

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007 年度～2008 年度  
 課題番号：19500281  
 研究課題名（和文） 成獣終脳皮質に存在する前駆細胞の分化とその分子機構の解析  
 研究課題名（英文） Properties of precursor cells in the adult cerebral cortex  
 研究代表者  
 森 徹自（MORI TETSUJI）  
 関西医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：30285043

## 研究成果の概要：

成獣終脳皮質における神経系前駆細胞の性質を組織学的手法によって解析した。正常状態では、分裂している細胞のうち、NG2 陽性未分化細胞が約 95%を占め、そのうち、ごく少数がオリゴデンドロサイトに分化するが、ほとんどが未分化で存在することが分かった。レトロウイルスベクターを用いてこれらの細胞に遺伝子導入を試みたが、導入効率の点などから、本研究の *in vivo* 実験においては技術的に適さないことが分かった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経化学・神経化学一般

キーワード：分子・細胞神経科学

## 1. 研究開始当初の背景

成獣脳内には、脳室下帯と海馬歯状回の 2 箇所ニューロン新生が起きていることが知られているが、その他の領域ではニューロン新生が起きないと一般に考えられていた。しかしながら近年、終脳皮質などの「非ニューロン新生領域」においても、僅かではあるがニューロン新生が起きているという報告がある一方、それを否定する報告もあり、意見の一致が得られていなかった。また、「非ニューロン新生領域」においても、少数の分裂増殖細胞が存在し、これまでオリゴデンドロサ

イト前駆細胞であるとされてきた NG2（コンドロイチン硫酸プロテオグリカンのひとつ）陽性の細胞であることが知られていた。また、NG2 陽性細胞（NG2(+)）は、少なくとも細胞培養系においてニューロンやアストロサイトにも分化可能な多分化能を持った細胞であることが示されていた。以上のことから、正常な成獣終脳皮質における NG2(+) が、生体内でもニューロンに分化するか否か、あるいは NG2(+) 以外の未分化細胞のマーカーを発現する神経幹細胞/前駆細胞が存在するかは不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、主に以下の3点の項目について研究を進める。

(1) 終脳皮質において分裂増殖している神経系前駆細胞を、主に組織化学的手法を用いて詳細に分類し、その性質を明らかにする。

(2) ウイルスベクターを用いて、神経系前駆細胞をGFP標識することで、これらの細胞の長期間にわたる fate mapping 実験を行い、どのようなマーカーを発現する細胞に分化してゆくかを追跡して明らかにする。

(3) 通常、幹細胞/前駆細胞のGFP標識をおこなう際にはレトロウイルスベクターが用いられるが、正常終脳皮質のNG2(+)の数から考えて、非常に効率が悪いと予想される。本研究では、レトロウイルスベクターに代わり、レンチウイルスベクターを基本とした新たな神経系幹細胞/前駆細胞標識システムの開発を試みる。

## 3. 研究の方法

解析には成体 Wistar ラット(8週齢、オス)、あるいは成体 ICR マウス(6週齢、オス)を用いる。

(1) 正常終脳皮質に存在する神経系幹/前駆細胞の性質についての組織学的解析 現在のところ、神経系幹/前駆細胞に対する特異的なマーカーは知られていない。しかし、最も重要な性質は、分裂増殖をおこなう事である。この性質を利用して、成獣終脳皮質で分裂増殖している細胞を BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine ; 核酸類似体のひとつで、DNA複製の際に染色体に取り込まれる)で標識する。

① 組織学的解析のための免疫染色条件至適化

BrdU 陽性の細胞種を同定するためには、他のマーカー抗体を用いて二重染色する必要があるが、BrdU 検出には、塩酸処理など非常に厳しい条件を必要とする。この前処理が、BrdU 以外のマーカー分子の抗原性を損なう可能性があるが、これまでの報告では、厳密な至適化を検討した研究はない。本研究では、one step 染色法(塩酸処理後、抗 BrdU 抗体と他の抗体を同時に反応させる)と two step 染色法(他の抗体を二次抗体まで反応させた後、塩酸処理、抗 BrdU 抗体を反応させる)を比較し、二重染色の条件至適化をおこなう。各種細胞腫のマーカーは、以下の抗体を用いる。オリゴデンドロサイト前駆細胞/神経系前駆細胞: NG2、成熟ニューロン: NeuN、ア

