

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791322
 研究課題名（和文） Sox6 遺伝子導入による不死化神経幹細胞の作製と中枢神経系再生への応用
 研究課題名（英文） Immortalization of neuronal stem cell and application to central nervous system reproduction by Sox6-transfection.

研究代表者 濱田 美知子（HAMADA MICHIKO）
 神戸学院大学・薬学部・助教
 研究者番号：10248106

研究成果の概要：Sox6 は胎生期中枢神経の発生・分化に関与する転写因子である。我々はマウス神経幹細胞で、Sox6 が神経への分化を促進したり、生存を維持するのかどうか検討した。その結果、Sox6 は神経幹細胞の生存維持に強く関わっていた。また Sox6 によって神経細胞への分化は促進されたが、グリア細胞への分化を抑制することができた。更に Sox6 が神経細胞へ分化する時に重要な Wnt-1 を標的とすることも明らかとした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：神経化学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：Sox6、神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

Sox6 はマウス性決定因子 Sry の関連因子として発見された Sox 転写因子ファミリーのメンバーである。Sox ファミリーは性決定を始め、様々な組織の分化に重要な働きをもつ。近年、Sox6 は軟骨形成、骨形成などに重要な働きが報告され、軟骨組織での分化に関連していることがいくつかのグループによって明らかにされてきた。しかし、Sox6 の発現の主な発現部位が、軟骨組織ではなく胎生期中枢神経系であるにも関わらず、中枢神経系の発達における Sox6 の役割の研究は殆ど手つかずである。Sox6 が胚発生期に最も

高発現しているのは中枢神経系であり、中枢神経系の発生・分化に関与するかどうか非常に興味を持たれた。

我々は既に、神経分化モデル細胞である胚性腫瘍細胞 P19 で Sox6 が P19 細胞の神経細胞への分化の初期過程で発現すること、Sox6 の過剰発現がレチノイン酸（以下 RA）非依存的に神経細胞への分化をおこすこと、

Sox6 発現抑制によって神経細胞への分化を阻止し、RA によって顕著な apoptosis をおこすことを見出した。Sox6 によって神経細胞への分化だけでなく、細胞の生存に影響があったことから、Sox6 は P19 細胞が RA によって神経細胞へ分化する過程で細胞の

生存と神経分化への運命づけに関与する分子ではないかと推測した。即ち、神経細胞への分化と同時に観察される Apoptosis が Sox6 によって調節されている可能性を示唆しており、このメカニズムを解明することは細胞が Apoptosis へ向かうか、分化へ向かうかの運命を決定するメカニズムに迫ることができると考えられる。

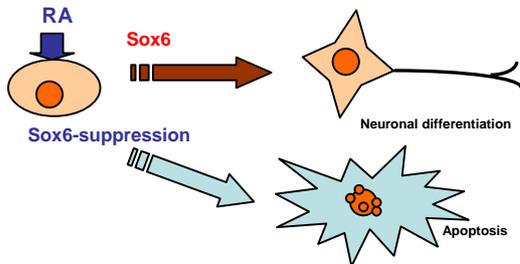


図1：P19細胞における Sox6 の役割
Sox6 は P19 細胞で RA 依存的に発現し、神経細胞への分化を促進する。このとき Sox6 の発現を抑制すると、RA 依存的な Apoptosis が起こる。また Sox6 を強制発現させると、RA なしに P19 細胞が神経細胞へ分化する。

2. 研究の目的

我々は、Sox6 が神経前駆細胞から神経細胞への分化の効率を高め、また分化時の細胞の生存を維持しているのではないかと考えた。そこで、マウス神経幹細胞で Sox6 が生存維持と神経細胞への分化を引き起こすかどうかを検討した。

本研究課題において、マウス神経幹細胞を用い、Sox6 が神経幹細胞の分化と生存を制御するメカニズムについて明らかにすることを目的とした。我々はすでに神経分化と関連する Sox6 の標的遺伝子の候補をいくつか見いだしており、Sox6 によって、直接転写制御される遺伝子を特定する。また、どの遺伝子の転写の変化が神経前駆細胞の神経細胞特異的な分化を引き起こすのか、また、生存の制御をどのようなメカニズムで行っているのかについて検討を行う。

