

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290029

研究課題名(和文) 糖尿病による神経幹細胞の機能低下メカニズムの解明

研究課題名(英文) Functional analysis of impairment of neural stem cells under diabetes

研究代表者

桑原 知子 (Kuwabara, Tomoko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門 ステムセルバイオテクノロジーグループ・主任研究員

研究者番号：90358391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病下では膵臓の内分泌細胞の細胞のみならず、脳内神経細胞の変性・細胞死による機能低下が起きるが、この際、未分化幹細胞からの神経新生も著しく減退する。本研究では、糖尿病ラットの病態進行に合わせ、誘導後初期から後期の各時点において海馬および嗅球の成体神経幹細胞を樹立した。樹立した成体神経幹細胞培養系で、神経新生を調節する各ファクターについて機能解析を行った。インスリン産生への促進/抑制効果を担う細胞外シグナル分泌活性を解析し、海馬の認知・学習機能についても行動解析(ソーシャルレコグニション、新奇物体認知試験(OLT、ORT))により評価し、個体の認知機能と分子機序との関連性について解析した。

研究成果の概要(英文)：Neurons have the intrinsic capacity to produce insulin, similar to pancreatic cells. Adult neurogenesis in the hippocampus (HPC) is significantly decreased in diabetic patients. As a result, learning and memory functions decrease. In the study, we compared the effect of diabetes on neurogenesis and insulin expression in adult NSCs. Adult NSCs were derived from the HPC or OB of STZ-induced diabetic rats. Diabetes progression influenced important genes that were required for insulin expression. By using identified diabetes-response genes, OB NSCs from diabetes patients can be used to monitor processes during diabetes progression that cause neurodegeneration in the CNS. Since HPC NSCs and OB NSCs exhibited similar gene expression profiles during diabetes progression, OB NSCs, which are more easily collected and established than HPC NSCs, may potentially be used for screening of effective drugs for neurodegenerative disorders that cause malignant damage to CNS functions.

研究分野：神経科学

キーワード：幹細胞 神経 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

インスリンは細胞が糖や脂肪をエネルギー源として蓄えるのを助けるホルモンで、この産生・分泌に障害が生じると循環器や心臓にさまざまな問題が生じる。重要なこととしてインスリンは脳機能の維持にも不可欠であり、実際に糖尿病患者は、アルツハイマー病やうつ病、ハンチントン病などの神経変性疾患・精神疾患においてその罹患リスクが増大するだけでなく、海馬領域の神経機能に多大な影響を及ぼすことが実験上明らかにされている。

インスリン因子は体内のほとんどの構成細胞、特に「幹細胞」からの分化制御段階にも非常に深く関わっている。脳中枢神経系でのインスリン制御では、インスリンは成熟神経細胞の毒性に対する耐性を向上させ、神経細胞によるネットワーク機能を高活性に保つ。またインスリン因子は、神経細胞を守るオリゴデンドロサイト細胞への未分化神経幹細胞からの分化誘導を新たに促進する“幹細胞の運命決定”に関する制御も行う。さらに、神経幹細胞の未分化状態の維持にとって重要な役割を担う FGF2 因子の機能をインスリンが促進し、幹細胞の増殖を高活性化させる“幹細胞の自己複製”段階にも深く関わる。インスリンが枯渇した状態下では、“未分化幹細胞の増殖・維持”機能は、系統間でも一貫して抑制される。その一方で、インスリンによるシグナル活性化機構は、幹細胞からの分化誘導段階で“分化経路調節”にも深く関わっていることが、我々の研究報告を含めた近年の報告から明らかになっていた。一方、糖尿病の病態が進行していく状態で幹細胞の機能がどのように低下するのか、その根本的な分子機序は明らかになっていない。そこで本研究において、幹細胞制御を行っている分子メカニズムのどこで、何が、どのように破綻を招き変容するかを解析した。糖尿病下での神経幹細胞機能低下を克服に結びつける医療・創薬開発の糸口となることが考えられたからである。

2. 研究の目的

成体の脳内では、限られた領域に存在する神経幹細胞から、恒常的な「神経新生」が生涯に渡って持続する。糖尿病下では膵臓の内分泌細胞の細胞のみならず、脳内神経細胞の変性・細胞死による機能低下が起きるが、この際、未分化幹細胞からの神経新生も著しく減退する。しかしその分子機序については未解明な部分が非常に多い。我々はこれまで、膵臓内分泌系と脳神経系間で保持された共通する分子機構について解析を進めてきた。そして、糖尿病下で「機能が減衰した幹細胞」を再び活性化することで、膵臓及び脳神経系の機能改善に結びつけられないか、と考えた。本研究では“脳神経系の機能解析”に焦点を絞り、糖尿病

による神経疾患の改善に結びつく医療・創薬の基盤となる、病態下の神経幹細胞制御の分子機構を解明することを目的とし、諸解析を進めた。

3. 研究の方法

糖尿病ラットの病態進行に合わせ、誘導後数日の初期、中期 後期の各時点において海馬および嗅球の成体神経幹細胞を樹立した (Figure 1)

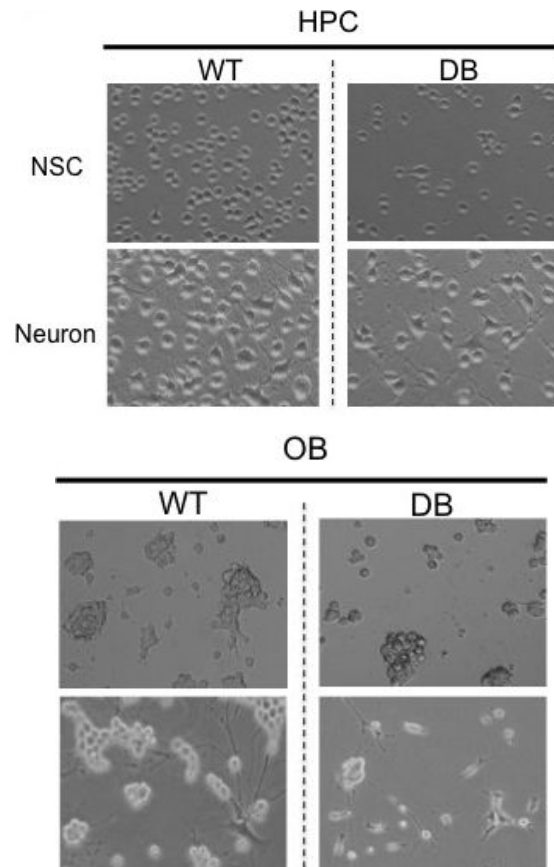


Figure 1. 海馬および嗅球から樹立した成体神経幹細胞培養 (WT:野生型動物由来、DB: 糖尿病動物由来)

樹立した *in vitro* 幹細胞培養系で、Wnt3/Wnt3a、Fzd/LRP Sox/LEF、IGFBP4・IGF-1/IGF-2 の各ファクターについて詳細な機能解析を行い、分子機序と各因子の相関の階層性を調べることにした。糖尿病の中枢神経系において病態の進行に影響を与える候補因子について、*in vitro*, *in vivo* での機能解析を行った。それぞれの因子の過剰発現系、ノックダウン系を行使し、遺伝子機能の神経文化制御系および糖尿病の病態 (インスリン制御) に与える効果について解析した。インスリン制御を調節する候補因子に対して、発現量変化の計測、機能面での分子機構解析、神経細胞および脳神経新生領域での免疫染色解析など諸解析を進めた。

4. 研究成果

糖尿病ラットの病態進行に合わせ、病態進行初期、中期、後期の各時点において樹立した海馬および嗅球の成体神経幹細胞を用いて、神経新生を調節する各ファクターについて定量遺伝子発現解析を行った (Figure 2)。

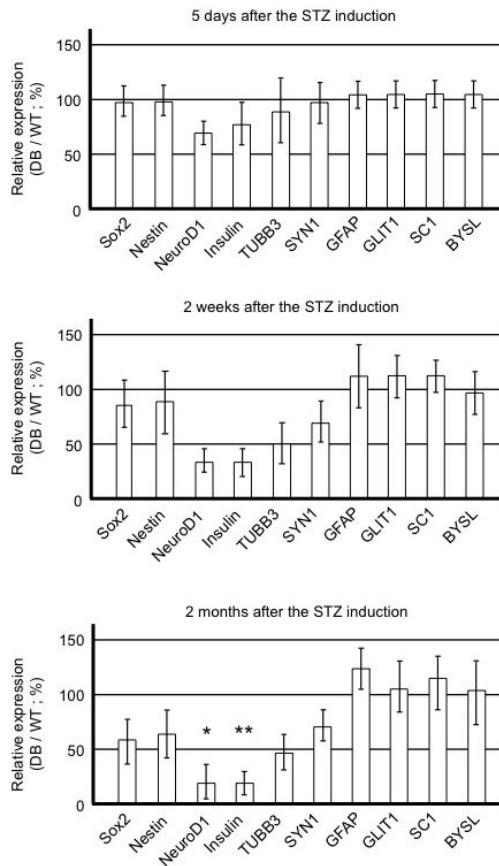
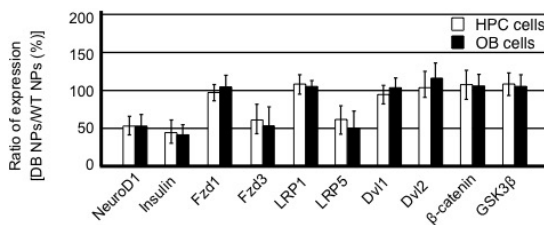


Figure 2. 糖尿病進行時の神経新生関連遺伝子の発現量変化

神経幹細胞は Wnt シグナルによって神経新生が活性化されるが、糖尿病進行初期においては、Wnt シグナルのレセプターやシグナルトランスダクション関連遺伝子の発現量に大きな変化は、海馬由来(HPC cells)



ノ嗅球由来(OB cells)の成体神経幹細胞培養において観察されなかった (Figure 3)。

Figure. 3 Wnt シグナル受容体などの変化

一方、諸解析過程で HPC および OB 双方で顕著に発現量が増加もしくは減少するマーカー遺伝子として機能する遺伝子について同定することに成功した (Figure 4)。