ストロサイト: S100b と Glutamine synthetase、ミクログリア: Iba1、血管内皮細胞: RECA-1、オリゴデンドロサイト系細胞(前駆細胞と成熟細胞): Olig2(オリゴデンドロサイトの発生分化に必須の転写調節因子)、分裂細胞: Ki67

② 短期標識実験

BrdU(50mg/Kg)投与後5時間で、常法に従いラットを灌流固定し、組織学的解析に供する。BrdU(+)を上記のマーカー分子を用いて同定・計数する

③ 長期標識実験

BrdUは生体内で代謝され、投与後1時間以内に組織学的手法では検出限界以下の濃度になる。神経系幹/前駆細胞の細胞周期は非常に長い可能性があり、単回投与では標識効率が悪い可能性がある。そのため、BrdU(50mg/Kg)を1日3回(朝、昼、夜)3日間あるいは7日間連続投与することで、長い細胞周期を持つ分裂増殖細胞をBrdU標識し、その細胞種を同定する。同時に3日間、あるいは7日間で分化した細胞種を同定する。

(2) ウイルスベクターを用いた神経幹/前駆細胞特異的GFP標識と、新たな標識システム開発の試み

① GFPを発現するレトロウイルスベクターを、成獣終脳皮質に複数箇所へ注入することで、分裂像食細胞特異的に標識する事を試みる。

② 正常状態では、分裂する神経系幹/前駆細胞の絶対的数が非常に少なく、しかも細胞周期は非常に長い。また、注入針による傷害を避けることはできない。この問題を解決するために、レンチウイルスと、活性誘導型 Cre-LoxP システムを基本とした新たな分裂細胞特異的遺伝子導入システムの開発を試みる。

細胞周期制御因子など、分裂細胞特異的に働く遺伝子とそのプロモーターが、いくつか同定されている。これらのプロモーター下流に CreERT2(タモキシフェンによる活性誘導型 Cre recombinase)を結合した発現ユニットをレンチウイルスベクターに組み込む。このウイルスベクターを、Creのレポーターラインマウスに注入する。ウイルスベクター注入時の損傷と避ける事と、多くの細胞に CreERT2 発現ユニットを導入する目的で、胎生中期の胎仔脳に注入する。成獣期にタモキシフェンを投与することで、Cre活性が誘導され、プロモーター特異的、つまり増殖細胞特異的にレポーター遺伝子の発現が誘導される。

このシステムを実現するために、最も重要な

点は、プロモーターの選別である。すでに報告のあるいくつかの細胞周期制御に関わる因子などのプロモーターと GFP を結合した発現ユニットをレンチウイルスに組み込む。これを成獣終脳皮質に注入し、GFP と分裂細胞のマーカー (BrdU や KI67 など) を指標に、*in vivo* で分裂細胞特異的な標識が可能なプロモーターを選別する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 組織学的解析結果

① 抗 NG2 抗体による免疫染色では、固定液のホルムアルデヒド濃度が重要であり、2% 以下の低濃度で固定する必要がある事がわかった。

② 二重染色において、BrdU 染色に必要な前処理のタイミング (one step あるいは two step 染色) で、明らかな違いは確認されなかったが、two step 染色の方が若干良好であった。そのため、定量的解析は two step 染色した切片を用いた。

③ 灌流固定後、血管内に残留する分裂中の白血球が少なからず存在し、しかも BrdU 陽性であるが、形態学的に脳実質中の分裂細胞と区別可能であった。BrdU 陽性白血球は、定量的解析から除外した。

④ 以上の結果を踏まえて、正常終脳皮質に存在する分裂増殖細胞 (BrdU(+)) を、各細胞種に対するマーカーを用いて厳密に同定した。BrdU 短期標識実験の結果を表にまとめて以下に示す。

細胞種	% of BrdU(+)
NG2 陽性細胞	91.78 ± 0.08
血管内皮細胞	8.28 ± 1.82
ミクログリア	0.51 ± 0.51
アストロサイト	0.93 ± 0.93
オリゴデンドロサイト系細胞 (Olig2(+))	93.83 ± 0.82

