

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 8日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700385

研究課題名（和文） 成体の神経幹細胞からの神経新生を助ける栄養因子と神経疾患との
関わり研究課題名（英文） Relation between paracrine factors promoting adult neurogenesis and
neurological diseases

研究代表者

桑原 知子（KUWABARA TOMOKO）

独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・研究員

研究者番号：90358391

研究成果の概要（和文）：老化や疾病により脳内で新しい神経が作られにくくなる原因の因子を発見した。さらに、疾病や老化などで低下した脳内の「新しく神経を作る力」が、運動等によって再び活性化するメカニズムについても検証を行い、論文やプレスリリースなどで成果を発表した。体内に存在する幹細胞を制御する新たな標的因子を用いた疾病予防や、今後の創薬・医療開発に向けて期待できる。

研究成果の概要（英文）：We discovered a factor that causes the impairment of neurogenesis in the aged brain and in the brain under the neurological diseases. A mechanism has been identified by which stimuli including exercise re-activate the ability to generate newborn neurons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：ライフサイエンス（共通基礎研究）

科研費の分科・細目：脳神経、神経科学

キーワード：幹細胞、神経新生

1. 研究開始当初の背景

成体の神経幹細胞は、自分自身を複製する能力と、神経細胞、アストロサイト細胞、オリゴデンドロサイト細胞の3種類の細胞に分化できる「多能性」を持っている。神経細胞にとって、アストロサイト細胞やオリゴデンドロサイト細胞などのグリア細胞は、神経細胞を支える足場でもある。足場となる良い土がないと植物が育たないように、土は「アストロサイト細胞」、種は「神経幹細胞」、枝葉を伸ばす植物は「神経細胞」に例えることができる。「土」が「種」に与える栄養が『Wnt3a』

という名のWntシグナル系タンパク質であることは分かっていたが、その先どうやって種から芽を出すか（神経新生）という詳しい仕組みが分かっていなかった。そこで、成体の海馬の神経幹細胞で、『Wnt3a』因子の働きを特異的に絶つと、どうなるかについて、遺伝子改変マウスやラットの実験動物、神経幹細胞の培養系で解析した（我々の先行研究）。その結果、Wnt3aシグナルを阻害しても、神経幹細胞自体の自己複製やアストロサイト細胞などのグリア細胞への分化には影響を与えず、神経細胞への分化経路のみ、90%以

上の抑制を受けることが判明した。この現象の主な原因は、未分化維持遺伝子 Sox2 により抑制されている成体神経幹細胞が NeuroD を発現すべき初期前駆細胞に変化する直前に、NeuroD 遺伝子を発現できなくすることによって、アポトーシスにより死滅することによるものである。

Wnt3a シグナルからの活性化の道筋は NeuroD 遺伝子だけではなく、ゲノムの大半を占める非翻訳領域にも伝わることを発見した。タンパク質になるコーディング遺伝子は、ゲノム上に 2% 以下しかない。哺乳動物の遺伝子の総数は大腸菌や酵母と比べて数倍だが、反面、ゲノムのサイズは約 200 倍もの大きなものである。我々のゲノムの 98% 以上が非翻訳領域であり、進化の過程で哺乳類になって爆発的にゲノムに含まれる割合を増やしたものが「レトロトランスポゾン(L1)」という動く遺伝子である。Wnt3a シグナルが活性化されると、NeuroD 遺伝子だけではなく、ゲノムの大半を占める非翻訳領域にあるレトロトランスポゾンも活性化することが確かめられた。

このことは、L1 配列 (断片) の近くにある遺伝子も、その影響を間接的に受けて発現量が上昇する可能性を示唆している。つまり、ある 1 つのシグナルから、神経新生を誘導する機能を持つコーディング遺伝子 NeuroD1 が発現されるだけではなく、ゲノムの大半に渡って活性化される領域が増幅する仕組みである。バイオインフォマティクス解析で、マウス、ラット、ヒトのゲノム上でレトロトランスポゾン(L1)近傍にあり、Wnt3a からのシグナルが間接的に伝達される遺伝子を探索した。すると興味深いことに、これまでに神経新生のマーカーとなっていた遺伝子や、鬱病など神経疾患に関連する遺伝子などが明らかになった。

