

令和元年6月4日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14556

研究課題名(和文) 成熟視床下部における神経新生機構の解明：胚性幹細胞を用いたアプローチ

研究課題名(英文) Adult neurogenesis in hypothalamus: An approach using embryonic stem cell

研究代表者

長崎 弘 (Nagasaki, Hiroshi)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：30420384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウスES細胞から分化誘導した視床下部組織を解析することで、成熟視床下部に内在する神経幹細胞の維持機構および神経新生機構の解明を目指した。ES細胞の分化誘導過程で、視床下部幹・前駆細胞マーカーであるRax遺伝子の発現をモニターしたところ、神経・グリア細胞の分化後も少数のRax陽性細胞が残存することを見出した。これらの細胞は遺伝子発現、細胞形態、増殖活性などの特徴から、成熟視床下部の神経幹細胞に類似することが分かった。さらにRax発現を指標とした培養条件の検討から、形態形成シグナルの一種であるヘッジホッグシグナルが、神経幹細胞の維持および分化抑制に働いている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞は出生後は再生しないという通説の例外として海馬領域の成人神経再生が知られているが、近年視床下部でも脳室周囲細胞のタニサイトから神経新生が起こることが注目を浴びている。本研究はマウスES細胞からタニサイト様細胞の誘導に成功した。この成果は自律神経中枢である視床下部機能が老化を含む疾病により機能低下した場合、再生医療により改善しアンチエイジング効果をもたらす可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to investigate the regulatory mechanisms for the maintenance and neurogenic function of adult hypothalamic neural stem cells (htNSCs) by using mouse ES cell-derived hypothalamic tissue culture. After differentiation of mouse ES cells into hypothalamic neurons and glial cells, we observed a small number of cells expressing Rax, a marker for embryonic and adult htNSCs. This Rax+ population was comparable to adult htNSCs in terms of gene expression, cell morphology, and proliferative capacity. By examining culture conditions to keep the Rax expression, we identified Hedgehog signaling as a candidate pathway that maintains adult htNSCs and prevents their differentiation.

研究分野：再生医学

キーワード：視床下部 成人神経新生 幹細胞治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

間脳視床下部にはエネルギーホメオスタシスに関わる神経回路網が存在するが、神経新生によってそれらが再編され、摂食行動やエネルギー代謝を修飾することが明らかになってきた。第三脳室腹側に存在する上衣細胞（タニサイト）や脳実質細胞の一部が、神経幹細胞として新たなニューロンを産生し、正中隆起や弓状核の神経回路に組み込まれる（図1）。最近、高脂肪食負荷マウスでは正中隆起で神経新生が促進し、弓状核では逆に抑制されることが報告された。最近、高脂肪食負荷マウスでは正中隆起で神経新生が促進し、弓状核では逆に抑制されることが報告された。正中隆起は脳室周囲器官の1つであり血中因子の作用をより強く受けるのに対し、弓状核では脳脊髄液由来因子の作用が相対的に強い。結果として逆の効果が観察されたと考えられている。つまり中枢性および末梢性因子が複合的に神経新生を制御するので、動物実験から個々の因子の作用を特定するのは困難である。申請者は現在、マウス ES 細胞由来-視床下部培養系 (ES-hypo) を用いた分化誘導研究を行っており、ほぼ全域の視床下部ニューロンの分化を確認している (Nagasaki, Kodani et al., 2015, *IIS*)。本実験系で成熟視床下部の神経新生を再現し、特定の細胞外因子の作用を検討できると考えた。

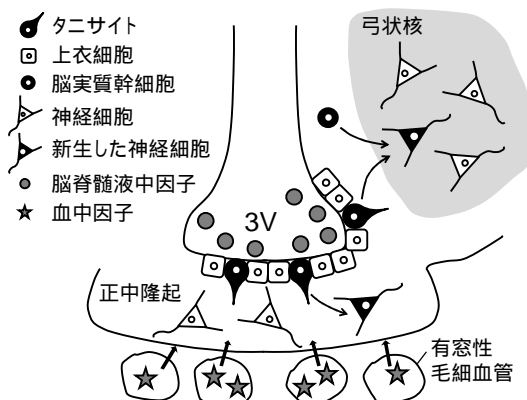


図1 成熟視床下部における神経新生

### 2. 研究の目的

成熟脳の海馬や嗅球において神経新生が起こることは良く知られているが、視床下部領域においても神経新生現象が見出され脚光を浴びている。新生ニューロンは視床下部の神経回路を再編し、摂食行動やエネルギー代謝を調節することが示唆されている。最近の研究から、高脂肪食の摂取など栄養環境の変化によって神経新生が修飾されることが分かってきたが、その分子基盤については未だ十分な理解が得られていない。本研究では、ES-Hypoを用いて、*in vitro*で成熟視床下部の神経幹細胞を誘導し、神経新生を再現する。そのうえで、神経幹細胞の維持および神経新生の調節に関わる生理的因子の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス ES 細胞由来-視床下部幹細胞の定量化