さらに、これらの研究成果を応用する可能性についても検討を行った。特に Sox6 の過剰発現神経前駆細胞は生存率が高く、且つグリア細胞には分化せず神経細胞特異的に分化する特徴を持つことから、移植材料として期待できる。基礎研究として、このような神経前駆細胞を *in vitro* で培養し、性質の検討を行った。

3. 研究の方法

実験材料として、14 日胚、17 日胚マウスから神経幹細胞を採取し、無血清で EGF,

FGF-2, N2 supplement を含む DMEM/F-12 培地培地で浮遊培養し、実験に用いた。

マウス神経幹細胞の生存や神経細胞への分化に対する Sox6 の影響を調べるため、それぞれの神経幹細胞に Sox6 発現ベクター、および Sox6 siRNA 発現ベクターを導入した。導入細胞での遺伝子の発現は RT-PCR 法、あるいはリアルタイム PCR 法で調べた。またタンパク質の発現 Western-blot 法で測定した。

細胞の生存率は Hoechst33342 染色細胞に対する PI 染色細胞染色細胞の比を死細胞として求め、Apoptosis を起こした細胞は Annexin-V-Fluoro による染色を行い、いずれも蛍光顕微鏡で観察して計数することで算出した。

神経細胞への分化は、FGF-2 を含む DMEM/F-12 培地に 2%牛胎児血清を加えた培地で接着培養して誘導した。また、グリア細胞への分化は、DMEM/F-12 培地に 2%牛胎児血清を加えた培地で接着培養することで誘導した。神経細胞は抗 Nestin 抗体、抗 -III Tubulin 抗体、抗 MAP-2 抗体、グリア細胞は抗 GFAP 抗体、抗 MBP 抗体を用いた免疫染色によって検出し、幹細胞の検出には抗 SSEA1 抗体を用いた。標的遺伝子の検索には、ゲルシフトアッセイ、ChIP Assay、ルシフェラーゼアッセイを用いた。

4. 研究成果

14 日胚、17 日胚由来マウス神経幹細胞での Sox6 の発現量を調べた。14 日胚由来神経幹細胞では、Sox6 は発現が少なかったが、17 日胚由来神経幹細胞では、Sox6 は多く発現していた。

14 日胚および 17 日胚由来神経幹細胞に Sox6 を過剰発現させた時、神経幹細胞の生存率や、神経幹細胞の割合に変化はなかった。神経細胞へ分化させたとき、14 日胚由来神経幹細胞では、神経細胞の出現時期が早まり、出現頻度が上がった。17 日胚由来神経幹細胞でも同じような傾向が見られたが、14 日胚由来神経幹細胞よりその程度は軽微だった。これは、17 日胚由来神経幹細胞では、すでに Sox6 が多く発現しており、過剰発現による影響が出にくかったものと考えられる。

また Sox6 過剰発現 14 日胚、17 日胚由来神経幹細胞の両方で、グリア細胞へ分化誘導によって、形態学的、及び GFAP 陽性グリア細胞は検出されなかった。このとき、10%の細胞が、SSEA 1 陽性の神経幹細胞様の性質を示したが、あとの約 90%は接着培養により SSEA1 陽性の性質を誘導 2 日後には失い、Nestin 陽性細胞が多く見られた。このとき、Sox6 過剰発現によって、細胞増殖には影響がなかった。このことより、Sox6 導入神経幹細胞では、神

経幹細胞から神経前駆細胞の性質に変化するが、グリア細胞への分化が抑制できることが分かった。

一方、14日胚、17日胚由来神経幹細胞に Sox6 siRNA 発現ベクターを導入したとき、Sox6 の発現を約80%に抑えることができた。この条件で、14日胚、17日胚由来神経幹細胞を培養した時、17日胚由来神経幹細胞では著しい細胞死が起こった。また14日胚由来神経幹細胞では、細胞死の程度は約50%であったが、やはり細胞死が誘導された。またこの時、細胞は Annexin-V-Fluoro で染色されたことから、Apoptosis が起こったと考えられた。神経幹細胞でも P19 細胞と同じように Sox6 の抑制によって細胞が Apoptosis を起こすことから、Sox6 はやはり神経幹細胞の生存に重要であることが分かった。また、14日胚由来神経幹細胞と17日胚由来神経幹細胞で、Sox6 抑制による細胞死の割合が大きく異なったことから、神経幹細胞は発生の時期特異的に細胞死から免れるシステムを持っているのではないかと考えられた。