そこで本研究では、これらの知見をベースとし、老化や鬱病下で密接な影響を受ける候補遺伝子群の制御機構について、その関連性との解明を目指した基礎的な研究を行うこととした。多くの現代人を悩ませる、神経疾患・精神疾患の効果的な創薬・医療の開発には、「老化で神経疾患のリスクが増大する環境」と「脳の幹細胞機能」を結びつける分子メカニズムの解明が必要とされているからである。

2. 研究の目的

発生と器官形成、幹細胞からの分化制御機構のこれまでの研究は、胎生期の動物組織や樹立細胞を用いて主に行われてきている。胎生期の神経新生では、アストロサイト細胞よりも先に神経細胞のみが初期段階に発生する。「胎生期」では的確に臓器を形成していく必

要性があるため、分化制御に関わる遺伝子発現機構は、栄養因子からのシグナル伝達機構の制御のみではなく、下流の標的遺伝子のゲノム上でエピジェネティック (DNA のメチル化、ヒストンコード修飾) に厳密に制御・抑制されている。つまり Wnt3a を産出する『土』が無い状態でも、「芽を伸ばしなさい」という指令が、『種』に元から内在されており、成体期の神経新生とは異なる強いメカニズムが元来より支配しているといえる。

そこで、本研究では脳内の神経幹細胞の分化制御機構だけでなく、幹細胞を取り巻く細胞群が支えている機能や役割を解析し、新たな治療法やより有効な創薬の標的となる因子やメカニズムを見つけ出すことを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

成体の脳海馬から抽出された神経幹細胞を用い、神経特異的遺伝子や神経疾患・老化の原因となる遺伝子群の発現調節機構の解明を行った。上述した研究背景を踏まえ、ゲノム上の (cDNA) コーディング領域とノンコーディング領域双方を標的としてパラレルに研究解析を進めた。バイオインフォマティクス解析で、ゲノム上でレトロトランスポゾン(L1)近傍にあり、Wnt3a からのシグナルが間接的に伝達される、神経疾患に関連する遺伝子候補について解析した。また、コーディング領域およびノンコーディング領域からの発現を指標とするレポーターを組み込んだモデル神経幹細胞を樹立し、老化や鬱病状態 (ストレス過剰負荷状態) でそれらの遺伝子がどのような影響を受けるか、発現プロファイルをまとめた。さらに、成体の神経幹細胞を、老齢 vs 若齢下で樹立・培養し、詳細にその機能解析を行った。

成体神経新生と高齢化での神経新生の減衰、疾患発症の病原遺伝子群の発現の増加につながるゲノム制御機構の関連性を、*in vitro* および *in vivo* 双方で検証し、運動などによる機能改善の効果と中心となる分子や細胞腫の同定、細胞間ネットワークによる神経新生全体の制御機構への影響についても検証した。

4. 研究成果

これまで、老化や疾患によって脳内で新しい神経が作られなくなってくるのは、元となる「神経幹細胞」の数が減ってしまうことが第一の原因と考えられていた。我々の研究から「神経幹細胞」ではなく幹細胞のニッチであるアストロサイト細胞に神経新生を大きく左右する因子があり、それが成体の神経幹細胞の若返りにもつながる役割を持っていることを明らかにした。

成体脳内での神経幹細胞からの神経新生

は、個体の状態を反映する、ある意味、流動的な機構が備わっているのではないかと考えていた研究仮説を裏付ける、一つの学術的知見が得られたと言える。

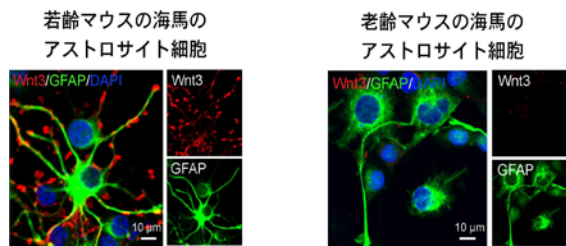


図1 若齢マウスの海馬より抽出し、培養したアストロサイト細胞 (左)。老齢マウスの海馬より抽出・培養したアストロサイト細胞 (右)。

さらに、神経新生の衰えた老齢マウス群に、ストレスを感じさせない程度の運動(ランニング)を短期間行わせると、海馬アストロサイト細胞の Wnt3 産生能が大幅に増加することも確認した。この分泌された Wnt3 の増加に伴って、それを受け取る神経幹細胞内の神経分化に必要な遺伝子が活性化され、神経新生機能が増すこと、すなわち海馬で新しく産み出される神経細胞の数が増加することが判明した。