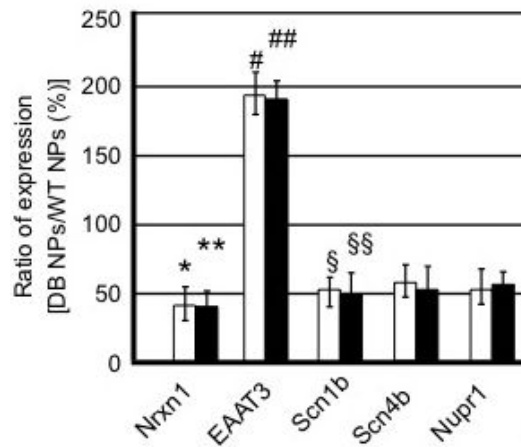


Figure 4. 糖尿病進行期の疾患モニタリング遺伝子となりうる候補遺伝子の発現変化

これらの遺伝子は、糖尿病進行期に侵襲の困難な海馬の神経細胞での病態関連遺伝子を、比較的侵襲の容易な嗅球由来の神経幹細胞をもちいてその遺伝子発現変化を指標に病態や機能の変化についてモニタリングすることに利用できる可能性が高い遺伝子マーカーである。本研究では、糖尿病患者の脳内の神経系の働き、特に新しく神経を作り出す神経幹細胞の機能をモニタリングするために、動物実験を用いて、疾患動物の脳海馬由来と、幹細胞が取り出しやすい嗅球由来の神経幹細胞を平行に樹立培養した。疾患で発現に影響の出る遺伝子群は、嗅球由来の神経幹細胞でも同様に差異が生じることを確認した。我々は以前に、嗅球由来の神経幹細胞を糖尿病の移植治療に用いる有効性を発表していたが、今回新たに、機能の衰えた神経系の幹細胞評価を行う上で、類似性が顕著にでる嗅球由来の幹細胞を用いた精神疾患のモニタリングの有効性についても確認できた。

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 9 件)

- 1, Wakabayashi T, Hidaka R, Fujimaki S, Asashima M, Kuwabara T. Diabetes Impairs Wnt3-Induced Neurogenesis in Olfactory Bulbs via glutamate transporter 1 inhibition. *J Biol Chem*, 2016, 289(11):7399-7412.
- 2, Fujimaki S, Masanao M, Wakabayashi T, Asashima M, Takemasa T and

- Kuwabara T. Functional Overload Enhances Satellite Cell Properties in Skeletal Muscle. *Stem Cells Int.*, 2016, 1-11
- 3, Fujimaki S, Wakabayashi T, Takemasa T, Asashima M, Kuwabara T. The regulation of stem cell aging by Wnt signaling. *Histol Histopathol.* 2015
 - 4, Fujimaki S, Wakabayashi T, Takemasa T, Asashima M, Kuwabara T. Diabetes and Stem Cell Function. (2015) *Biomed Res Int.* 2015: 1-16.
 - 5, Fujimaki S, Hidaka R, Asashima M, Takemasa T and Kuwabara T* Wnt-Mediated Satellite Cell Conversion in Adult and Aged Mice Following Voluntary Wheel Running. (2014) *J Biol Chem*, 289(11):7399-7412.
 - 6, Wakabayashi T, Hidaka R, Fujimaki S, Asashima M and Kuwabara T* (2014) MicroRNAs and the epigenetics in adult neurogenesis. *Adv Genet.*, 86, 27-44.
 - 7, Fujimaki S, Takemasa T, Kuwabara T. Transdisciplinary Approach for Sarcopenia. The effects of exercise on skeletal muscle hypertrophy and satellite cells. *Clin Calcium.* 2014 Oct;24(10):1463-1470.
 - 8, Hidaka R, Machida M, Terashima K, Fujimaki S, Asashima M. Kuwabara T (2013) Monitoring neurodegeneration in diabetes using adult neural stem cells derived from the olfactory bulb. *Stem Cell Res Ther.*, 4, 51
 - 9, Fujimaki S, Masanao M, Hidaka R, Takemasa T, Asashima M and Kuwabara T Intrinsic ability of adult stem cell in skeletal muscle: an effective and replenishable resource to establishment of pluripotent stem cells. *Stem Cells Int.*, 2013, 1-18.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

町田 正直, 浅島 誠, 桑原 知子, 嗅球由来の神経幹細胞の脾臓への移植による糖尿病改善治療, 内分泌・糖尿病・代謝内科, 2013, 35(2) 107-112.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 海馬または嗅球由来の成体神経幹細胞を用いた神経・精神疾患および糖尿病のモニタリング方法

発明者: 桑原 知子, 浅島 誠
 権利者: 産業技術総合研究所
 番号: 特願 2013-060512
 出願年月日: 2013 年 9 月
 国内外の別: 国内

取得状況(計 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 知子 (KUWABARA, Tomoko)
 産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員

研究者番号: 9 0 3 5 8 3 9 1

(2) 研究分担者

武政 徹 (TOHRU, Takemasa)
 筑波大学・体育系・教授

研究者番号: 5 0 2 3 6 5 0 1

(3) 連携研究者

()

研究者番号: