

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007~2008
 課題番号： 19590199
 研究課題名 (和文) サテライトグリアと神経前駆細胞
 研究課題名 (英文) Perineuronal satellite cells as neural stem/progenitor cells
 研究代表者 山田 久夫 (YAMADA HISAO)
 関西医科大学医学部・教授
 研究者番号： 00142373

研究成果の概要：

広く終脳皮質内に分裂能を持つ細胞が散在し、それらが NG2 というマーカーを持つことはすでに報告されている。この細胞は皮質ニューロンに接して存在することから、いわゆるサテライトグリアの一部と考えられる。新生した NG2 細胞がその後どのように変化して、神経系の各細胞 (ニューロン、マクログリア) になるのかを、マーカーを用いた組織化学的検索をおこない、サテライトグリアの一部が神経系の幹前駆細胞である確証を得た。研究過程で、細胞種や分化度を分類するマーカーの定義の「ゆらぎ」を修正するための検討もおこなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1,900,000	570,000	2,470,000
平成20年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：細胞分化・組織形成、再生・発生、細胞新生、哺乳類成獣脳

1. 研究開始当初の背景

サテライトグリア、すなわち perineuronal satellite cells は多くの教科書にはオリゴデンドロサイトとして記載されているものの、詳細に観察された文献では、それ以外に

アストロサイトやミクログリアも存在すると報告されている (Cammermeyer, *Am J Anat* 118: 227-248, 1966; King, *Anat Rec* 161: 111-123, 1968)。すなわちニューロンの細胞体に接して存在するグリア細胞であること

以外は定義もあいまいな点が残っていた。しかしこの細胞は、てんかん発作後や強制運動の後では増加することが古くから知られている (Kulenkampff らの一連の研究, *Zeit Anat Ent* など 1951~1959; Morita, *J Vet Med Sci* 61:107-111, 1999)。

一方、成獣の終脳皮質で、オリゴデンドロサイトのマーカーである NG2 を含有する細胞が幹・前駆細胞の役割を持ち、GABA 系ニューロンが新生してくる可能性が示唆された報告 (Belachew, *J Cell Biol* 161:169-186, 2003; Dayer, *J Cell Biol* 168:415-427, 2005) を契機に、終脳皮質でも細胞交代が起こるかもしれないことが一般に知られるようになった。(注: これらの対象は、最近良く研究されている海馬歯状回や側脳室上衣直下層ではなく、一般終脳皮質におけるものである。) われわれも 神経過剰興奮という脳障害モデルを構築して検索したところ、このモデルラットでは脳内で細胞交代が昂進していて、ニューロンに近接する NG2 陽性細胞が分裂し、オリゴデンドロサイトやアストロサイトに分化すること (Tamura, *Neurosci Res* 50:129-133, 2004; Kataoka, *Acta Histochem Cytochem* 38:93-98, 2005) を見出し、一方正常成獣においてもサテライトグリアと思われる細胞が緩徐に分裂し、神経系細胞に分化すること (Kataoka, *Med Mol Morphol* 39:28-32, 2006) を報告した。

これらの事実は、サテライトグリアと思われていた細胞群の中に神経幹・前駆細胞が存在することを意味している。

2. 研究の目的

(1) NG2 陽性細胞とサテライトグリアを同定し我々の目的とする「前駆細胞」の概念を

決定し、その形態学的特徴を明らかにする。

(2) 正常成獣オスラットで、この前駆細胞から生まれた新生細胞がどれくらいの時間をかけてどのような手順で分化するのかを、マーカー染色にて追究する。(1 時間後~28 日後)

(3) ウィルスによる分裂細胞標識がうまくいけば長期観察し (1 か月~半年)、神経回路形成や超微形態などを観察する。

(4) マーカーと呼ばれる分子は考えられている以上に多様性を示しマーカーの定義をあいまいにさせてしまうことがある。この定義の「ゆらぎ」を修正し、染色性などを検討する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物: 正常成獣として 12 週齢の Wistar ラットオスに、BrdU を投与し、その後経時的 (2, 6, 12 時間後および 1, 4, 7, 14, 28 日後) に麻酔下に灌流固定して実験に供する。

必要に応じて非投与群、胎仔および新生仔 (オス・メス)、マウス、培養細胞も用いる。また、BrdU 以外の長期観察用分裂細胞標識として、レトロウィルスによって分裂細胞に導入された蛍光タンパク質を観察する方法も開発し、併用する。

(2) 標本作製・観察法: クリオスタットにて作成した脳組織切片に BrdU と各種の中枢神経系細胞マーカーとの多重組織化学染色をおこない、一般蛍光顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡にて観察する。

(3) 用いた細胞マーカー (抗体):

神経前駆細胞: DCX, PSA-NCAM, TUC-4

成熟ニューロン: NeuN, GABA, TH, など

アストロサイト: GFAP, など

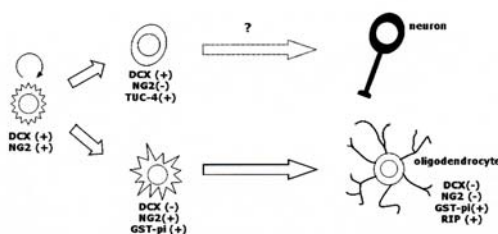
オリゴデンドロサイト： GST-pi、RIP、
 未熟オリゴデンドロサイト：NG2（本研究で
 目的とする神経系前駆細胞を標識する）
 ミクログリア：Iba1、など
 細胞分裂周期に入っている細胞：Ki67 (BrdU
 取り込みと少し異なる意味合いを持つ)
 細胞核（核膜）の同定：ラミン各サブタイプ

4. 研究成果

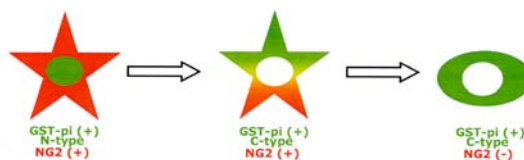
我々はすでに正常成獣終脳皮質で、分裂細胞
 が終脳皮質ニューロンに張り付いて存在す
 ることから、いわゆるサテライト細胞の一部
 ではないかと考えている。BrdU を摂取した分
 裂細胞の核がニューロンの核との距離 5 μm
 以内の perineuronal territory にあること
 から、perineuronal germinal cells と呼ぶ
 ことができる。

この細胞は、NG2 (+) であるので、NG2 を指
 標に、その後どのように分化していくのかを
 追究したところ、① NG2 (+) 細胞集団には
 未熟ニューロンのマーカーである DCX を発現
 するものとしらないものが存在する。② BrdU
 および Ki67 抗体にて分裂細胞を同定したと
 ころ、DCX(+)/NG2(+)
 細胞のみが該当し、
 DCX(+)/NG2(+)
 のサテライト細胞が神経系
 前駆細胞である確証を得た。③ BrdU 投与
 14 日後の脳で、多くの BrdU 陽性細胞は
 DCX(+)/NG2(+)
 娘細胞であったが、④
 DCX(+)/NG2(-)
 細胞は TUC-4 陽性・グリア系
 マーカー陰性であったのに対して、
 DCX(-)/NG2(+)
 細胞は GST-pi 陽性でニューロン
 系マーカー陰性であったことから、
 DCX(+)/NG2(-)
 細胞はニューロン系に分化
 しつつある細胞であり、DCX(-)/NG2(+)
 細胞はオリゴデンドロサイトへと分化しつつあ
 る細胞であると考えられた。⑤ BrdU 投与

28 日後では、BrdU 陽性で、NG2(-)/GST-pi (+)
 の細胞が観察され、これらは CNPase にも陽
 性であったことから、成熟オリゴデンドロサ
 イトへの分化が確認された。⑥ これまでの
 研究から分裂細胞はほぼ NG2 陽性を示すもの
 の、BrdU で標識された分裂細胞の一部は NG2
 非陽性であることが判っている。この細胞群
 の性質を明らかにすることが不可欠であり、
 染色感度・標識率や観察法などを工夫したと
 ころ、NG2 非陽性の分裂細胞は血管内皮細胞
 であって、それを除外すると NG2 細胞と神経
 系分裂細胞は完全一致することが確認され
 た。



(Tamura et al., *Eur J Neurosci* 25: 3489–3498, 2007)



(Tamura et al., *Neuroscience* 148: 535–540, 2007)

これらの研究過程でマーカーの持つ定義の
 揺らぎや多様性を持つマーカーの染色性につ
 いても検索し、① 前記 GST-pi 反応産物は
 分化過程で、核内から細胞質にトランスロケ
 ーションすること、②未熟ニューロンマ
 カーと言われている DCX 分子は神経突起形成に
 かかわるとされるが、網膜水平細胞では分化
 成熟後もこの分子を持つこと、すなわち、水
 平細胞が成熟後も神経突起再構成をおこな
 い続けているか、または、この分子が別な機
 能も持つ可能性が示唆されること、などが明
 らかになるとともに、③ ニューロンとマク
 ログリア（オリゴデンドロサイト・アストロ