視床下部領域の神経幹細胞は主に脳室上衣層のタニサイトであると考えられており、この細胞は胎児期の神経幹細胞と共通のマーカーとして転写因子 Rax を発現する。Rax 遺伝子に GFP 遺伝子をノックインしたマウス ES 細胞株 (Rax::GFP 株) が樹立されていることから、これを用いて ES-Hypo の分化誘導を行い、フローサイトメトリーにより GFP 陽性細胞を定量化した。

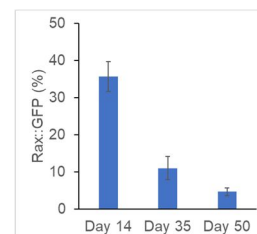
#### (2) マウス ES 細胞由来-視床下部幹細胞の特徴づけ

Rax 陽性の細胞集団が成体幹細胞と類似するかどうかを検討するため、ES-Hypo 組織の凍結切片を作製し、タニサイトで発現するマーカータンパク質の免疫染色および細胞形態の解析を行った。また、分裂細胞を EdU で標識し、Rax 陽性細胞の増殖活性と神経新生能を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) マウスES細胞由来-視床下部幹細胞の定量化

Rax::GFP株を用いたES-Hypo誘導において、神経分化が活発化する培養14日～35日にかけてRax::GFP陽性細胞は大きく減少するものの、35日以降も少数の陽性細胞が残存することを見出した(図1)。これらの長期に維持されるRax陽性細胞が、成熟視床下部の神経幹細胞に相当する可能性が示唆された。



#### (2) マウスES細胞由来-視床下部幹細胞の特徴づけ

図1 Rax 陽性細胞の経時的変化

培養50日目のES-Hypoにおける免疫組織化学的解析から、大多数のRax::GFP陽性細胞でタニサイトマーカー (Vimentin, Sox2) の発現が認められ、タニサイトに類似する細胞形態も観察された (図2)。またEdU標識の結果、ごく一部のRax::GFP陽性細胞が増殖しており、近傍に新生ニューロンが認められた。この結果から、長期分化後のRax陽性細胞はタニサイトと類似する性質を持ち、神経新生を生じる可能性が示唆された。

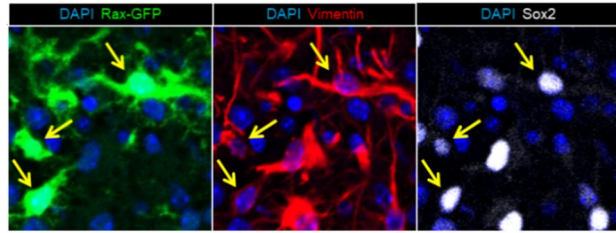


図2 培養50日の分化組織における免疫組織染色

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 8 件)

Grafted hypothalamic Neurons from Mouse ES Cells survived in hypothalamus or pituitary

Miho Kawata, Yu Kodani, Hidetaka Suga, Yoko Kaneko, Akira Nakashima, Hiroshi Nagasaki

第96回日本生理学会大会 2019年3月神戸国際会議場

Neurochemical differentiation of hypothalamic MCH neurons derived from mouse embryonic stem cells.

Yu Kodani, Miho Kawata, Hidetaka Suga, Yoko Kaneko, Akira Nakashima, Hiroshi Nagasaki

第96回日本生理学会大会 2019年3月神戸国際会議場

*In vitro* recapitulation of adult hypothalamic neurogenesis using embryonic stem cell culture

小谷 侑、金子 葉子、中島 昭、長崎 弘

第95回日本生理学会大会 2018年3月サンポートホール高松

マウス胚性幹細胞由来バゾプレシン神経の解析

金子葉子、大熊真人、小谷 侑、須賀英隆、中島 昭、宮地栄一、長崎 弘

第95回日本生理学会大会 (平成30年3月) サンポートホール高松

Allo and hetero-graft survival of Hypothalamic Neuron from Mouse Embryonic Stem Cell

長崎 弘、小谷 侑、中島 昭、須賀英隆、金子 葉子

第41回日本神経科学大会 2018年7月神戸国際会議場

Histological and neurochemical characterization of MCH neurons in mouse ES cell-derived hypothalamic tissue culture

Yu Kodani, Hidetaka Suga, Yoko S Kaneko, Akira Nakashima, Hiroshi Nagasaki

第41回日本神経科学大会 2018年7月神戸国際会議場

Grafted hypothalamic Neurons from Mouse ES Cells survived in hypothalamus or pituitary

Miho Kawata, Yu Kodani, Hidetaka Suga, Yoko Kaneko, Akira Nakashima, Hiroshi Nagasaki

第96回日本生理学会大会 2019年3月神戸国際会議場

In Vitro Organogenesis of Hypothalamus from mouse ES Cell

長崎 弘、小谷 侑、山本直樹、金子葉子、中島 昭、須賀英隆

第40回日本神経科学大会 2017年7月幕張メッセ

[図書] (計 0 件)

[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：  
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：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 小谷 侑  
ローマ字氏名: Kodani, Yu  
所属研究機関名: 藤田医科大学  
部局名: 医学部  
職名: 助教  
研究者番号(8桁): 60644622

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名:  
ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。