以上のことから、Sox6 遺伝子導入神経幹細胞は、生存率が高く、神経細胞へ高頻度に分化する幹細胞であることが分かった。

次に、Sox6 の標的遺伝子を探索するため、種々の神経分化関連遺伝子の発現の変動を調べた。神経幹細胞の分化段階での神経分化関連遺伝子の発現プロファイルから、Sox6 が Wnt-1、Mash-1、E-cadherin、N-cadherin 遺伝子より上流で働いている可能性が示唆された。これらの因子の中で、Wnt-1 はこれらの遺伝子の中でもっとも神経分化の初期段階で発現すること、Sox6 と発現プロファイルが似ていること、プロモーター領域に Sox6 結合配列を持つことなどから Sox6 によって転写調節を受ける遺伝子の第一候補と推定した。

Wnt-1 のプロモーター中に Sox6 結合配列があるので、この配列を含む Wnt-1 プロモーター配列のプローブを作成してゲルシフトアッセイを行った。その結果、Sox6 タンパクがこの結合配列に特異的に結合することが分かった。更に Wnt-1 プロモーターの Sox6 結合サイトを探索したところ、少なくとも3箇所の結合できるサイトがあることがわかった。次に、それぞれのサイトについて ChIP Assay により、in vivo で、クロマチン中の Wnt-1 プロモーターに Sox6 が結合しているかどうかを調べた。ゲルシフトアッセイによって Sox6 が結合した3箇所のサイトのうち、少なくとも1箇所には in vivo でも結合していることが分かった。さらにそのサイトについて、ルシフェラーゼアッセイにより、Sox6 が結合することによって Wnt-1 プロモーターを活性化することも分かった。これらのことから、Sox6 は Wnt-1 を直接転写活性化し、神

経幹細胞で神経細胞への分化を促進しているのではないかと考えられた。

また Sox6 発現抑制によって、Apoptosis が起こったことから、Sox6 によって発現が抑制される Apoptosis 関連遺伝子があるのではないかと考えた。そこで、Sox6 発現抑制細胞で、発現が増加する遺伝子を探索し、いくつかの候補を得た。それらについて現在研究を行い、Sox6 によって神経幹細胞の生存が維持されるメカニズムの検討を行っている。

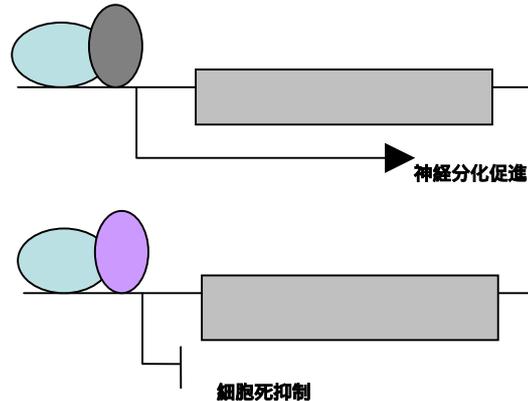


図2 : Sox6 は Wnt-1 プロモーターに直接結合し、神経幹細胞から神経細胞への分化を促進している。また、細胞死に関連する遺伝子 X に対しては、発現を抑制する。

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 2 件)

Takano M, Satoh C, Kunimatsu N, Otani M, Hamada-Kanazawa M, Miyake M, Ming K, Yayama K, Okamoto H. Lipopolysaccharide activates the kallikrein-kinin system in mouse choroid plexus cell line ECPC4. *Neurosci Lett.* 434(3), 査読有り 310-4 (2008)

Kawano H, Nagata T, Narahara M, Hamada-Kanazawa M, Miyake M. Triglyceride accumulation by peroxisome proliferators in rat hepatocytes. *Biol Pharm Bull.* 30(4), 査読有り 627-32.(2007)

[学会発表] (計 3 件)

濱田 美知子
マウス神経幹細胞の神経分化に対する Sox6 の影響
日本薬学会 2009年3月27日京都

濱田 美知子
Sox6 は胚性腫瘍細胞 P19 の神経分化時に
Wnt-1 プロモーターを活性化する
日本分子生物学会 2008 年 12 月 11 日神戸

濱田 美知子
胚性腫瘍細胞 P19 の神経細胞への分化誘導
時における Sox6 の標的遺伝子の検索
日本分子生物学会 2007 年 12 月 12 日横浜

6 . 研究組織

(1)研究代表者
濱田 美知子
神戸学院大学・薬学部・助教
研究者番号：10248106