⑤ 以上から、正常な成獣終脳皮質における分裂増殖細胞は、ほとんどが NG2(+) であり、それ以外では、ごく少数のグリアおよび血管内皮細胞が分裂していることが分かった。BrdU 長期標識実験 (最長 7 日間) の結果も、ほぼ短期標識実験と同様の結果を得た。BrdU(+) のうち、NG2(+) の集団と、Olig2(+) の集団がほぼ一致したことから、BrdU(+) のほとんどはオリゴデンドロサイトに分化してゆくことが推測された。長期標識実験の結果、分裂した BrdU 陽性娘細胞が対になって

存在していた例が多数観察されたが、多くは NG2(+)/Olig2(+) と NG2(-)/Olig2(+) の組み合わせであった事も (図 1)、上記の推測を支持する結果となった。このことは、正常成獣終脳皮質には NG2(+) 以外の未分化細胞マーカー分子を発現する細胞は存在しないことを意味する。また、本研究では、BrdU(+) のニューロンは観察されなかったことから、NG2(+) からニューロンへの分化には非常に長い時間を要する可能性が示唆された。

⑥ 本結果は、これまで問題となっていた NG2 や BrdU に対する免疫組織化学的検出方法を最適化し、高い精度で分裂増殖細胞を同定した初めての成果である。本研究結果は今後、当研究分野において高い頻度で引用されることが予想される。

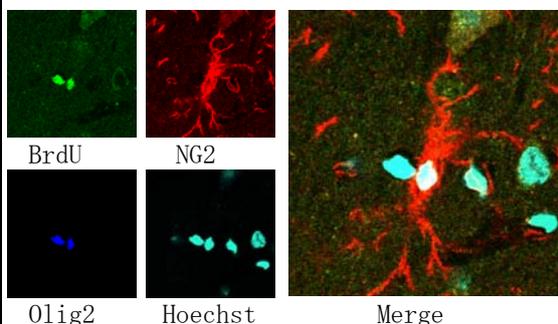


図 1 多くの NG2(+) はオリゴデンドロサイトへと分化する。 BrdU 長期投与の結果、NG2(+) は分裂し、一方は NG2(+) のままであるが、もう一方は NG2(-) の娘細胞が多数検出される。両者共に、Olig2 陽性であることから、オリゴデンドロサイト系 (未分化) 細胞である。NG2(-)/Olig2(+) 細胞は、成熟オリゴデンドロサイトに分化してゆくと推測される。

##### (2) ウイルスペクターによる GFP 標識

① 通常のレトロウイルスベクターを、成獣終脳皮質に注入した結果、注入針によって誘導された反応性アストロサイトが特異的に GFP 陽性になり、その他の細胞種は陰性であった。レトロウイルスは細胞周期の M 期に、核膜が消失する時だけベクターが細胞の核に移行することができる。また、NG2(+) は正常状態では絶対数が非常に少ない。さらに、成獣脳実質では、ウイルスベクターは、注入部位から長い距離を移動・浸透することはできず、注入針周囲の細胞にしか感染しない。そのために標識効率が非常に悪い事が原因として考えられた。解決策として、レトロウイルスベクターを複数箇所に大量に注入する実験をおこなったが、やはり NG2(+) を特異的に標識することはできなかった。以上の結果から、正常成獣終脳皮質に存在する増殖細胞

胞をウイルスベクターで標識・遺伝子導入する目的には、レトロウイルスベクターは適さないことが判明した。

② 増殖細胞特異的な活性を持つプロモーターの選別において、既に報告のある細胞周期制御因子 (PCNA, cdc25c, RRM1 など) のプロモーターをレンチウイルスに組み込み、成獣終脳皮質に注入した後、GFP の発現を指標に評価した。その結果、検討したプロモーター全てにおいて、非分裂細胞であるニューロンが GFP 陽性になることが分かった。しかも、GFP 陽性細胞のうち、ほとんどがニューロンであり、グリアなど他の細胞種はごく少数が標識されるにとどまった。これまで報告されたプロモーターアッセイの結果は、in vitro 培養細胞でおこなわれており、in vitro と in vivo では大きく異なる可能性が示唆された。初代培養ニューロンに対して、これらのレンチウイルスを感染させた場合、混入した線維芽細胞 (活発に増殖する細胞) が特異的に GFP 陽性になるが、ニューロン (非分裂細胞) はほとんど陰性であったことから (図 2)、この可能性を支持する。

