

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：20500341

研究課題名(和文) 樹状細胞が分泌する新規神経幹細胞増殖因子の機能解析

研究課題名(英文) Functional Analysis of a newly Neural stem/progenitor growth factor secreted from Dendritic cells

研究代表者

大多 茂樹(OHTA SHIGEKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20365406

研究成果の概要(和文)：樹状細胞が分泌する Macrophage migration inhibitory factor (MIF) が神経幹・前駆細胞の細胞増殖活性を有することや、神経幹・前駆細胞の自己複製能を亢進する活性を有することを新たに明らかにするとともに、それらの活性を担う分子機構を解明することに成功した。また、MIF が神経幹・前駆細胞の細胞移動能を調節できることも、新たに明らかにした。これらの知見は、MIF による内在性神経・前駆細胞の活性化を基盤とした種々の神経変性疾患治療への道を切り開いたと言える。

研究成果の概要(英文)：Macrophage migration inhibitory factor (MIF), which is secreted from dendritic cells, was identified as a new growth factor for neural stem/progenitor cells (NSPCs). MIF also could increase the self-renewal ability of NSPCs. In the present study, we identified molecules that support those functions. Furthermore, we clarified that MIF can control the cell migration of NSPCs. These findings will shed light on the therapeutic potential of MIF for the treatment of neural degenerative disorders through the endogenous NSPCs activation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：幹細胞生物学

科研費の分科・細目：神経科学・神経薬理学

キーワード：神経科学 移植、再生医療、神経幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1)免疫担当細胞である樹状細胞が神経幹・前駆細胞を増殖できることが *in vitro* で証明されていた。

(2)樹状細胞移植により、マウス脊髄損傷モデルマウスにおける治療効果が認められたが、その際に内在性神経幹・前駆細胞の増殖が亢進されることが明らかとなっていた。

(3)これらの樹状細胞移植の有する内在性神

神経幹・前駆細胞増殖能を担っている分子機構に関する情報はあまり多くなかった。

(4) 独自に、樹状細胞が発現する MIF が、MIF レセプターである CD74 等を介して神経幹・前駆細胞増殖能を有する可能性を見出していた。

## 2. 研究の目的

(1) MIF やそのレセプターの発現を神経幹・前駆細胞やマウスの脳において明らかにする。

(2) 樹状細胞が分泌する MIF が、神経幹・前駆細胞の増殖および自己複製能や分化能にどのような効果を与えるかを検証する。

(3) MIF がおよぼす神経幹・前駆細胞への効果を明らかにしたうえで、それらの効果を担う分子的基盤を、種々の分子生物学的な手法を用いて解明する。

(4) 神経幹・前駆細胞に対する MIF の効果を、神経変性疾患治療を目指して *in vivo* において明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) マウス線条体および脊髄由来神経幹・前駆細胞培養およびニューロスフェア形成実験

マウス胎生 14 日脳線条体および脊髄組織より神経幹・前駆細胞をニューロスフェア法を用いて、ヒト EGF, FGF2 (PeproTech) および B27 (Invitrogen) を含む Neurobasal (Invitrogen) 培地を用い初代培養を行った。ニューロスフェア形成実験では、規定量の神経幹・前駆細胞 (ニューロスフェア) を Accumax (Innovative Cell Technologies) を用いて単一細胞としたのち、セルソーター (Epics ALTA, ベックマンコールタール) を用いて 96 穴プレートに播種したのち、低密度培養を行った。

(2) 抗体および試薬

BrdU (Abcam), CXCR4 (BD bioscience), GFAP (Biomedical Technologies), ISO-1 (Calbiochem), Akt, Phospho-Akt, AMPK, Phospho-AMPAK, Phospho-ERK, STAT3, Phospho-STAT3 (Cell Signaling), MBP(DAKO), CD44(e-Bioscience), Nestin (IBL), BCL2 (MBL), GLUT1, MIF (R&D), MIF ELISA kit (Sapporo Immuno Diagnostic Laboratory), BCL-XL, CD74, Erk (SantaCruz), Actin,  $\beta$ -tubulin (Sigma)。

(3) 遺伝子発現解析

Trizol (Invitrogen) を用いて細胞から RNA を抽出後、PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen) を使用して RNA を精製し、PrimeScript RT Master Mix (Takara Bio) を用い cDNA 合成を行った。SYBR Premix Ex TaqII (Takara Bio) を用いて PCR 反応を行い、ABI Prism7900HT (ABI) で各遺伝子発現量を解析した。

