

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 5 月 20 日現在

機関番号：32663

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780085

研究課題名（和文）神経幹細胞/前駆細胞におけるメカニカルストレス応答とその制御

研究課題名（英文）Effects of mechanical stresses on neural stem/progenitor cells

研究代表者

根建 拓（NEDACHI TAKU）

東洋大学・生命科学部・准教授

研究者番号：50375200

研究成果の概要（和文）：

神経幹/前駆細胞（NPCs）へのストレス刺激は、様々な病態と関連することが指摘されているが、未だその詳細な機構について全容解明に至っていない。そこで本研究では、NPCs がストレス（特に物理的ストレス）に曝露された時の細胞応答と、その分子メカニズムの解明を目的として研究を行った。その過程で、神経保護因子プログランニューリンを中心としたストレス応答の重要性を明らかにし、原著論文ならびに国際学会において報告した。さらに、NPCs への微弱な物理的ストレス付与が NPCs の分化に影響を与えることを初めて見出すことができ、現在そのメカニズム解明を鋭意進めている。

研究成果の概要（英文）：

Accumulated evidence suggests that the stress, including physical stress influence on neural progenitor cell fates, which resulted in various neuronal disorders. The aim of present study is to understand the underlying mechanisms how those stress, especially physical stresses, regulate NPC functions. Initially, because we found that the expression of progranulin (PGRN) is induced in response to those stresses, we analyzed and reported the effects of PGRN on NPC functions. We also found that nano materials induced physical stress on NPCs and controlled cellular functions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：応用生物化学、動物細胞工学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：神経幹/前駆細胞、ストレス応答、増殖因子

1. 研究開始当初の背景

近年、力学的（メカニカル）刺激をはじめとする物理的刺激に対する生体応答、細胞応答が注目を集めている。物理的刺激は、例え

ば、骨格筋や心筋の収縮伸展、創傷治癒、血流量変化、骨代謝、腫瘍形成や転移などの生理・病理現象において発生しており（Cell Signal 19: 881-, 2007, Sci STKE 2004: RE12,

2004, *Endocr J* 49: 1-, 2002 他)、このように発生した物理的ストレスは、各々の臓器・組織構成細胞にストレスとして感知され、細胞の移動、形態変化、増殖、分化、死など様々な生理応答を制御することがわかってきた (*Curr Opin Cell Biol* 10: 232-, 1998他)。一方、例に挙げた生理・病理現象以外にも物理的ストレスが発生する例は多数あると考えられるが、物理的ストレス研究自体が比較的新しいこともあり、他の細胞・組織・臓器における物理的ストレスについては未だ不明な点が多く残っている。

特に脳神経系では、成長時・神経再生時における神経細胞移動・神経突起伸長に伴う生理的なものから、脳外傷、脳腫瘍、頭蓋内血流量・脳脊髄液の増加などの病的なものまで様々な要因によって物理的ストレスが生じており、正常な動物の成長・発達や脳神経系疾患などに重要な役割を担っていると考えられる。一方、そのような脳神経系構成細胞の物理的ストレス応答はこれまでほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

神経幹／前駆細胞 (neural progenitor cells; NPCs) は、自己複製能を持つだけでなくニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトなど脳神経系を構成する多種多様な細胞の前駆細胞となり、神経新生に重要な役割を果たしている。一方、NPC への酸化ストレス負荷は、c-Jun terminus kinase (JNK) の持続的活性化を介した細胞死などの細胞応答を示し、*in vivo* でも様々な脳機能障害と深く関連することが示されている。本研究計画では、この NPC に注目し、NPC におけるストレス応答を深く理解し、さらに物理的ストレス制御因子の探索ならびにその作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

野生型マウス胎児間脳あるいは海馬領域より、神経幹／前駆細胞 (NPCs) を単離し、Neurosphere として培養を行った (継代数 2-3 を使用)。その後、様々なストレス刺激を与えた後に、以下の細胞応答を計測した。

(1) 細胞増殖能

ストレス処理後 24-72 時間の細胞増殖は、細胞数の直接計数あるいは BrdU 取り込みにより測定した。

(2) 細胞分化能

細胞分化誘導のために、浮遊培養から接着培養法に切り換え 3-5 日間培養後、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの分化割合を免疫染色法によって測定した。未分化細胞の割合は、Nestin 発現量を指標として解析した。また、ニューロンの細胞突起伸長については、伸長距離のみならず、枝分かれ頻度などについても詳細に検討した。

(3) 細胞死

細胞死については、ストレス処理後 24 時間後、ラクトースデヒドロゲナーゼ (LDH) の培養液中への放出量を指標に測定、また、細胞死の中で特にアポトーシスについては TUNEL 法を用いた検討を行った。

(4) 分泌タンパク質測定

ストレス処理 24 時間後に分泌タンパク質の発現量をリアルタイム PCR 法で、また分泌量を ELISA 法で測定した。

4. 研究成果

(1) 各種実験方法の確立

神経幹／前駆細胞 (NPCs) のみならず、培養細胞を用いたストレス研究の鍵となるのは、適切な培養条件やストレス負荷条件を設定し、いかに動物個体の生理学と対応させた形で研究系を組めるかにある。報告者は、平成 22 年度より現所属先への転任が決定

したことに伴い、物理ストレスを測定するための諸条件の検討を行った。野生型胎児脳海馬より神経幹/前駆細胞 (NPCs) の単離・培養方法を確立、その後、研究実施計画に基づき、実験系の確立を行った。

(2) ストレスに応答して発現上昇する PGRN に関する研究

これらの研究系構築のためにメカニカルストレスの代替刺激として、汎用されている酸化ストレスを付与していたが、その中で酸化ストレス依存的に成長因子プログラニューリン (PGRN) の発現・分泌が上昇することが見出された。

PGRN は神経保護作用を持つ成長因子で、近年、認知症のひとつである前頭側頭葉神経変性症との関連が指摘されてきている。そこで、ストレスに応答して発現上昇する PGRN の生理作用についてさらに詳細な解析を行うこととした。野生型マウス由来神経前駆細胞 (WT-NPCs) における PGRN の分泌について検討したところ、培養液中に高濃度の PGRN が検出された。次に、WT-NPC およびノックアウトマウス由来神経前駆細胞 (KO-NPCs) の増殖に対する PGRN 添加の効果を調べた結果、KO-NPCs でのみ細胞増殖が促進された。WT-NPCs では内因性の PGRN により、PGRN 添加の効果が観察されなかったものと考えられた。

PGRN の細胞増殖促進機序を調べるために、幾つかのシグナル分子のリン酸化を解析した結果、PGRN に応答した GSK3 β のリン酸化 (不活性化) が観察された。さらに、GSK3 β 阻害剤も神経前駆細胞の増殖を促進することが明らかとなった。一方、PGRN は神経前駆細胞から神経細胞/グリア細胞への分化や細胞死に対しては影響を与えなかった。まとめると、PGRN は GSK3 β の不活性化を介して

神経前駆細胞の増殖を促進するという生理活性を持つことが示唆され、発生段階や成長後の神経新生に重要な役割を果たしていると考えられた。以上の結果は、国際学会 (米国神経科学会) で報告すると同時に、3 報の学術論文として発表した (研究成果参照)。

本研究は現在も継続しており、ストレス以外の刺激 (ex. 細胞外栄養、脂溶性ホルモン、分化刺激など) によって PGRN 発現パターンがどのように変化するか、またその発現制御メカニズムにはどのようなものがあるかについても解析を行っている。特に最近、性ステロイドやレチノイン酸での発現上昇、また糖質コルチコイドでの発現低下を観察しており、ストレス依存的な PGRN 発現制御とのクロストークなどについても解明を進めていく予定である。

(3) 物理的ストレス付与による NPCs の運命制御

同時に、研究計画に従って、NPCs に物理的ストレスを付与し、細胞応答を観察した。当初予定としては、伸展ストレスを与える研究系での解析を行う予定であったが、細胞接着性の問題、装置部の温度上昇などの問題が解決されず、本方法での研究継続には時間がかかると判断された (現在も装置改良を進めている)。そこで、並行してカーボンナノチューブ (CNT) をはじめとするナノ素材添加による物理的ストレスを NPCs に付与し、生理作用を明らかにするための研究を行った。その結果、低濃度の CNT 刺激によって、NPCs からのアストロサイト分化誘導が増強されること、またニューロンの突起伸長が促進されるなどの予備的な知見を得た。これらの効果は、一般的に細胞毒性が生じるとされている高濃度 CNT によっては観察されなかったことから、低濃度特異的な現象と考えられた。従っ

て、神経幹／前駆細胞 (NPCs)における微弱な物理的ストレス付与は少なくとも NPCs の分化過程に正の影響を与える可能性が示された。以上の結果も平成 24 年度中に国内学会あるいは国際学会で発表予定である。

(4)総括

以上の研究成果をまとめると、物理的ストレスは、一般的な酸化ストレスと同様に NPCs の運命制御に重要な役割を果たしている可能性が強く示唆された。さらに、このストレス依存的な生理変化は、そのストレス刺激の強度に極度に依存することがわかった。すなわち、細胞死などを誘導するようなストレスであっても、微弱であれば細胞生存に正の役割を果たす場合もある。このような二相性は、酸化ストレスをはじめとする様々な刺激でも見出されることが示されてきており、細胞が保持している「ストレスに対するユビキタスな防御反応」であることが強く示唆される。今後、動物個体に対するナノ素材などを用いた適度な物理的ストレス付与が、NPCs をはじめとする脳神経系構成細胞に正の影響を与えうるか確認を進めていく予定である。

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 Nedachi T, Matsuwaki T, Nishihara M, Involvement of progranulin in modulating behavior and neurodegeneration. *Cognition and Dementia* 10(2): 44-50, 2011 (査読有)
- ② Nedachi T, Kawai T, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M, Progranulin enhances neural

progenitor cell proliferation through glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation. *Neuroscience* 185: 106-115, 2010 (査読有)

- ③ 根建 拓、松脇貴志、朝倉 麗、西原真杉「特集：認知症の発症にかかわる遺伝子 プログラニューリン」*老年医学雑誌* 21(5), 555-560, 2010 (査読無)

[学会発表] (計 1 件)

- ① Nedachi T, Kawai T, Kojima H, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M, Roles of Progranulin in Differentiated and Undifferentiated Neural Cells. *Society for Neuroscience*, 2011/11/12-16 (Washington DC, USA)

[その他]

ホームページ等

http://ris.toyo.ac.jp/details/index.php?user_id=1580

6. 研究組織

(1)研究代表者

根建 拓 (NEDACHI TAKU)

東洋大学・生命科学部・准教授

研究者番号：50375200

(2)研究分担者 (0)

(3)連携研究者 (0)