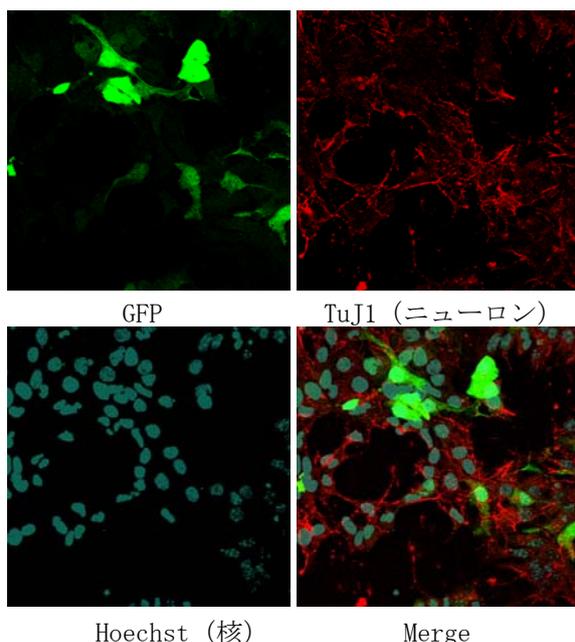


図 2 細胞周期制御因子プロモーター制御下に GFP を発現するレンチウイルスベクターを初代培養ニューロンに感染させた結果。GFP 陽性細胞は全て混入した線維芽細胞であり、in vitro ではプロモーターは増殖細胞においてのみ機能する。

## 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 8 件)

① Robel S, Mori T, 以下 7 名, Conditional deletion of beta1-integrin in astroglia causes partial reactive gliosis., *Glia*. 2009 in press, 査読有

② Kato K, 以下 8 名, 7 番目, Distinct Role of Growth Hormone on Epilepsy Progression in a Model of Temporal Lobe Epilepsy, *J Neurochem* 2009 in press, 査読有

③ Takamori Y, Mori T, Wakabayashi T, Nagasaka Y, Matsuzaki T, Yamada H. Nestin-positive microglia in adult rat cerebral cortex, *Brain Res.* 2009 May 13;1270:10-8 査読有

④ Mori T, Wakabayashi T, Takamori T, Kitaya K, Yamada H. Phenotype analysis and quantification of proliferating cells in the cortical gray matter of the adult rat, *Acta Histochem Cytochem.*, 2009 Feb 28;42(1):1-8. 査読有

⑤ Buffo A, 以下 7 名, 7 番目, Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105(9):3581-6, 2008 査読有

⑥ Colak D, Mori T. 以下 8 名, Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenic protein signaling in stem cells, *J Neurosci.*, 28(2):434-46, 2008 査読有

⑦ Ninkovic J, Mori T, Gotz M, Distinct modes of neuron addition in adult mouse neurogenesis, *J Neurosci.*, 27(40):10906-11, 2007 査読有

⑧ 森徹自、若林毅俊、高森康晴、山田久夫, Cre-LoxP システムの応用, *脳* 21, 第 10 巻 1 号 91-96 2007 年 査読無し

[学会発表] (計 3 件)

①高森康晴、森徹自、若林毅俊、山田久夫、ラット終脳皮質におけるネスチン陽性ミクログリアの同定、第 31 回日本神経科学大会、2008 年 7 月、東京

②若林毅俊、森徹自、高森康晴、小阪淳、三木友香里、山田久夫、神経特異的抗原 C38 は神経成熟を促進する、第 30 回日本神経科学大会、2007 年 9 月、横浜

③高森康晴，森徹自、若林毅俊、山田久夫、  
成獣ラットの脳のグリア系細胞におけるラ  
ミン・サブタイプの構成パターンの解析、第  
30回日本神経科学大会、2007年9月、横浜

〔図書〕（計 0 件）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森 徹自 (MORI TETSUJI)  
関西医科大学・医学部・講師  
研究者番号:30285043

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者