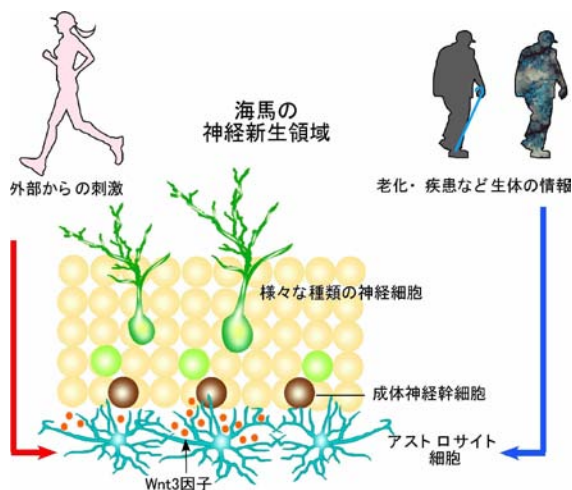


図2 個体の情報を神経幹細胞へ伝える因子 (Wnt3; オレンジ)。神経幹細胞内の遺伝子発現や、神経細胞の多様性を産み出す分子メカニズム自体は変わらないが、アストロサイト細胞の Wnt3 産生能は個体の状態に大きく依存する。

海馬で新しく神経細胞が作られる過程には、

「神経細胞の多様性(特異性の獲得)」を引き起こすメカニズムが備わっている。海馬の多様な神経細胞では、同じ神経特異的遺伝子でも、それぞれ微妙に異なった発現プロファイルを持っている。海馬の細胞内で発現する各遺伝子の量を調節する「クロマチン制御」には、他の細胞と違うユニークな特徴がある。それは「背景」で記述した先行研究から分かってきた、ゲノムのノンコーディング領域に含まれるレトロトランスポゾンが、様々な遺伝子の近くで活性化されることでクロマチン制御に違いが生じ、これによって神経細胞の多様性が産まれる、ということである。この様々な遺伝子の発現を調節している仕組みが、「運動(ランニング)」といった個体への刺激によって、どのように変化するのも本研究で調べた。すると、新しく産まれた神経細胞内のレトロトランスポゾンのクロマチン制御の状態が、アストロサイト細胞が産生する Wnt3 の量に、敏感に依存していることが確認できた。

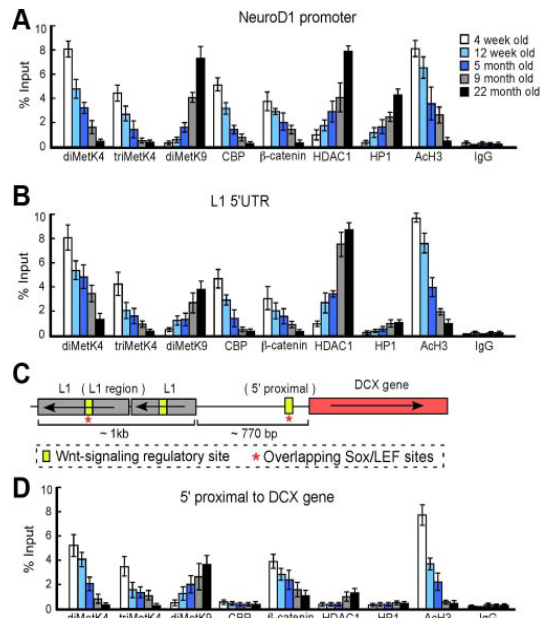


図3 (A) NeuroD1 プロモーター領域の老齢化によるエピジェネティック制御の変化。(B) レトロトランスポゾンの 5' UTR 内在プロモーター領域の老齢化によるエピジェネティック制御の変化。(C) バイオインフォマティクス解析で、ゲノム上でレトロトランスポゾン(L1) 近傍にあり、Wnt3a からのシグナルが間接的に伝達される、神経疾患に関連する遺伝子 Dcx の構造と、(D) その老齢化によるエピジェネティック制御の変化。

これまで、老化や疾患によって脳内で新しい神経が作られなくなってくるのは、元となる「神経幹細胞」の数が減ってしまうことが

第一の原因と考えられていた。本研究課題の研究により、「神経幹細胞」ではなくアストロサイト細胞に神経新生を大きく左右する因子があり、それが「神経幹細胞」の若返りにもつながる役割を持っていることを明らかにした。脳内の神経新生を上昇させる外的刺激(運動など)と、減少させる状況(老化、疾患)との双方の変化に即して、広範なゲノム応答をオン/オフする分子機構が見つかったことは、今後の神経・精神疾患の創薬・医療への新たなアプローチの基盤となる知見が確かめられたと考えられる。

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)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Kuwabara T and Asashima M, Regenerative medicine using adult neural stem cells: Potentials for diabetes therapy and other pharmaceutical applications. *J. Mol. Cell Biol.*, 4, 査読有, 2012, 133-139. DOI: 10.1093/jmcb/mjs016
- ② Kuwabara T and Asashima M. Olfactory bulb-derived neural stem cells of diabetes therapy. *Aroma Research*, 査読有, 13, 2012, 31-35. <http://www.fujisan.co.jp/product/1281680951/b/756256/>
- ③ Kuwabara T and Asashima M. Prospects for regeneration therapy with stem cells. *Inflammation and Regeneration*, 査読無, 32, 2012, 438-445. <http://jsir.gr.jp/journal/Vol32No1/contents.html>
- ④ Antoszczuk S, Terashima K, Warashina M, Asashima M, Kuwabara T, Active expression of retroelements in neurons differentiated from adult hippocampal neural stem cells. *Neural Stem Cells and Therapy*, 査読有, 11, 2012, 223-238. DOI: 10.5772/1250
- ⑤ Kuwabara T, Kagalwala MN, Onuma Y, Ito Y, Warashina M, Terashima K, Sanosaka T, Nakashima K, Gage FH, Asashima M. Insulin biosynthesis in neuronal progenitors derived from adult hippocampus and the olfactory bulb. *EMBO Mol. Med.*, 査読有, 3, 2011, 742-754. DOI: 10.1002/emmm.201100177
- ⑥ Okamoto M., Inoue K, Iwamura H, Terashima K, Soya H*, Asashima M and Kuwabara T. Reduction in paracrine

Wnt3 factors during aging causes impaired adult neurogenesis. *FASEB J.*, 査読有, 25, 2011, 3570-3582. DOI:10.1096/fj.11-184697

[学会発表] (計5件)

- ① Kuwabara T. Environmental activation of retroelements during adult neurogenesis, *Environment and Epigenetics*, The 8th Okazaki Biology Conference (OBC8; 依頼講演, 2012年3月25日, National Institute for Basic Biology, NIBB (愛知県).
- ② Kuwabara T. 海馬の神経新生とレトロトランスポゾン -環境への依存性と疾患との関わり-, 第84回日本生化学会大会(招待講演), 2011年9月23日, 国立京都国際会館(京都府)
- ③ Kuwabara T. Extrinsic Cues and Intracellular Epigenetic Regulations that Control Adult Neurogenesis. 日本神経科学会(招待講演), 2011年9月4日, パシフィコ横浜(神奈川県)
- ④ Kuwabara T. 自家幹細胞を用いた糖尿病の再生医療技術の開発, LS-BT 合同研究発表会(依頼講演), 2011年1月31日, 産業技術総合研究所(茨城県)
- ⑤ Kuwabara T. 環境がレトロエレメントを介した成体の神経新生に与える影響, 日本遺伝学会(依頼講演), 2010年9月20日, 北海道大学(札幌)

[その他]

ホームページ等

- ① A Regenerative Therapy Method for Diabetes Using Adult Neural Stem Cells - Towards regenerative medicine transplanting patient's own stem cells to diseased parts - http://www.aist.go.jp/aist_e/latest_research/2011/20111215/20111215.html
- ② 桑原 知子、浅島 誠 「成体の神経幹細胞を用いた、糖尿病の再生医療技術の開発」, 2011.10.08. http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2011/pr20111007/pr20111007.html
- ③ A Factor Regulating the Aging and Rejuvenation of the Brain - Discovery of an environmental factor for the activation of aged neural stem cells - http://www.aist.go.jp/aist_e/latest_research/2011/20110915/20110915.html
- ④ 桑原 知子、浅島 誠 「脳の「老化」と

「若返り」を調節する因子- 老化した神経幹細胞を活性化する環境因子の発見-」

2011.8.8. http://www.aist.go.jp/aist_j/new_research/nr20110808/nr20110808.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 知子 (KUWABARA TOMOKO)

独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・研究員

研究者番号：90358391