

## 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 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：32676  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22700345  
 研究課題名(和文) 器官培養を用いた神経幹細胞の形態学的プロファイリングによる遺伝子発現解析  
 研究課題名(英文) Gene Expression analysis of Neural stem cells by morphological profiling  
 研究代表者  
 落合 和 (OCHIAI WATARU)  
 星薬科大学・薬学部・講師  
 研究者番号：40381008

## 研究成果の概要(和文)：

神経幹細胞の器官培養系を用いて解析した結果、これまで申請者らが報告した神経幹細胞の形態をとるものに加えて新たに、3つの異なる形態をとる神経幹細胞を見出すことができた。しかしながら、これらの神経幹細胞は、非常に発生段階にある大脳における割合は低く、cDNA マイクロアレイなどを用いた遺伝子発現の網羅的な解析を行うには、サンプル数が十分ではなかった。

研究成果の概要(英文)： We newly found three types of neural stem cells with different morphological features in organ culture. However, rate of these types of neural stem cells were very low. To characterize of these types of neural stem cells by using cDNA microarray, there were too few sample.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：発生・発達・再生神経科学

## 1. 研究開始当初の背景

脳の構築は主にニューロンの産生やそれを補助するグリア細胞から構成されるが、発生段階ではこれらを生み出すために莫大な数の細胞が必要とされ、この細胞数を得るために神経幹細胞が盛んに分裂を繰り返し、脳を成長させていく。神経幹細胞の謎の解明は脳発生過程を研究するうえで非常に重要な研究テーマである。神経幹細胞は脳室帯と呼ばれる領域で自身の細胞質の突起を放射状

(上下2方向)に伸ばしたまま、細胞核のみを細胞周期依存的に移動させるエレベーター運動を起こす。神経幹細胞の核がG1期では徐々に脳室(アピカル)面から軟膜(ベーサル)面へと移動して行き、DNA合成期(S期)の状態にある時の神経幹細胞の核は軟膜面(ベーサル方向)にあるが、S期からG2期にかけてapical側へと移動していき、細胞分裂期(M期)には脳室面で分裂する。この分裂では主に神経幹細胞とニューロンを生み出す非対称分裂である。分裂が終わると再び

外側に移動して DNA を合成するという神経幹細胞や網膜幹細胞などがみせる非常に興味深い現象である。この前駆細胞が何のために細胞核を上下に移動させているのかは不明な点が多い。

近年、この非対称分裂様式をとる神経幹細胞とは異なり、脳室下帯（脳室面と軟膜面の中間）と呼ばれる場所で分裂しニューロンを2つを生み出す対称分裂する神経幹細胞（約20%）が大脳皮質上層へのニューロンの供給に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている(2)。この脳室下帯(SVZ)で、分裂する神経幹細胞が、転写因子の誘導 Pax6→Tbr2→Tbr1 という経路が報告されていたが、申請者は、この転写因子の誘導経路の間に、Ngn2という転写因子があり、Pax6→Ngn2→Tbr2→Tbr1 という順番に誘導が起こっていることを明らかにした。また、この神経幹細胞は、器官培養系を用いてライブ観察を行うと、よく知られている神経幹細胞とは形態学的に異なる。このように、神経幹細胞は均一の集団ではなく、いくつかのポピュレーションが多様性を与えているものと考えられる。

## 2. 研究の目的

申請者は、これまで器官培養系を用いた神経幹細胞研究から新たな形態的特徴を明らかにし、神経幹細胞の分裂のパターン解析を行ってきた。本研究は神経幹細胞の形態的な特徴を指標に神経幹細胞を分類し、遺伝子発現を解析するものである。まず、大きく次の4つの項目について解析を行った。

- ・神経幹細胞の形態学的特徴により4種類に分類する
  - ・神経幹細胞の形態学的特徴分類による網羅的な遺伝子解析
  - ・候補分子の遺伝子導入による神経幹細胞の形態学的変化
- 神経幹細胞の物理的な形態変化による遺伝子発現の可視化

神経幹細胞を蛍光物質で散発的にラベリングし、器官培養する。培養後、神経管細胞を経時的に観察し、形態学的特徴から4種類に分類する。3種類(a, b, c)に分類した神経幹細胞をそれぞれ、cDNA マイクロアレイにより、遺伝子発現の網羅的な解析を行う。マイクロアレイによって、各形態(図2 a,b,c)で特異的に発現して、発現量の高いものを選びだし、スクリーニング(PCR と in situ hybridization)を行い、ターゲット分子とする。ターゲット分子のクローニングを行い GFP と共発現するベクターに組み込む。その

