

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19500274

研究課題名（和文） 神経幹細胞生存因子の同定

研究課題名（英文） Identification of neural stem cell survival factor

研究代表者

島崎 琢也 (SHIMAZAKI TAKUYA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：00324749

研究成果の概要：

近年、様々な研究によって神経幹細胞の維持・分化機構等の解明が進んでいるが、神経幹細胞の維持における生存機構についてはあまりよく分かっておらず、いわゆる生存因子とされるものも同定されていなかった。そこで本研究では、ストローマ細胞の一種である PA-6 の培養上澄がマウス ES 細胞由来および胎仔脳由来神経幹細胞の低密度培養下での neurosphere 形成を促進する活性を持つことを見出し、その活性分子の少なくとも 1 つと考えられるものを精製・同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：神経幹細胞, PA-6, 生存因子, ES 細胞, クローニング

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の中枢神経系幹細胞は、個体の発生初期から成体に至るまで中枢神経系の様々な場所に存在し、様々なタイプのニューロンやグリア細胞を生産することによって中枢神経系の構築および機能維持に関与していると考えられる。近年、様々な研究によって神経幹細胞の維持・分化機構等の解明が進んでいるが、神経幹細胞の維持における生存機構についてはあまりよく分かっていない。いわゆる生存因子とされるものは同定されておらず、神経幹細胞の増殖を促進する成

長因子である上皮成長因子 (EGF), 線維芽細胞成長因子 (FGF), およびインスリン様成長因子 (IGF) が結果的に生存・維持を促しているのではないかと考えられている。しかしながら、これら成長因子およびその受容体の遺伝子破壊マウスにおいて、神経幹細胞の生存の有意な低下は報告されていない。また、成体脳に存在している神経幹細胞の多くは通常細胞分裂を行っておらず、外傷等の刺激に応じて増殖および分化を行い自己再生に貢献することが分かっている。これらのことは、上記成長因子シグナル以外に、神経幹細胞

胞の生存・維持に必要な因子が存在していることを示唆している。近年、研究代表者らは、neurosphere 法と呼ばれる神経幹細胞の選択的培養法を利用して、増殖、自己複製、あるいは生存を促進する因子の探索を、既知の液性因子やさまざまな細胞株の培養上澄をスクリーニングすることによって行ってきた。その結果、毛様体神経栄養因子(CNTF)や白血病阻害因子(LIF)などのサイトカインの共通の受容体の1つであるgp130を介したシグナルが神経幹細胞の自己複製を促進することや、 α -ガラクトシドに親和性を持つレクチンタンパク質の一種であるガレクチンが神経幹細胞の増殖を促進することを²⁾明らかにしていた。

2. 研究の目的

最近研究代表者らは、ストローマ細胞の一種であるPA-6の培養上澄がマウスES細胞由来および胎仔脳由来神経幹細胞の低密度培養下でのneurosphere形成を促進する活性を持つことを見出し(図1)、これは

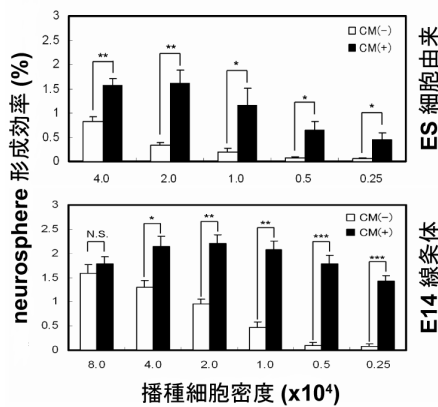


図1 .PA-6 培養上澄には neurosphere 形成を促進する活性が存在する .ES 細胞を分化させた胚様体、あるいはマウス胎生14日目の線条体を分散させ neurosphere 形成を行う際、PA-6 の培養上澄(CM)を1:1の割合で添加すると、低密度培養下での neurosphere 形成率が最大20倍増大する .

neurosphere 中の細胞増殖を促進しないことから、神経幹細胞の生存因子を含んでいるものと考えられた(図2)。そこで本研究は、その活性の分子実体を明らかにすることを目的として行われた。

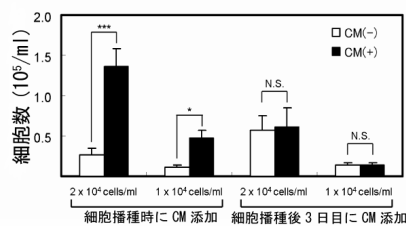


図2 .PA-6 培養上澄は neurosphere 中の細胞増殖に影響を与えない .ES 細胞を分化させた胚様体を分散し、6日間 neurosphere 形成を行う際、細胞播種時に PA-6CM を添加した場合は、neurosphere 形成率が増大し、結果として総細胞数も増加したが、細胞播種後3日目に CM を添加しても、総細胞数に変化は無かった。

