

平成 22年 5月 24日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2008~2009
課題番号：20791017
研究課題名 (和文) 大脳皮質由来オリゴデンドロサイト前駆細胞の多分化能性と移植後における動態解析
研究課題名 (英文) Genetic fate mapping of Olig2 progenitors derived from cortex after cortical injury and cell transplantation.
研究代表者
 奥田 洋明 (OKUDA HIROAKI)
 奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：40453162

研究成果の概要 (和文)：

神経幹細胞は胎生期だけでなく成体脳においても存在が認められ、最近では成体の大脳皮質においても神経幹細胞の存在が少数であるが報告され始めており、我々はこの大脳皮質に存在する神経幹細胞に注目した。

大脳皮質損傷直後において損傷周囲に分裂能を持つ細胞が増殖するが、それらの細胞は Olig2 陽性細胞であり、その後、アストロサイトに分化していることが明らかとなった。

Olig2 陽性細胞は発生・発達期において神経細胞およびオリゴデンドロサイトに分化することが報告されているが、さらに今回の結果より大脳皮質損傷時においてアストロサイトにも分化することが判明した。これらのことから、Olig2 陽性細胞は多分化能を持つ細胞であり、周囲の環境により分化が制御される可能性が考慮される。

研究成果の概要 (英文)：

Recent studies have begun to draw attention to neurogenesis in various brain regions other than the hippocampus and subventricular zone of the forebrain. These include several reports of adult neurogenesis in the cortex. Our results provide direct evidence that Olig2 progenitors with proliferative potential exist in adult cortex and that they preferentially differentiate into astrocytes in response to injury. Our study raises the possibility that Olig2 progenitors, which are, at least in part, the origin of astrocytes in glial scars, would be a target for potential therapeutic interventions after CNS injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：オリゴデンドロサイト前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系では疾病や外傷などにより一度損傷を受けると成熟神経細胞に分裂能が無いいため、修復・再生させることが極めて困難である。従って、治療方針としては一次的・二次的損傷を最小限に抑えることが主流であったが、現在、中枢神経系疾患の治療方法の一つとして神経幹細胞を用いた移植による再生が盛んに研究されており、実際に臨床応用も成されてきている。しかしながら、これら神経幹細胞を用いた治療には未だ供給源の問題や技術的・倫理的問題などが多数残されている。我々はこれらの問題を解決する方法の一つとして、大脳皮質損傷後に発現・増殖する Olig2 陽性細胞の制御による神経再生への応用を検討した。

2. 研究の目的

神経幹細胞は胎生期だけでなく成体脳においても存在が認められ、神経細胞への分化が数多く報告されているが、それらの多くは側脳室下帯および海馬歯状回顆粒下層などのごく限られた部位である。しかしながら最近では成体の大脳皮質においても神経幹細胞の存在が少数であるが報告され始めており、我々はこの大脳皮質に存在する神経幹細胞に注目した。

我々の以前の結果より、現在までオリゴデンドロサイトの前駆細胞であると考えられてきた OPC が成体大脳皮質における神経幹細胞である可能性が示唆されている。

従って、本研究の目的は第一に成体大脳皮質に存在する Olig2 陽性細胞が神経幹細胞である可能性を検討すること、第二にその細胞の再生医療への応用の可能性を検討することである。

本研究では期間内に以下の2点について検討し、成体大脳皮質における神経幹細胞の存在およびその細胞の再生医療への応用の可能性を検討した。

1. 成体マウス大脳皮質において損傷後に増殖する Olig2 陽性細胞である OPC が多分化能をもつ神経幹細胞である可能性をダブルトランスジェニック (tg) マウスを用いて検討する。
2. 大脳皮質損傷後より得られた OPC を含む細胞群より *in vitro* 下で神経幹細胞である neurosphere を形成させ、増殖させた後、

損傷下に移植して大脳皮質機能回復への影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) ダブル tg マウス作成

損傷後に Olig2 を一過性に発現した細胞を長期間可視化できるマウスを作成した。

(2) ダブル tg マウスを用いた脳損傷後における Olig2 遺伝子の発現解析

(1)で作成したダブル tg マウスを用いて脳損傷後の Olig2 遺伝子の発現変動を解析した。

(3) 大脳皮質損傷後の Olig2 発現細胞の動態解析

損傷後に発現した Olig2 発現細胞 (GFP 陽性細胞) がその後、どの系統の細胞に分化していくのかを、各種細胞マーカーを用いて免疫組織化学的に解析した。

(4) 大脳皮質損傷部位からの幹細胞の単離・同定

近年盛んに行われている神経幹細胞の培養技術と併せて、大脳皮質損傷部位から Olig2 陽性細胞の分離技術を検討した。

4. 研究成果

ダブル TG マウスは Olig2 を一過性に発現した細胞をその後、長期間にわたり GFP でマーキングすることが出来る。平成 20 年度はこのマウスを用いて大脳皮質損傷後における Olig2 陽性細胞の動態を解析した。