発現ベクターによって、ターゲット分子の強制発現が神経幹細胞の形態を変化が起これるのかを神経幹細胞の器官培養系で観察する。さらに、ターゲット分子の機能を検証するためにターゲット分子の RNA 干渉(RNAi)ベクターを構築し、このターゲット分子欠損による形態変化がみられるのかを観察する。

申請者は、これまで器官培養を用いた研究から神経幹細胞の散発的なラベリングを可能にし、タイムラプス観察を行っている。この神経幹細胞の器官培養を行う十分な経験を有しており、最近では、右図のような神経幹細胞の2つの突起のうち的一方をガラスキャピラリーで切断し、その後も観察を行うことに成功している。脳組織という環境の中(器官培養)で動いている細胞に物理的な作用を加えて解析を行った例は申請者が以前の研究室で身につけた技術であり、非常に独創的である。

申請者は、これまで器官培養を用いた研究から神経幹細胞の形態学的特徴を明らかにし、神経幹細胞の分裂のパターン解析を行ってきた。一般に神経幹細胞は、両極性の突起を持った形態をとることが知られています。この1方向性の神経幹細胞の割合はそれぞれ約15%と2極性のものと比べると少数であるが、神経発生に過程における多様性を考慮すると、この形態学的特徴を持った神経幹細胞に何か別の役割があるのではないかと推察される。

## 3. 研究の方法

### (1) 器官培養を用いて、神経幹細胞の散発的な蛍光ラベリング

麻酔で眠らせた妊娠13日目(胎生12日目)マウスの子宮内の胎児脳室内へ、ガラスキャピラリーで蛍光タンパク質(細胞膜局在型 GFP)発現ベクターをエレクトロポレーションあるいは、ポリエチレンジオキサン試薬での遺伝子を導入し、神経幹細胞を局所的あるいは散発的にラベリングする。なお、マウスは、手術後、閉腹し翌日まで、蛍光タンパク質の発現を待つ。

### (2) 形態学的特徴によるサンプルの選別

大脳を取り出し、メスで摘出した脳組織をスライス状(約150µm)にして、コラーゲンゲル中で培養する(脳組織構造崩壊の回避)。培養組織が安定するまで、数時間(5~6)培養し、倒立蛍光顕微鏡で神経幹細胞の3つの形態のうちどれかを選別し、固定する。固定後、凍結包埋剤に埋め込み液体窒素で凍結させる(必要に応じて-80°Cで保存)。その後、凍結切片作製機で12µmの厚さの切片を作製する。得られた切片を蛍光タンパク質

(GFP)の抗体で、免疫化学染色を行う。

### (3) レーザーマイクロダイセクションによるサンプリング

レーザーマイクロダイセクション装置を用いて、神経幹細胞の形態学的特徴をもつ細胞をレーザーで切り取り、サンプルチューブに回収し、RNAを精製する。

得られたRNAサンプルをcDNAマイクロアレイとmiRNAアレイ解析を行う(委託)。アレイ解析によって得られたデータで、神経幹細胞の3つの形態で異なる分子で、残り2つの形態と違う分子で発現量の差が少なくとも2倍以上のものをリストアップする。

その後、リストアップした分子が神経幹細胞に発現しているかをRT-PCRにて確認する。

この結果から、リストアップした分子のプロンプを作製し、胎生13日目の大脳組織切片でのin situ hybridizationにより、神経幹細胞が局在する脳室周辺での発現がみとめられるものをターゲット分子とする。

### (4) cDNAマイクロアレイ解析および解析結果のスクリーニング

得られたRNAサンプルをcDNAマイクロアレイとmiRNAアレイ解析を行う(委託)。アレイ解析によって得られたデータで、神経幹細胞の3つの形態で異なる分子で、残り2つの形態と違う分子で発現量の差が少なくとも2倍以上のものをリストアップする。

その後、リストアップした分子が神経幹細胞に発現しているかをRT-PCRにて確認する。

この結果から、リストアップした分子のプロンプを作製し、胎生13日目の大脳組織切片でのin situ hybridizationにより、神経幹細胞が局在する脳室周辺での発現がみとめられるものをターゲット分子とする。

### (5) ターゲット分子のクローニングおよび発現実験 (in vitro, in vivo)

ターゲット分子のクローニングを行い、

(1)の方法で脳組織に遺伝子導入を行い、その遺伝子を強制的に発現された神経幹細胞がどのような形態をとるのかを器官培養系で観察する。さらに、ターゲット分子が導入された細胞が、生体内でどのような細胞(ニューロン、グリア)に運命付けられるのかを免疫化学染色で解析する。