(4) shRNAi 実験

MIF siRNA (GGGUCUACAUCUAUUAUAT) を pSIREN ベクター (Clontech) に組み込み、pVSVG ベクターと共に 293GP 細胞にリン酸カルシウム法によりトランスフェクションし、48 時間後、培養上清よりレトロウィルスを回収した。21K、2 時間の超遠心によりウィルス液を濃縮するとともに、293T 細胞を用いて GFP の陽性率を指標にウィルス力値を測定した。

(5) 細胞増殖・細胞周期および細胞死アッセイ

細胞の生存率は CellTiter Glo (Promega) を用い解析した。BrdU の取り込み能を免疫細胞化学的手法で解析するとともに、ヘキスト染色により細胞周期をフローサイトメトリーを用いて解析した。細胞死は Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) を用いて解析した。

(6) 免疫組織染色および免疫細胞染色解析

免疫組織染色は、マウス組織をホルマリン固定後、凍結切片として免疫染色解析に供した。免疫細胞染色解析では、細胞をホルマリンで固定したのち、PBS 洗浄後、直ちに免疫染色解析に供した。各 1 次抗体に対して、Alexa488, 568 標識 2 次抗体 (Invitrogen) を用いて可視化するとともに、DAPI を用いて核を染色した。それぞれの画像は共焦点顕微鏡 (LMS510, Zeiss) を用いて解析した。

(7) ウェスタンブロット解析

各サンプルは細胞溶解剤 (RIPA, Thermo Scientific) を用いて、蛋白質を細胞より可溶化したのち、Bradford 法により蛋白定量を行った。SDS-PAGE 法により試料を電気泳動し、Hybond-C (GE) メンブレンに転写後、各抗体反応後、ECL-Plus (GE) で化学発光を行いシグナルの検出を行った。

(8) フローサイトメトリー

細胞を回収し、Accumax (Innovative Cell Technologies) を用いて細胞を単一にしたのち、FACS バッファー (0.5% BSA, 2mM EDTA/PBS) 中で各抗体と反応させ、FACS (Epics-XL, ベックマンコールタール) で解析した。

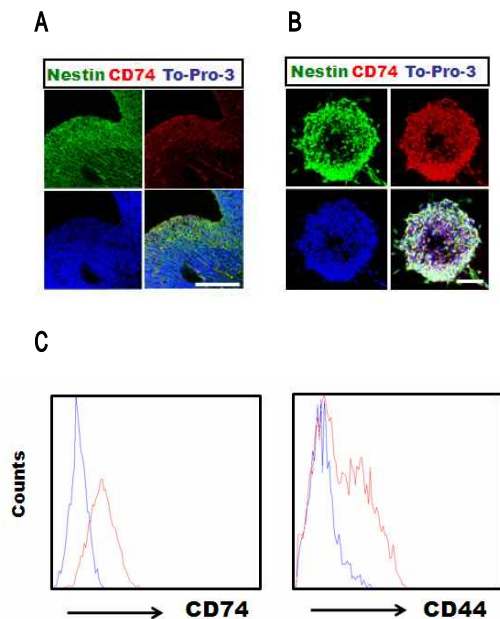
### (9)細胞移動能解析

In vitroにおける、セルインサートを用いた細胞移動能は xCELLigence (Roche)を用いて解析した。また、脳スライスカルチャーを用いた系では、マウス胎生 14 日の胎児脳をピプラトームを用いてスライスにしたのち、脳スライスをセルインサート (Millipore) 上に置き、10%FCS 含有 N2 培養培地を用いて培養した。同一サイズの GFP で蛍光ラベルしたニューロスフェアを脳スライス線条体上におき、培養 2 日後の細胞移動度を蛍光強度を指標にして計測した。

## 4. 研究成果

### (1) MIF レセプターの発現解析

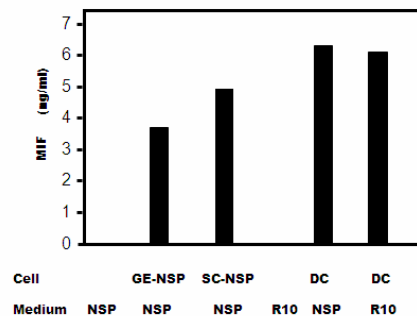
免疫組織化学的手法により MIF レセプターとして同定されている CD74 の発現を、マウス胎生 14 日終脳(図 A)および、同線条体より初代培養した神経幹・前駆細胞(ニューロスフェア)において(図 B)、神経幹・前駆細胞マーカーとして知られるネスチンと比較して解析した。また、ニューロスフェアにおける MIF レセプター CD74, CD44 の発現をフローサイトメーターを用いて解析した(図 C)。これらの解析結果により、神経幹・前駆細胞に MIF レセプターが発現していることが示された。



### (2) 神経幹・前駆細胞における MIF の発現解析

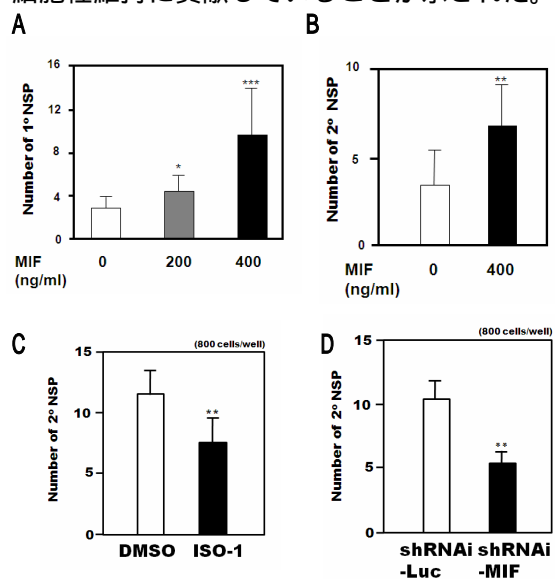
マウス胎生 14 日終脳・線条体および脊髄よりそれぞれ初代培養したニューロスフェア (GE-NSP, SC-NSP) および成体マウス脾臓より単離した樹状細胞 (DC) を神経幹細胞培養培地 (NSP) もしくは R10 (10%血清含有 RPMI 培地) 培養培地中で一晩培養後、それぞれの培養上

清中に含まれる MIF の発現量を ELISA を用いて解析した。その結果、各ニューロスフェア培養上清中に MIF の発現を認めた。このことは、神経幹・前駆細胞が MIF を自発的に分泌していることを示している。



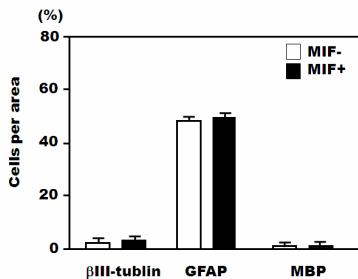
### (3) MIF による神経幹・前駆細胞の幹細胞性維持

マウス胎生 14 日終脳・線条体より 1 次ニューロスフェアを形成させる際に、MIF を添加させたところ、濃度依存的に形成されるニューロスフェア数の増加を認めた(図 A)。また、ニューロスフェア形成時に MIF を 5 日間添加し、再度、ニューロスフェアを単一細胞にしたのち、再培養して形成される 2 次ニューロスフェア数を観察した。その結果、MIF 添加処理により、有意な 2 次ニューロスフェアの形成能の亢進が観察された(図 B)。このことは、MIF が神経幹・前駆細胞の幹細胞性の維持に参与していることを示唆している。また、2 次ニューロスフェアの形成能は、MIF 阻害剤である ISO-1 処理により阻害された(図 C)。さらに shRNAi を用いた内在性に発現する MIF の発現低下によっても、同様に 2 次ニューロスフェアの形成能は低下した(図 D)。これらの結果からも、MIF が神経幹・前駆細胞の幹細胞性維持に貢献していることが示された。