3. 研究の方法

それまでの予備的な研究によって、PA-6 培養上澄中の神経幹細胞生存促進活性が、100 の熱処理およびトリプシン消化により失活する分子量1万以上の分子であることが明らかになっており、このことは、それがタンパク質であることを示していた。そこで、大量調整したPA-6培養上澄から、イオン交換、レクチンアフィニティーカラムなどを用いた通常のタンパク質精製法によって、活性成分を、neurosphere 法によるバイオアッセイを指標に精製濃縮し、最終的には、質量分析、場合によってはペプチドシーケンシングによって、活性を担うと考えられるタンパク質の候補を決定し、遺伝子クローニングとそれに続く発現実験によって最終的な同定を目指した。

4. 研究成果

まず、硫酸沈殿による粗分画を試みたところ、その生存因子活性は35%硫酸で塩析されたことから、比較的分子量の大きなタンパク質であることが予想された。次にこの活性のレクチン各種(ConA, LCA, RCA, WGA)およびヘパリンアフィニティーカラムへの結合を調べたところ、ConA,LCA,およびWGAへの結合が確認され、複合糖鎖を有する糖タンパク質であることが示唆された。また、特にLCAアフィニティーカラムを用いることによって高純度な精製が可能であることも明らかとなった。さらに、各種イオン交換カラムクロマトグラフィーを試みたところ、SP-セファロースカラムにより高度な精製が可能であることも明らかとなった。次に、これらのカラム精製を組み合わせることによって、大量のPA-6CMより目的成分の高度精製を行ったところ、SDS-PAGEにおいて10種類のタンパク質バンドが確認された。これらのうち量的にLC-MS/MSによる質量分析が可能と思われる7種類のバンドについて実際に質量分析を行ったところ、2種類の既知ではあるが神経幹細胞に対する作用に関しては全く報告が無いタンパク質が同定された(図3)。このうち1種類(タンパク質A)は、SP-セファロースカラムにより強く吸着するが、生存因子活性が弱い画分

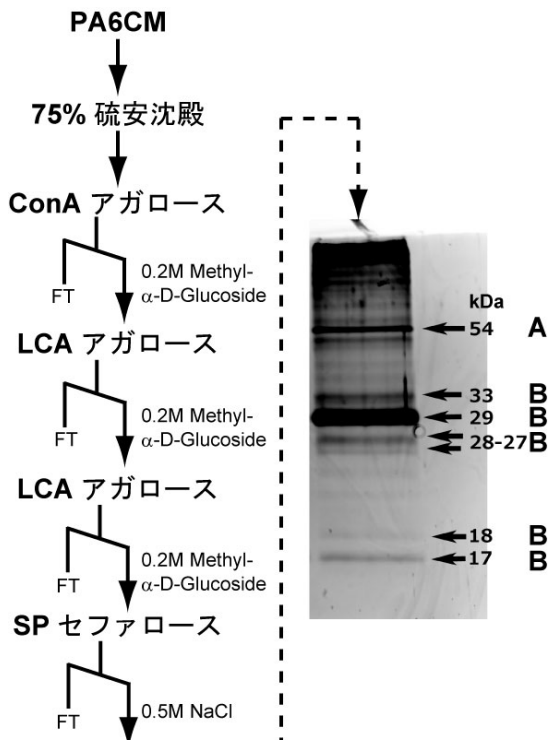


図3 . PA-6CM中に存在する neurosphere 形成促進活性分子の精製 . PA-6CM を硫酸沈殿後、各種カラムで活性成分を精製し、SDS-PAGEにて分離した7種類のバンドをLC-MS/MSにて解析したところ、これらは2種類の既知タンパク質であった(AおよびB)。

(0.5M NaCl 溶出画分)にのみ存在したことから、生存因子候補から除外し、0.3Mと0.5M NaClの両方の画分に分子量の異なる6種類のペプチド断片として溶出された残りの1種類(タンパク質B)について(図4)全長の

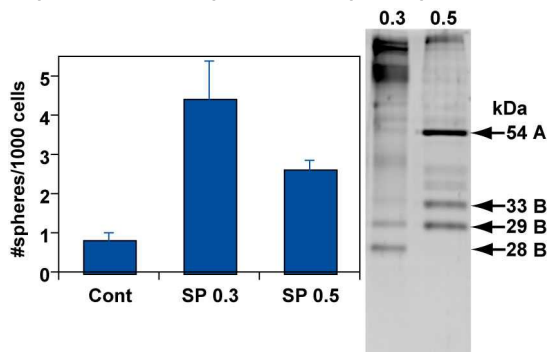


図4 . PA-6CM中に存在する neurosphere 形成促進活性分子の同定 . neurosphere 形成促進活性はSPセファロースによる画分において、0.3および0.5M NaCl溶出の両方の画分で検出されたが、タンパク質Aは0.5M NaCl画分でのみ検出されたが、タンパク質Bの様々なペプチド断片は両方で検出された。

遺伝子組換えタンパク質の neurosphere 形成促進活性をマウス胎仔脳を用いて検討した。その結果、濃度依存的に最大16倍の neurosphere 形成促進活性が見られた(図5)。

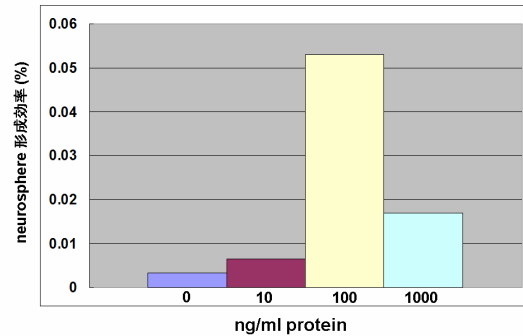


図4 . タンパク質Bの neurosphere 促進活性 . タンパク質Bの組換え体は濃度依存的に neurosphere の形成を促進した。

この結果は、神経幹細胞の生存・維持に関わる新たな因子の発見を意味しており、今後その詳細な作用機構や in vivo における機能の解明により、未だ謎の多い神経幹細胞の niche に関する理解がより一層深まるとともに、神経再生への応用が期待される。

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6件)

Ogawa D, Okada Y, Nakamura M, Kanemura Y, Okano HJ, Matsuzaki Y, Shimazaki T, Ito M, Ikeda E, Tamiya T, Nagao S, Okano H. Evaluation of human fetal neural stem/progenitor cells as a source for cell replacement therapy for neurological disorders: properties and tumorigenicity after long-term in vitro maintenance. *J Neurosci Res* 77, 307-317. (2009). 査読有

Naka H, Nakamura S, Shimazaki T, Okano H. Requirement for COUP-TFI and II in the temporal specification of neural stem cells in central nervous system development. *Nature Neurosci* 11, 1014-1023. (2008). 査読有

Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, Enoki R, Koizumi A, Ishii S, Itoyama Y, Sobue G, Okano H. Spatio-temporal recapitulation of central nervous system development by ES cell-derived neural stem/progenitor cells. *Stem Cells* 26, 3086-3098. (2008). 査読有

Iwata N, Yoshida H, Tobiume M, Ono F, Shimazaki T, Sata T, Nakajima N. Simian fetal brain progenitor cells for studying viral neuropathogenesis. *J Neurovirol* 13, 11-22. (2007). 査読有

Hayakawa-Yano Y, Nishida K, Fukami S, Gotoh Y, Hirano T, Nakagawa T, Shimazaki T, Okano H. Epidermal growth factor signaling mediated by grb2 associated binder1 is required for the spatiotemporally regulated proliferation of olig2-expressing progenitors in the embryonic spinal cord. Stem Cells 25, 1410-1422. (2007). 査読有

Kohno D, Nakata M, Maekawa F, Fujiwara K, Maejima Y, Kuramochi M, Shimazaki T, Okano H, Onaka T, Yada T. Leptin suppresses ghrelin-induced activation of neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus via phosphatidylinositol 3-kinase- and phosphodiesterase 3-mediated pathway. Endocrinology 148, 2251-2263. (2007). 査読有

〔学会発表〕(計2件)

Seiji Ishii et al. Stromal cell-secreted factors promote the survival of ES cell-derived early neural stem/progenitor cells via the activation of MAPK and PI3K-Akt pathways. 第31回日本分子生物学会年会, 第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008年12月10日, 神戸.

石井聖二 他, ストローマ細胞が分泌する液性因子はMAPKおよびPI3K-Akt経路の活性化を介してES細胞由来の発生早期神経幹細胞/前駆細胞の生存を促進する. 第31回日本神経科学大会, 2008年7月10日, 東京.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕該当なし

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・講師

研究者番号: 00324749

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし