ揃いのポリマーセットの載ったスライド2枚に同等に播種する。(c)播種後24時間附着させる。(d)ここまでの過程では神経幹細胞を維持するためにFGF2を添加するが、この後FGF2を抜く群と添加し続ける群の2群に分けて培養する。(e)72時間後に細胞を固定して未分化性マーカーnestinに対する抗体染色と細胞数を定量するための核染色を実施する。(f)蛍光イメージングにより各ポリマーについて神経幹細胞自己複製ニッチ機能をどの程度有するかを計算する。

この手法で特定する、FGF2非添加においても神経幹細胞の自己複製を導くヒットポリマーについて展開研究を進める。なお準備研究で得られたコード名PA518のポリマーについて本研究課題では特に展開研究を先行して行う。すなわち、このPA518について神経幹細胞に対してFGF2非添加でも自己複製能を維持させる能力をどの程度有するかを、neurosphere形成を連続して2回行う「二次neurosphere形成アッセイ」により定量性を加味して評価する。

また前項で得られたヒットポリマー(先行してPA518を用いる)については、FGF2非添加時にも多分化能を維持したままにさせるのかどうかを確認するためヒットポリマー上でFGF2非添加にて72時間培養した神経幹細胞について、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトが分化してくるかどうかを、それぞれの細胞系譜のマーカーに対する蛍光免疫染色を行うことで調べる。

4. 研究成果

(1)PA518が神経幹細胞に対してFGF2非添加でも自己複製能を維持させることを確認するため「二次neurosphere形成アッセイ」で評価した。胎生14.5日目のマウス終脳から調製した培養神経幹細胞画分を、従来の培養皿あるいはPA518コート培養皿に播種し72時間FGF2非添加処理後に二次neurosphere形成を行ったところ、後者の形成が有意に高かった。

(2)PA518上でFGF2非添加処理した神経幹細胞が多分化能を有するかどうかも重要であることから、FGF2非添加処理72時間後に一次neurosphereを形成した細胞を、FGF2非添加で5日間培養して、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトのマーカーであるTuj1、GFAP、O4に対して免疫染色した。その結果、それぞれのマーカーに陽性である細胞が検出された。このことから、PA518上でFGF2非添加処理した神経幹細胞は、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの多分化能を有していることが確認された。

(3)PA518結合蛋白質の同定のためには適切

な対照ポリマーを得ておくことが必要である。合成ポリマーアレイスライド上に培養神経幹細胞画分を播種し FGF 非添加培養後に未分化マーカー発現が低下したポリマーについて、細胞接着性が正常に見られるものを絞り込み、対照ポリマーとして PA531 を同定した。これにより、神経幹細胞自己複製ニッチ擬態ポリマーに結合する蛋白質の回収と質量分析による同定についての準備が整うこととなった。

(4)スケールアップして PA518 をコートしたディッシュ上でマウス神経幹細胞を培養して、PA518 に結合する分子を回収し、その同定を試みた。その際、対照となるポリマー上でも同様に神経幹細胞を培養して、非特異的に結合する分子を回収することで比較検討が可能となるが、前項で絞り込んだ対照ポリマー PA531 が予想外なことに、スケールアップした実験では細胞接着性を再現できず、その確認と再度の試行に時間を要することとなった。

(5)そのため、新たにスケールアップレベルでの対照ポリマーを探索することとし、海外研究協力者と議論の上でリストした 5 種類の対照ポリマー候補から PA417 を選定することができた。PA518 と PA417 のスケールアップレベルでのマウス神経幹細胞自己複製支持能力解析では PA518 の高い能力が再現された。

(6)PA518 と PA417 をスケールアップしてコートしたディッシュの上に、胎生 14.5 日目のマウス終脳細胞を FGF2 存在下で 4 日培養して純度を上げた神経幹細胞を播種して 1 日培養し、ポリマー結合蛋白質の回収実験を行った。ポリマー特異的結合蛋白質の収量を増やす一方、非特異的結合蛋白質を軽減するために、細胞を剥がす条件検討を行った。細胞が十分剥がれるトリプシン反応条件で処理した神経幹細胞培養後のポリマーコートディッシュに結合した蛋白質を SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) サンプルバッファで回収し、SDS-PAGE を実施してゲルを銀染色した。その結果、PA518 特異的な分子量 25kD 以下の 6 種類の分子量の蛋白質の存在を示すバンドを同定することができた。

(7)前項と同様の実験を繰り返し、類似分子量を示す 6 種類の蛋白質の存在を確認することができた。これにより今後質量分析による蛋白質同定をはじめとする神経幹細胞自己複製ニッチ解明へと展開が可能となった。

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 10 件)