(1) ダブル tg マウス作成

損傷後に Olig2 を一過性に発現した細胞を長期間可視化できるマウスを作成した。方法としては下記の tg マウスの交配によりダブル tg マウスを作成した。

① Olig2 遺伝子座に tamoxifen 誘導性 Cre-recombinase をノックインした tg マウス

② ROSA26 遺伝子座に loxP-stop-loxP-GAP43EGFP 配列をノックインした tg マウス

Olig2(-/-)個体は出生しないため、この (+/-) 個体と②の (+/+) 個体を交配して

Olig2-CreER/ROSA26-loxP-stop-loxP-GAP43E GFP のダブル tg マウスを作成した。

(2) ダブル tg マウスを用いた脳損傷後における Olig2 遺伝子の発現解析

(3) 大脳皮質損傷後の Olig2 発現細胞の動態解析

大脳皮質損傷直後において損傷周囲に分裂能を持つ細胞が増殖するが、それらの細胞は Olig2 (及び GFP) 陽性細胞であった。これら GFP 陽性細胞の分化の動態を解析すると、大部分の細胞はアストロサイトのマーカーである GFAP や s100b と共陽性であった。この結果から、大脳皮質損傷時において Olig2 陽性細胞はオリゴデンドロサイトではなくアストロサイトに分化していることが明らかとなった。この成果を論文として報告している (Kouko T. et al., 2008, Journal of Neuroscience Research)。

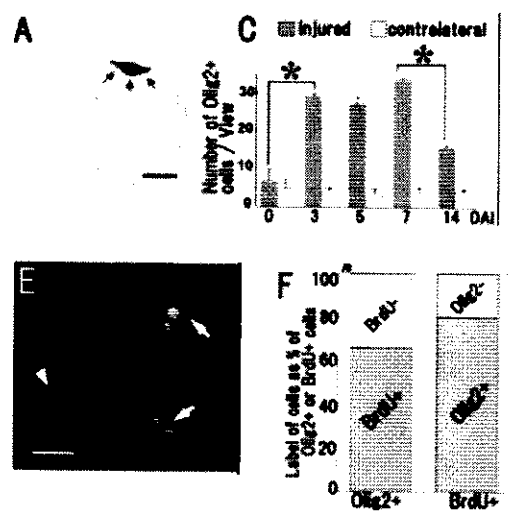


Fig.1 大脳皮質損傷後において増殖する細胞の多くは Olig2 陽性細胞であった。

Olig2 陽性細胞は発生・発達期において神経細胞およびオリゴデンドロサイトに分化することが報告されているが、さらに今回の結果より大脳皮質損傷時においてアストロサイトにも分化することが判明した。これらのことから、Olig2 陽性細胞は多分化能を持つ細胞であり、周囲の環境により分化が制御される可能性が考慮される。

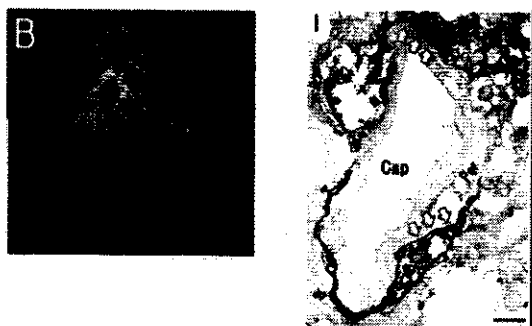


Fig.2 大脳皮質損傷後において Olig2 陽性細胞はアストロサイトに分化する。

平成21年度はこのダブルTG マウスを用いて大脳皮質より Olig2 陽性細胞を単離し、培養条件を検討した。

(4) 大脳皮質損傷部位からの幹細胞の単離・同定

マウス大脳皮質より単離された Olig2 陽性細胞はオリゴデンドロサイトの培養条件下で増殖し、その後、成熟オリゴデンドロサイトに分化した。しかしながら、損傷後のマウス大脳皮質より得られた Olig2 陽性細胞は同様の培養条件下でもオリゴデンドロサイトへは分化せず、アストロサイトへの分化傾向が認められた。この結果は in vivo の結果を反映するものであり、大脳皮質由来 Olig2 陽性細胞は多分化能を有し、周囲の環境により分化が制御される可能性が考慮される。

以上の結果より、Olig2 陽性細胞は多分化能を持つ細胞であり、周囲の環境により分化が制御される可能性が考慮される。

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3件)

- ① Tatsumi K, Okuda H, Makinodan M, Yamauchi T, Makinodan E, Matsuyoshi H, Manabe T, Wanaka A.
Transient activation of Notch signaling in the injured adult brain.
Journal of Chemical Neuroanatomy
2010 39:15-19 査読有
- ② Islam MS, Tatsumi K, Okuda H, Shiosaka S, Wanaka A.
Olig2-expressing progenitor cells preferentially differentiate into oligodendrocytes in cuprizone-induced demyelinated lesions.
Neurochemistry International
2009 54:192-198 査読有
- ③ Tatsumi K, Takebayashi H, Manabe T, Tanaka KF, Makinodan M, Yamauchi T, Makinodan E, Matsuyoshi H, Okuda H, Ikenaka K, Wanaka A.
Genetic fate mapping of Olig2

progenitors in the injured adult
cerebral cortex reveals preferential
differentiation into astrocytes.
Journal of Neuroscience Research
2008 86:3494-3502 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 洋明 (OKUDA HIROAKI)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40453162