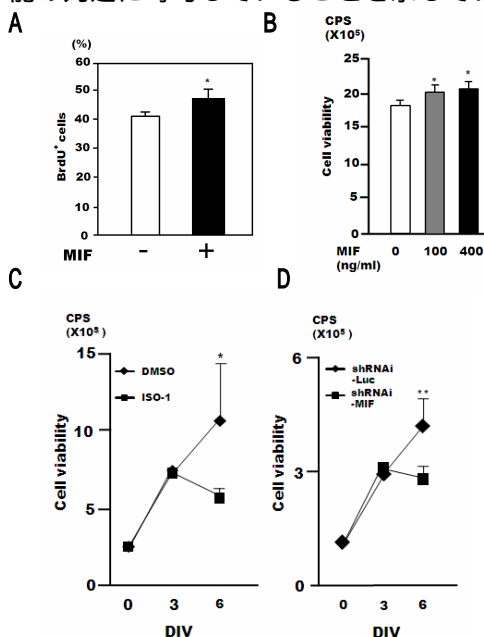
(4) MIF が神経幹・前駆細胞の分化能に与える効果の検証

MIF が神経幹・前駆細胞の多分化能に影響を与えるかを検証した。ニューロスフェア形成時に MIF を添加培養したのちに、ニューロスフェアを、増殖因子非存在下で、ニューロン・グリア・オリゴデンドロサイト各細胞に分化させて、それぞれの細胞系譜に分化する割合を調べた。その結果、MIF は特定の細胞系譜へ選択的に分化誘導させる能力がないことが明らかとなった。

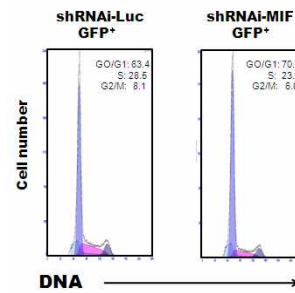


(5) MIF による神経幹・前駆細胞の細胞増殖能の亢進

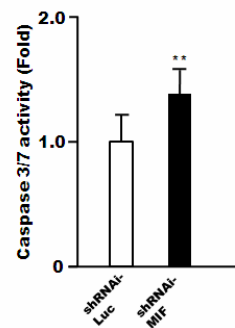
MIF をニューロスフェアに添加培養後 3 日目に BrdU を加え、さらに 1 日培養後、BrdU 陽性細胞数をコントロールと比較解析した。その結果、有意に MIF により BrdU 陽性細胞数が増加した(図 A)。また、MIF 添加後 4 日での細胞数の増加も認めた(図 B)。さらに、MIF 阻害剤およびレトロウイルスにより発現させた shRNAiMIF をニューロスフェアに作用させた際に、それぞれ細胞数の経時間な減少を認めた(図 C, D)。shRNAiMIF の系で、細胞周期解析を行ったところ、フローサイトメトリーを用いた解析により、S 期の減少が MIF の発現低下により観察された(図 E)。これらの結果は MIF が神経幹・前駆細胞の細胞増殖能の亢進に寄与していることを示している。



E



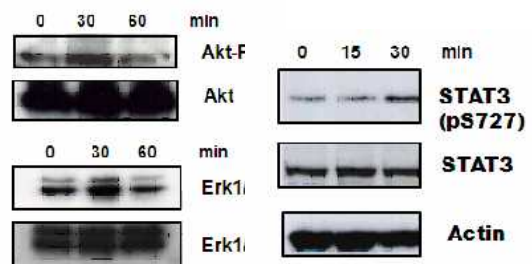
(6) MIF の発現低下によるアポトーシス誘導  
ニューロスフェアに shRNAiMIF を作用させて 5 日後に Caspase3/7 の酵素活性を調べたところ、MIF の発現低下により有意な酵素活性の増加が認められた。また、ISO-1 添加によっても、同様な Caspase3/7 の酵素活性の増加が認められた(未発表データ)。