Saito K, Nobuhisa I, Harada K,

Takahashi S, Anani M, Lickert H, Knai-Azuma M, Kanai Y, Taga T. Maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells in fetal intra-aortic hematopoietic clusters by the Sox17-Notch1-Hes1 axis. *Experimental Cell Research* 365:145-155, 2018 査読有
DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.02.014

Ito K, Noguchi A, Uosaki Y, Taga T, Arakawa H, Takizawa. Gfap and Osmr regulation by BRG1 and STAT3 via interchromosomal gene clustering in astrocytes. *Molecular Biology of Cell* 29:209-219, 2018 査読有
DOI: 10.1091/mbc.E17-05-0271

Harada K, Nobuhisa I, Anani M, Saito K, Taga T. Thrombopoietin contributes to the formation and the maintenance of hematopoietic progenitor-containing cell clusters in the aorta-gonad-mesonephros region. *Cytokine* 95:35-42, 2017 査読有
DOI: 10.1016/j.cyto.2017.02.012

Wang W, Tabu K, Hagiya Y, Sugiyama Y, Kokubu Y, Murota Y, Ogura SI and Taga T. Enhancement of 5-aminolevulinic acid-based fluorescence detection of side population-defined glioma stem cells by iron chelation. *Scientific Reports* 7: 42070, 2017 査読有
DOI: 10.1038/srep42070

Murota Y, Tabu K and Taga T. Requirement of ABC transporter inhibition and Hoechst 33342 dye deprivation for the assessment of side population-defined C6 glioma stem cell metabolism using fluorescent probes. *BMC Cancer* 16:847, 2016 査読有
DOI: 10.1186/s12885-016-2895-8

Tabu K, Muramatsu N, Mangani C, Wu M, Zhang R, Kimura T, Terashima K, Bizen N, Kimura R, Wang W, Murota Y, Kokubu Y, Nobuhisa I, Kagawa T, Kitabayashi I, Bradley M, Taga T. A synthetic polymer scaffold reveals the self-maintenance strategies of rat glioma stem cells by organization of the advantageous niche. *Stem Cells* 34:1151-1162, 2016 査読有
DOI: 10.1002/stem.2299

Kokubu Y, Tabu K, Muramatsu N, Wang W, Murota Y, Nobuhisa I, Jinushi M, Taga

T. Induction of protumoral CD11c(high) macrophages by glioma cancer stem cells through GM-CSF. Genes to Cells 21:241-251, 2016 査読有
DOI: 10.1111/gtc.12333

Inagaki T, Kusunoki S, Tabu K, Okabe H, Yamada I, Taga T, Matsumoto A, Makino S, Takeda S, Kato K. Up-regulation of lymphocyte antigen 6 complex expression in side-population cells derived from a human trophoblast cell line HTR-8/SVneo. Human Cell 29:10-21, 2016 査読有
DOI: 10.1007/s13577-015-0121-7

Kimura T, Wang L, Tabu K, Tsuda M, Tanino M, Maekawa A, Nishihara H, Hiraga H, Taga T, Oda Y, Tanaka S. Identification and analysis of CXCR4-positive synovial sarcoma-initiating cells. Oncogene 35:3932-3943, 2016 査読有
DOI: 10.1038/onc.2015.461

Sudo G, Kagawa T, Kokubu Y, Inazawa J, Taga T. An increase of GFAP-positive astrocytes in histone demethylase GASC1/KDM4C/JMJD2C hypomorphic mutant mice. Genes to Cells 21:218-225, 2016 査読有
DOI: 10.1111/gtc.12331

[学会発表](計 28 件)

田賀 哲也, 梶 康一. 神経膠腫癌幹細胞の利己的生存戦略による癌の進展. 第 38 回日本炎症・再生医学会(招待講演) 2017

Tabu K, Wang W, Murota Y and Taga T. Self-expanding strategies of glioma stem cells that involves macrophages to adapt to iron-deprivation stress. The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2017

Murota Y, Wenqing GY, Tabu K, and Taga T. Establishment of glioma mouse model by transducing oncogenic H-RasV12 gene into the p53 deficient astrocytes. The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2017

梶 康一, 巽 瑠璃子, 田賀 哲也. 宿主単球・マクロファージの誘導によるグリオーマ幹細胞の鉄欠乏ストレスへの適応: ニッチ自己構築機構の解明. Consortium of Biological Sciences 2017. 2017

松永 浩明, 梶 康一, 田賀 哲也. グリオーマ幹細胞による宿主マクロファージ制御におけるオートスキジス様細胞死の役割. Consortium of Biological Sciences 2017. 2017

室田 吉貴, Sara Schmidt, 梶 康一, 伊藤 浩光, 田中 真二, Mark Bradley, 田賀 哲也. 膵臓癌幹細胞ニッチを擬態する合成ポリマーのスクリーニング. Consortium of Biological Sciences 2017. 2017

Murota Y, Schmidt S, Tabu K, Ito H, Tanaka S, Bradley M and Taga T. Screening for human pancreatic cancer stem cell niche mimicry by using synthetic polymer microarrays. The 15th Stem Cell Research Symposium. 2017 年

Saito K, Nobuhisa I, and Taga T. The mechanism of maintaining the undifferentiated state of hematopoietic stem cell by Sox17 and TET family members. The 40th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. 2017

Nobuhisa I, Takahashi S, Saito K, and Taga T. Role of adhesion molecules induced by a transcription factor Sox17 in intra-aortic hematopoietic cell cluster formation in midgestation mouse embryos. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. 2017

Tabu K, Kokubu Y, Muramatsu N, Nomoto S, Wang W and Taga T. Adaptive response of rat C6 glioma stem cells to iron deprivation by which the development of tumor infiltrating macrophages is induced. The 14th Stem Cell Symposium. 2016

Wang W, Tabu K, Sugiyama Y, Hagiya Y, Ogura SI and Taga T. Resistance of glioma stem cells to 5-aminolevulinic acid (ALA)-based detection due to enhanced metabolic conversion of protoporphyrin IX. The 14th Stem Cell Symposium. 2016

Murota Y, Tabu K and Taga T. C6 glioma stem cell-derived extracellular vesicles promote the development of macrophages. The 14th Stem Cell Symposium. 2016

Tabu K, Wang W, Murota Y and Taga T. Adaptive response of C6 glioma stem cells to iron deprivation through macrophage induction. 第75回日本癌学会学術総会. 2016

Wang W, Tabu K, Hagiya Y, Murota Y, Ogura SI and Taga T. Enhancement of 5-aminolevulinic acid-based fluorescence detection of glioma stem cells by chelating iron. 第75回日本癌学会学術総会. 2016

齋藤 清香, 信久 幾夫, Anani Maha, 原田 果歩, 高橋 聡美, Lickert Heiko, 金井正美, 金井克晃, 田賀 哲也. Maintenance of hematopoietic stem and progenitor cell phenotype of intra-aortic cell clusters in the AGM region through the Sox17-Notch1-Hes1 axis. The 39th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. 2016

高橋 聡美, 信久 幾夫, 齋藤 清香, 田賀 哲也. Involvement of transcription factor Sox17-mediated expression of adhesion molecules in hematopoietic cell cluster formation in midgestation mouse dorsal aorta. The 39th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. 2016

Kagawa T, Yamaguchi Y, Sudo G, Kokubu Y, Hattori S, Takao K, Miyakawa T, Inazawa J, Taga T. Astroglial development is regulated by DNA and histone methylation: from molecular basis to behavioral abnormalities in gene-manipulated mice. Cold Spring Harbor Asia meeting on Novel Insights into Glia Function & Dysfunction. (招待講演) 2016

Taga T Tabu K. Characterization of C6 glioma cancer stem cells and their niche. Seoul National University, Cancer Research Institute (SNUCRI) Annual Symposium 2015 “Innovative Approaches to Explore Novel Druggable Targets” (招待講演) 2015

Tabu K, Muramatsu N, Taga T. Synthetic polymer-based approach revealed an adaptive capacity of glioma stem cells by inducing tumor-infiltrating and iron-accumulating macrophages. The 38th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. 2015

Wang W, Tabu K, Kokubu Y, Hagiya Y, Ogura S, Taga T. Splenic abnormal erythropoiesis in C6 glioma-bearing mice: an implication for their environment of cancer stem cells. 第74回日本癌学会学術集会. 2015

〔図書〕(計2件)

楠 康一、田賀 哲也. 株式会社エヌ・ティー・エス. がん幹細胞によるがん進展メカニズム (次世代がん治療). 2017, 386

楠 康一、室田 吉貴、田賀 哲也. 日本バイオマテリアル学会. 合成ポリマーを用いた癌幹細胞ニッチの特性解明 (バイオマテリアル-生体材料-). 2017, 82

〔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:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

(1)ホームページ等
<http://www.tmd.ac.jp/mri/scr/subjects/index.html>
<http://www.tmd.ac.jp/mri/scr/english/subjects/index.html>
http://reins.tmd.ac.jp/html/100007289_ja.html
http://reins.tmd.ac.jp/html/100007289_en.html

(2)市民公開講座

田賀 哲也. 幹細胞の基本の“き”. 2016年2月19日

(3)高校生を対象とした幹細胞のミニレクチャーと観察実習

大阪府立 茨木高等学校. 2016.8.3
私立 本郷高等学校. 2016.8.22
大阪府立 茨木高等学校. 2017.8.3
筑波大学附属 駒場高等学校. 2017.12.14

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田賀 哲也 (TAGA, Tetsuya)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号：40192629

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

ブラッドレイ マーク (BRADLEY, Mark)
University of Edinburgh・School of
Chemistry・Professor