マイクロアレイなどの解析を行う上で、問題となるのがノイズであることを考慮すると細胞1個からのRNA精製を行うのが理想であるが、凍結切片作製後は、12 $\mu$ mと細胞1個からロスなくRNAを採取することは、難しいことが予想される。そこで、同じ形態を示すサンプルをまとめてからRNA調製を行うことも考えている。これまでの、神経幹細胞の器

官培養の観察経験から4種類の形態学的特徴は、はっきりと分類することは可能であるが、客観的な判断が必要となる。そこで、申請者が報告した論文のNgn2とTbr2の時空間的な発現量(Ochiai W et al., 2009)やその他の論文報告(Kawaguchi A et al., 2008)による遺伝子発現を確認することで、形態学的特徴の遺伝子的裏付けを行う。さらに、この方法でも難しい場合は、二次元電気泳動法により、タンパク質を分離し、異なる形態の神経幹細胞で特異的に発現しているタンパク質を同定する。

## 4. 研究成果

### 2010年度

神経幹細胞が最も盛んに分裂をしている時期である妊娠12日目の神経幹細胞を蛍光タンパク質(GFPの発現ベクター)ラベリングし、妊娠13日目に胎児の大脳を器官培養し神経幹細胞の挙動を経時的に観察し数時間おきの解析を行った。研究計画の当初は、神経幹細胞の形態から3パターンに分類する予定であったが、研究を進めるうちに、新たに3つの形態学的特徴を示す神経幹細胞(合計6パターンの神経幹細胞の形態)を見出すことができた。そのうちの3パターンは非常に変わった形態学的特徴を示しており神経幹細胞のこれまでの特徴とは異なるものであった。これらの特殊形態をとる機能未知の神経幹細胞の凍結切片を作製し、神経幹細胞マーカーであるNestin, BrdU, Ngn2, Pax6などの解析を行った結果、このような既存の神経幹細胞の分子マーカーでは、これまでの神経幹細胞のマーカーでは一様に染色されてしまうことがわかった。しかしながら、このような特徴を示す全体の神経幹細胞の割合からするとかなり割合が少なく、解析するには相当数のサンプルを必要とする。そこで、現在、極めて少数のポピュレーションの神経幹細胞のサンプルを効率良く採取するために数種類のラベリング方法を行ったが、期待するほどの効率の良いラベリングは行えていない。しかしながら、このような形態学的特徴を持った神経幹細胞が存在することは、神経発生の複雑さを解析する上で、非常に意味深いものであると考えられる。

### 2011年度

神経幹細胞が最も盛んに分裂をしている時期である妊娠12日目の神経幹細胞を蛍光タンパク質(GFPの発現ベクター)ラベリングし、妊娠13日目に胎児の大脳を器官培養し神経幹細胞の挙動を経時的に観察し数時間おきに解析を行った。同時に、BrdUやその類縁化合物であるEdUを器官培養系に添加し、分裂細胞のマーキングを行った。また、レベ

ルした様々な形態をとっている神経幹細胞及びニューロンと考えられる器官培養物の切片を作製し、一般的な細胞周期マーカーKi-67、BrdU、EdU、geminine、Cdt1に対する抗体で染色することにより、神経幹細胞との関係を調べた。また、細胞周期蛍光プローブFucciの2種類を発生過程の神経幹細胞に導入することによって、神経幹細胞の細胞周期を可視化した。発生過程の脳サンプルから、RNA および組織切片を作製し、上記のマーカーで染色を行い細胞周期と神経幹細胞との関連性を解析した。また、RT-PCRにより、発生段階にある脳の様々な遺伝子発現を解析した。

近年、大脳皮質の発生は血管にそってニューロンへと分化し配置されることから、血管内皮細胞のマーカーPECAM-1あるいはアストロサイトマーカーGFAPと染色を行った。その結果、血管内皮細胞と細胞周期との直接的な関連性を見出せなかった。

神経幹細胞は分散培養を用いた系では、本来持っている性質である細胞周期依存的な細胞核の運動であるエレベーター運動と呼ばれる動きをとることはない。しかしながら、器官培養系を用いた3次元培養では、分裂や分化に際して、生体内にほぼ近い挙動を示す。これまでの研究で幾つかの形態学的特徴を示す神経幹細胞と細胞周期あるいは遺伝子発現との関連性を解析した。このことは様々な形態をとる神経幹細胞の性質の一端を知ることができたものと考えられる。

## 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)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

落合 和 (OCHIAI WATARU)

星薬科大学・薬学・講師

研究者番号：40381008