

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500339

研究課題名（和文） 神経幹細胞の組織特異的な初期化

研究課題名（英文） Rejuvenation of neural stem cells

## 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（和文）：本研究は、発生初期の幼若な神経幹細胞において、その高い多能性を規定している遺伝子群を同定と、それらの強制発現によるマウス胎仔脳発生後期型あるいは成体神経幹細胞の若返り（組織特異的な初期化）を目指して行われた。そして、独自のマウス ES 細胞神経分化系を用いた網羅的遺伝子発現解析と機能スクリーニングにより、神経幹細胞の時系列特異的な分化能変化に影響を与えていると思われる長鎖ノンコーディング RNA(lncRNA) を 3 個同定した。

研究成果の概要（英文）：We attempted to identify the factors, which regulate plasticity of early embryonic neural stem cells and can rejuvenate late embryonic and adult neural stem cells to be early ones with high plasticity. In the result, we have identified three long on-coding RNA (lncRNA) which are involved in the temporal change in the developmental potential of neural stem cells through global gene expression profiling analyses and functional screenings using our original neural differentiation system of mouse ES cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2011 年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 2012 年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 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：脳神経科学・神経化学、神経薬理学

キーワード：神経幹細胞・初期化・分化・神経細胞・グリア・lncRNA

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系の構築の基盤となる細胞種であり、発生期から成体にいたるまで中枢神経系に存在し続ける神経幹細胞に関する研究は、神経発生の更なる理解だけでなく、中枢

神経系の再生医療や薬剤開発への応用が期待されている。しかしながら、最近、神経幹細胞の分化能は発生の進行に伴って変化することが明らかになってきており、発生初期

にだけ作られる特定のニューロンを発生後期あるいは成体神経幹細胞より分化させることは難しい。このことは、成体に存在する神経幹細胞の利用に限界があることを示唆している。また、このような神経幹細胞の発生ポテンシャルの時系列特異的制御に関して、その分子機構についてはそれまでほとんど何も分かっていなかった。

研究代表者は、それまで、神経幹細胞の増殖、分化および長期維持機構に関する研究と、マウス胚性幹細胞(ES細胞)からの *in vitro* の神経発生再構成系の開発を行ってきた。そして、その中で、神経幹細胞の増殖制御における細胞内シグナル伝達機構に時系列特異的な変化が存在することを見出し、そのような変化を含めた神経幹細胞の発生を *in vitro* で再構成することのできる ES 細胞の分化系を構築した。さらに、この ES 細胞の分化系を利用して、神経幹細胞の発生の初期と後期で発現の変化する遺伝子群のプロファイリング、および過剰発現とノックダウンによる機能スクリーニングを行い、神経幹細胞の時系列特異的な分化能の変化の制御に関与する転写因子としてオーファン型核内受容体の一種である Coup-TFI/II を同定した。Coup-TFI/II は初期神経幹細胞が後期型に移行するのに必須の因子であったのである。

## 2. 研究の目的

哺乳類では、成体脳においても神経幹細胞あるいは前駆細胞が絶対数は少ないものの存在し、脳の領域によっては神経新生を行っていることが明らかになり、これら前駆細胞を成長因子等の刺激により動因、つまり増幅および分化させ機能回復を促す治療モデルの開発も行われている。しかしながら、神経幹細胞の時系列特異的の分化能変化という壁が、成体神経幹細胞の *in vivo* における動因というアプローチの限界を現状では示唆している。そこで、本研究は、神経幹細胞の若返りあるいは組織特異的な初期化を達成することによってこの壁を一気に乗り越えることを目的として行われた。

## 3. 研究の方法

初期神経幹細胞のみに特異的に発現している遺伝子を DNA マイクロアレイ解析と *in vivo* における発現パターンの解析により同定し、該当遺伝子のゲノム座へ薬剤耐性遺伝子を挿入したノックイン ES 細胞の作成後、ES 細胞を用いた機能スクリーニングを、Coup-TFI/II の下流で機能していると思われるクロマチン再構成因子を含めた転写制御因子を中心に行い、初期神経幹細胞の可塑性維持に必要な遺伝子群の同定に至ることを目指した。

## 4. 研究成果

まず、初期神経幹細胞の多分化能を規定している遺伝子を同定するために、後期神経幹細胞よりも初期神経幹細胞で発現が有意 (> 2 倍) に高く、Coup-TFI/II の下流で発現が抑制される遺伝子群を多数同定した。次に、それらのマウス胎仔での時間的・空間的発現パターンを遺伝子発現データベースの検索と *in situ hybridization* によって調べ、特異性を確認した。しかしながら、初期神経幹細胞に特異的な発現をする遺伝子は確認されなかった。そこで、初期および後期神経幹細胞にそれぞれ特異的遺伝子群の機能スクリーニングを、ES 細胞の分化系とレンチウイルスベクターを用いた強制発現およびノックダウン実験によって行ったところ、神経幹細胞の時系列特異的な分化能変化に影響を与えていると思われる遺伝子を 3 個同定した。興味深いことに、これらはいずれもタンパク質をコードしない lncRNA であった。発生後期以降の神経幹細胞の特徴の 1 つは、グリアへの分化能が神経細胞への分化能に対して圧倒的に優位であることであるが、同定した lncRNA の 2 つはこの後期型神経幹細胞に特異的に高発現しており、そのうちの 1 つは Malat1 と名付けられており、癌細胞の運動性や転移に関与していることが示されている lncRNA であり、その遺伝子ノックダウンを行うと、ほとんどが神経細胞へ分化する

初期神経幹細胞様の表現型を示した(図 1)。また、他の2つの lncRNA は、その遺伝子ノックダウンを行った場合、ノックダウンした細胞の周囲の細胞のグリアへの分化を促進した(図 2)。

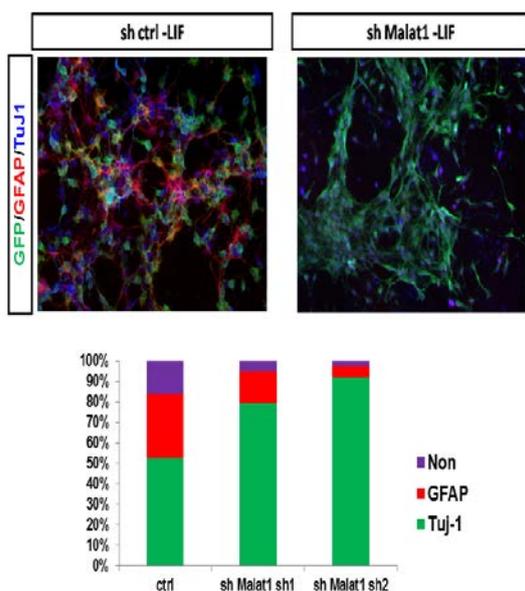


図 1. Malat1 遺伝子のノックダウンによる神経細胞への分化能の維持とグリア分化の阻害

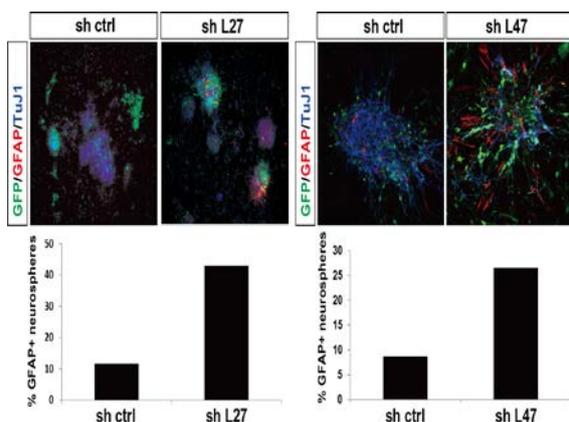


図 2. 細胞非自律的にグリア分化を制御する lncRNA

## 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)

①Sato, T., Shimazaki T, Naka, H., Fukami, S., Satoh, Y., Okano, H., Lax, I., Schlessinger, J., & Gotoh, N. FRS2α regulates Erk levels to control a self-renewal target Hes1 and proliferation of FGF-responsive neural stem/progenitor cells. Stem Cells. 28, 1661-73 (2010). 査読有

②Sakaguchi, M., Imaizumi, Y., Shingo, T., Tada, H., Hayama, K., Yamada, O., Morishita, T., Kadoya, T., Uchiyama, N., Shimazaki T, Kuno, A., Poirier, F., Hirabayashi, J., Sawamoto, K., & Okano, H. Regulation of adult neural progenitor cells by Galectin-1/beta1 Integrin interaction. J. Neurochem. 113, 1516-24 (2010). 査読有

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.okano-lab.com>

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