サイト)は神経系の細胞系譜であるが、由来の異なるミクログリアを標識して区別する必要があり、その点を検索したところ、これまで未分化細胞に発現し神経前駆のマーカーとされてきた中間径フィラメント分子 nestin がミクログリアの一部にも発現することが判明した。一方、④核膜タンパク質のラミンのサブタイプ(A/C, BI, B2)とニューロン分化の関係についても検索し、サブタイプ構成比が分化に従って変動することを明らかにした。

なお、BrdU 標識では1か月以上の長期追跡が困難なため神経回路形成まで観察することができないので、レトロウィルスで遺伝子導入した GFP にて標識する実験を行なったが、培養系での導入には成功したが、標識効率の問題もあって本研究のような成体を用いて長期観察する研究にはあまり有用でないことが判明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

① Takamori Y, Mori T, Wakabayashi T, Nagasaka Y, Matsuzaki T, Yamada H
Nestin-positive microglia in adult rat cerebral cortex.
Brain Res, 1270:10-18, 2009 (査読有)

② Mori T, Wakabayashi T, Takamori Y, Kitaya K, Yamada H
Phenotype analysis and quantification of proliferating cells in the gray matter of the adult rat.
Acta Histochem Cytochem, 42(1):1-8, 2009
(査読有)

③ Wakabayashi T, Kosaka J, Mori T, Takamori Y, Yamada H
Doublecortin expression continues into adulthood in horizontal cells in the rat retina.
Neurosci Lett, 442(3):249-252, 2008. (査読有)

④ Takamori Y, Tamura Y, Kataoka Y, Cui Y, Seo S, Kanazawa T, Kurokawa K, Yamada H
Differential expression of nuclear lamin, the major component of nuclear lamina, during neurogenesis in two germinal regions of adult rat brain.
Eur J Neurosci, 25(6):1653-1662, 2007. (査読有)

⑤ Tamura Y, Kataoka Y, Cui Y, Takamori Y, Watanabe Y, Yamada H
Intracellular translocation of glutathione S-transferase pi during oligodendrocyte differentiation in adult rat cerebral cortex in vivo.
Neuroscience, 148(2):535-540, 2007. (査読有)

⑥ Tamura Y, Kataoka Y, Cui Y, Takamori Y, Watanabe Y, Yamada H
Multi-directional differentiation of double cortin- and NG2-immunopositive progenitor cells in the adult rat neocortex in vivo.
Eur J Neurosci, 25(12):3489-3498, 2007.
(査読有)

〔学会発表〕（計6件）

① 高森康晴、森徹自、若林毅俊、山田久夫
ラット終脳皮質における Nestin 陽性ミクログリアの同定

第 114 回日本解剖学会（岡山市）2009 年 3 月

② 若林毅俊，小阪淳，山田久夫
網膜神経細胞の成熟を制御する分子の解析
第 114 回日本解剖学会（岡山市）2009 年 3 月

③ 高森康晴，森徹自，若林毅俊，山田久夫
ラット終脳皮質におけるネスチン陽性ミクログリアの同定
第 31 回日本神経科学大会（東京）2008 年 7 月

④ 高森康晴，森徹自，若林毅俊，山田久夫
成獣ラットの脳のグリア系細胞におけるラミン・サブタイプの構成パターンの解析
第 30 回日本神経科学大会（横浜）2007 年 9 月

⑤ 若林毅俊，森徹自，高森康晴，小阪淳，三木友香里，山田久夫
神経特異的抗原 C38 は神経成熟を促進する
第 30 回日本神経科学大会（横浜）2007 年 9 月

⑥ 仁平美果，渡辺淳，山田久夫
粗面小胞体の増生を観る－形態計測法を用いた小胞体膜とリボソームの動態解析
第 48 回日本組織細胞化学会総会（甲府）2007 年 9 月

〔図書〕（計0件）

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

該当なし

○取得状況（計0件）

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 久夫 (YAMADA HISAO)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：00142373

(2) 研究分担者（平成19年度のみ）

森 徹自 (MORI TETSUJI)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：30285043

(3) 連携研究者（平成20年度のみ）

森 徹自 (MORI TETSUJI)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：30285043