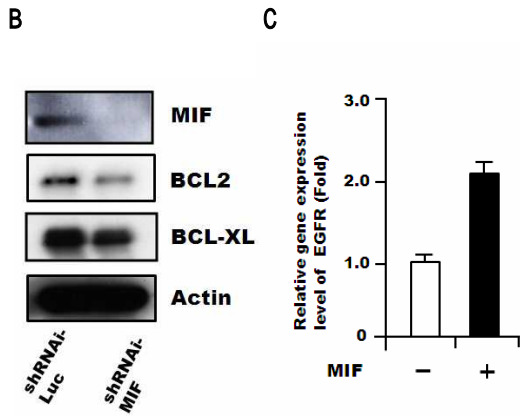


(7) MIF による制御されるシグナル伝達因子の解析

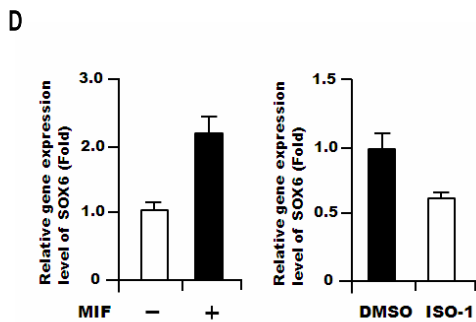
神経幹・前駆細胞において、MIF によりどのようなシグナル伝達因子が活性化されるかについて検証した。その結果、幹細胞の生存や増殖に重要な役割を果たすことが知られている Akt, Erk, Stat3 のリン酸化が MIF により亢進されることが明らかとなった(図 A)。また、逆に MIF の発現をレトロウイルスを用いて発現低下させたとき、細胞生存因子として知られる BCL2, BCL-XL の発現低下が認められ、MIF の発現低下がアポトーシスを誘導する先の結果を支持している(図 B)。また、MIF により EGFR の発現亢進が認められ(図 C)、このことも MIF による神経幹・前駆細胞の生存維持亢進の効果を示している。

A

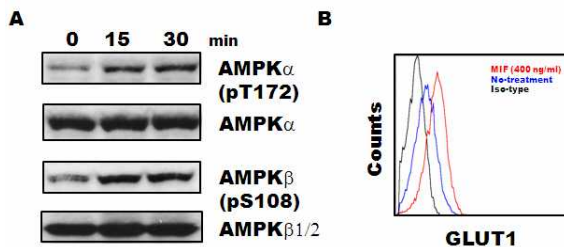




さらに、神経幹・前駆細胞の幹細胞性維持に重要であることが知られる Sox6 (投稿準備中)の発現を MIF が亢進すること、また MIF 阻害剤である ISO-1 処理により逆に SOX6 の発現が低下することを新たに見出した(図 D)。

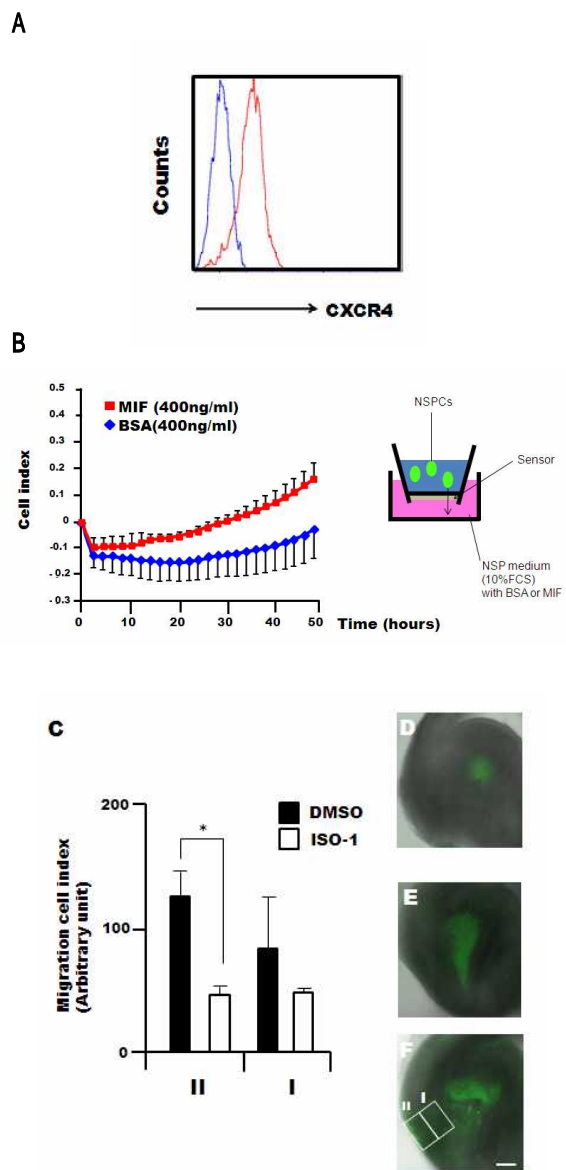


(8) MIF による GLUT1 の発現制御  
 神経幹・前駆細胞において、GLUT1 の発現を制御することが知られている AMPK のリン酸化を MIF が亢進しうること(図 A)及び、MIF により GLUT1 の細胞表面での発現が亢進することも新たに見出した(図 B)。このとき、細胞内の GLUT1 の総発現量は、MIF 刺激により変化しないことを RT-PCR 解析により明らかとした(未発表データ)。これらのことにより、神経幹・前駆細胞において MIF が細胞でのグルコース代謝を促進して、その生存維持に貢献していることが示唆された。



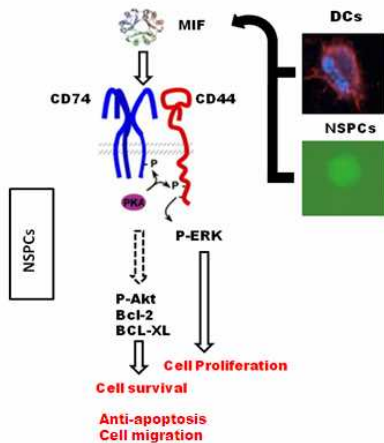
(9) MIF による細胞移動の制御  
 MIF はケモカインレセプター CXCR4 をそのレセプター複合体(CD74/CD44)に抱合するという報告があるため、神経幹・前駆細胞におけ

る CXCR4 の発現をフローサイトメトリーで確認したところ、その発現を認めた(図 A)。そこで、MIF が有する細胞移動への効果を *in vitro* で検証することにした。最初に、セルインサートを用いた系を用いて、MIF による細胞移動能を評価した。その結果、MIF のより神経幹・前駆細胞の細胞移動の亢進が認められた(図 B)。また、胎生 14 日脳スライス上に、GFP でラベルしたニューロスフェアを置き、その後 ISO-1 の添加の有無の条件のもとで、培養 2 日後の GFP 陽性細胞の移動度を計測した。その結果、コントロール(DMSO)と比較して ISO-1 添加により、有意に細胞移動が抑制されていた(図 C)。これらのことは MIF が神経幹・前駆細胞に対してケモアトラクタントとしての効果を有することを示している。



## (8)まとめ

神経幹・前駆細胞において MIF およびそのレセプターである CD74/CD44/CXCR4 が発現していることを新たに明らかにすることができた。また、MIF は様々な幹細胞性維持シグナルを駆動させるとともに、その細胞増殖にも貢献していることが明らかとなった。当初、樹状細胞が分泌する神経幹・前駆細胞増殖因子として同定された MIF であるが、MIF が神経・前駆細胞の細胞移動を誘因する活性を有することが明らかとなったため、MIF を用いて、各種神経変性疾患において、内在性の神経幹・前駆細胞増を活性化および誘因することにより、それらの治療に貢献することができると示唆された。今後は、各種の脳虚血・脊髄損傷動物モデル等における MIF の治療効果を検証する必要がある。最後に、最近の我々の研究成果により MIF がグリオーマ幹細胞においても機能を有することが明らかとなった。今後、グリオーマ幹細胞における MIF の果たす役割の解明が、グリオーマ治療法の開発に向けて重要な課題と言える。



## 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0件)

〔学会発表〕(計5件)

Ohta S, Kawakami Y, Okano H, Toda M. Functional analysis of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mouse neural stem/progenitor cells. The 16th international conference of the international society of differentiation. November 15 -18. 2010. Nara, Japan.

Ohta S, Kawakami Y, Okano H, Toda M. Functional analysis of macrophage

migration inhibitory factor (MIF) in the mouse neural stem/progenitor cells. Neuro2010. September 2-4. 2010. Kobe, Japan.

Fukaya R, Ohta S, Kawakami Y, Matsuzaki Y, Okano H, Kawase T, Toda M. MIF Acts as a direct regulation of p53 in the nuclei of glioma cells and is a novel molecular target for the treatment of glioma cancer stem cells. 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月9-12日, 横浜.

Ohta S, Kawakami Y, Okano H, Toda M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes proliferation and cell survival of neural stem/progenitor cells. Neuro2009. September 16-18. 2009. Nagoya, Japan.

Fukaya R, Ohta S, Kawakami Y, Matsuzaki Y, Okano H, Kawase T, Toda M. MIF acts as a direct regulation of p53 in the nuclei of glioma cells and is a novel molecular target for the treatment of glioma cancer stem cells. 7th ISSCR. July 9-11. 2009. Barcelona, Spain.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大多 茂樹 (OHTA SHIGEKI)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号: 20365406

### (2)研究分担者

戸田 正博 (TODA MASAHIRO)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号: 20217508