

平成22年 5月13日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790161

研究課題名（和文） 成体脊髄におけるグリア細胞新生の分子メカニズムの解明と、  
神経細胞新生誘導の試み研究課題名（英文） Elucidation of molecular mechanisms of gliogenesis and  
an attempt to induce neurogenesis in the adult spinal cord

研究代表者

北田 容章（KITADA MASAOKI）

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80324614

研究成果の概要（和文）：私たちはこれまで成体脊髄上衣細胞がグリア前駆細胞として機能する事を示してきたが、本研究においてその細胞分裂および細胞分化が、Notch 経路の細胞内シグナル伝達系で調節されている事が明らかとなった。また、成体脊髄上衣細胞のグリア細胞新生能を神経細胞新生へ変換する事が可能かどうか、ほぼ同様の活性を有する神経幹細胞を用いて検討を行い、神経細胞新生とグリア細胞新生を調節する因子を同定した。

研究成果の概要（英文）：We have found the activity of the ependymal cells as glial precursor cells in the adult spinal cord. In this study, we elucidated that proliferation and differentiation of the ependymal cells are regulated by the intracellular signaling of Notch pathway. Also, we explored the possibility to convert this gliogenesis into neurogenesis and thus identified the factor which can regulate gliogenesis and neurogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞分化、神経幹細胞、神経前駆細胞、成体脊髄上衣細胞、Notch シグナリング  
グリア細胞新生、神経細胞新生

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄が損傷を受けると様々な原因により軸索再生が阻まれ、結果として機能が失われる事は良く知られている。崩壊髄鞘や反応性グリアによるグリオシス等が代表的な抑制因子として知られている。これらの抑制作用を打破しようと様々な試みが行われ、一部の方法は臨床応用が考えられている。しかし実際には崩壊髄鞘については詳細な研究がなされている物の、グリオシスそれ自体の発生機序、その構造を形成する細胞の由来等については未解決の問題が山積している。ましてや、正常成体脊髄においてグリア細胞のターンオーバーが存在するのかどうかすら、定かではない。こうした観点から、申請者らは、まず正常脊髄におけるグリア細胞新生の証明と、グリア細胞新生を生じる細胞の同定を進めてきた。正常成体脊髄における分裂細胞はオリゴデンドロサイト前駆細胞と上衣細胞が知られているが、これらを分子生物学的に特異的に標識し、これらの分化能を検討した。その結果、正常成体脊髄のアストロサイト新生については、主に上衣細胞がその役割を担っている事を明らかとした。そしてその細胞分裂能・アストロサイト新生能・細胞移動のメカニズムについては、Notch-1の機能が重要である事を明らかとした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、この成体脊髄上衣細胞におけるNotchシグナリングを更に詳細に解析する事にある。上衣細胞におけるNotchシグナリングを解明する事によりアストロサイト新生のメカニズムを明らかにするだけでなく、Notchシグナリングおよび関連するシグナリングの調節により成体脊髄上衣細胞から神経細胞新生を生じせしめる事が可能であるかについても検討を行う。損傷脊髄ではグリオシス発生の調節と共に、失われた神経細胞の補充も重要な課題である。本研究の目的を達成する事で、脊髄損傷の新たな治療法開発への一途としたい。

## 3. 研究の方法

- ①Notch-1 遺伝子発現ウイルスの投与と組織学的解析
- ②NICDのRAM以外ドメインの遺伝子導入・免疫沈降・質量分析による選択因子の同定
- ③アデノウイルスの作成、投与、脊髄上衣細胞の組織学的解析
- ④伸長上衣細胞と脊髄上衣細胞の組織学的解析
- ⑤神経細胞分化関連分子発現アデノウイルスの作成、投与、視床下部伸長上衣細胞の組織学的解析
- ⑥神経細胞分化関連分子発現アデノウイルスの投与、脊髄上衣細胞の組織学的解析

## <2008年度>

初年度は成体脊髄上衣細胞におけるNotchシグナリングが細胞分裂・アストロサイト新生という2つの表現型を生じうる点について着目し、2つの表現型を選択させる分子を同定する。この目的のため、以下の実験を行う。①Notch-1 遺伝子発現アデノウイルスのZ/EGマウスへの脳室内投与による上衣細胞への遺伝子導入と、その脊髄上衣細胞の組織学的解析を行う。更に、②RBP-J $\kappa$ 分子と相互作用に重要と考えられているNICD内のドメインであるRAMドメイン以外のドメインについてGFP融合タンパク質発現ベクターを作成し、神経幹細胞へ各ドメインを遺伝子導入し、相互作用するタンパク質を免疫沈降法にて確保する。そしてタンデム型質量分析機により解析を行う。これらにより、細胞分裂・細胞分化の選択に関わる分子の候補を絞る。そして、③①、②で関与が示唆される特定の遺伝子xについて、x-IRES2-nCre リコンビナーゼ、またはx-IRES2-NICD、更にはx-miRNA-IRES2-NICDを発現させるアデノウイルスの作成を行い、アデノウイルスのZ/EGマウスへの脳室内投与による上衣細胞特異的遺伝子導入と、その組織学的解析を行う。①、②では複数の遺伝子が候補として考えられる事が予想される為、③ではその都度ウイルスの作成、投与、解析を行い標的分子を同定する。

(NICD: 構成的活性型Notch-1 遺伝子 (Notch IntraCellular Domainの略))

## <2009年度>

2008年度で得られた所見のN数の確保を行うと共に、下記の実験を行う。視床下部第三脳室周囲の伸長上衣細胞(tanycyte)は神経細胞新生を生じる事が知られている(Xu et al., 2005; Kokoeva et al., 2005)が、④この伸長上衣細胞と脊髄上衣細胞の組織学的解析を行い、両者の遺伝子発現の相違点を検討する。これにより神経細胞新生に関わる因子の候補を絞る。候補となる遺伝子が多数となる様であれば、必要に応じ神経幹細胞への遺伝子導入実験により候補を絞る。次に、⑤標的分子yについて、y-IRES2-nCre リコンビナーゼ、およびy-IRES2-NICD 遺伝子、更にはy-miRNA-IRES2-NICD アデノウイルスを作成し、これらのアデノウイルスをZ/EGマウスへ脳室内投与し上衣細胞特異的遺伝子導入を行い、組織学的解析を行う。これらにより、神経細胞新生に関わる標的因子を同定する。次に、⑥同定された因子を、④で作成したウイルスを用い脊髄上衣細胞へ導入し、その神経細胞新生の可能性を探る。

#### 4. 研究成果

私たちはこれまで、脊髄上衣細胞が成体脊髄において分裂能を有する事、分裂した脊髄上衣細胞は脊髄実質方向へ移動する事、そしてその移動した脊髄上衣細胞はアストロサイト新生に関与する事を見出してきた。これらの現象は脊髄上衣細胞が成体脊髄においてグリア前駆細胞として機能する事を示唆している。本実験の目的は、脊髄上衣細胞に着目し、その成体脊髄における分裂能およびアストロサイト新生能というグリア前駆細胞としての機能発現を左右する因子およびメカニズムを解明する事にある。また、成体上衣細胞の細胞内シグナルを調節する事でグリア細胞新生能を神経細胞新生へ転換させる事が可能かどうか、検討を行う事をも目的としている。

2008年度では、脊髄上衣細胞の成体脊髄におけるグリア前駆細胞としての機能発現に重要と考えられるNotchシグナリングに着目し、細胞分裂およびアストロサイト新生という別々の表現型に分岐するメカニズムについて検討を行った。構成的活性型Notch遺伝子に存在するAnkyrin repeat (ANK)ドメイン、RAMドメインを発現するアデノウイルスを作成し、脊髄上衣細胞へ遺伝子導入を行った。するとANKドメイン導入上衣細胞は主に細胞分裂を生じ、また、RAMドメイン導入上衣細胞は主にアストロサイトへの分化を生じた。これらの事から、脊髄上衣細胞のグリア前駆細胞としての機能発現はNotchシグナリングにより調節されている事が明らかとなった。

2009年度では、脊髄上衣細胞の成体脊髄におけるグリア前駆細胞としての機能発現を、神経細胞新生へと変換出来るかどうかについての可能性を検討した。私たちのこれまでの研究により脊髄上衣細胞は神経幹細胞として機能しうる可能性が示唆されていた為、神経幹細胞を用いた実験により因子の同定を試みた。その結果、神経細胞新生に関わる因子が同定された。この因子は通常脊髄上衣細胞で発現しており、神経幹細胞においてこの因子の発現を調節する事で、神経細胞新生とグリア細胞新生を調節する事が可能である事が明らかとなった。この因子の発現調節を行う事で、脊髄上衣細胞のグリア細胞新生機能を神経細胞新生へ転換させうる可能性が示唆された。

#### 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7件)

##### 1. 総説論文<査読有>

Kitada M and Dezawa M. Induction system of neural and muscle lineage cells from bone marrow stromal cells: a new strategy for tissue reconstruction in degenerative diseases. *Histol Histopathol* 2009 24(5):631-642.

##### 2. 総説論文<査読無>

北田容章、出澤真理 神経の再生 *日本臨床* 2008 66(5):921-925.

##### 3. 原著論文<査読有>

Yamamoto M, Yoshimura K, Kitada M, et al (+7 people). A new monoclonal antibody, A3B10, specific for astrocyte-lineage cells recognizes calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1 (Camsap1). *J Neurosci Res* 2009 87(2):503-513. (Review)

##### 4. Nagane K\*, Kitada M\*, et al (+3 people). Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells using spermine-pullulan-mediated reverse transfection method. *Tissue Eng Part A* 2009 15(7):1655-1665.

##### 5. Hayase M, Kitada M, et al (+6 people). Committed neural progenitor cells derived from genetically modified bone marrow stromal cells ameliorate deficits in a rat model of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009 29(8):1409-1420.

##### 6. Wakao S\*, Hayashi T\*, Kitada M\*, et al (+11 people). Long-term observation of auto-cell transplantation in non-human primate reveals safety and efficiency of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 2010 223(2):537-547.

##### 7. Kuroda Y\*, Kitada M\*, et al (+14 people). Unique multipotent stem cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010

107(19):8639-8643.

\*These authors contributed equally to the work.

[学会発表] (計8件)

1. 北田容章・出澤真理、同種動物作成抗体による多重染色 -tyramide反応を用いて-、日本顕微鏡学会第64回学術講演会、2008年5月23日、京都市
2. 北田容章・出澤真理、成体脊髄の新たなグリア前駆細胞の同定と、その細胞分裂・分化に関わる分子の探索、第31回日本神経科学大会、2008年7月11日、千代田区
3. Kitada M and Dezawa M, Notch regulation of the spinal progenitor fate in the adult rodent. The 13th Congress of the International Federation of Societies for Histochemistry and Cytochemistry (IHC2008), 2008. 8. 26, Gdańsk, Poland
4. Kitada M and Dezawa M, Lectin-binding pattern reveals involvement of glycoconjugates and carbohydrate antigens in neural stem cell niche. The 13th Congress of the International Federation of Societies for Histochemistry and Cytochemistry (IHC2008), 2008. 8. 26, Gdańsk, Poland
5. 北田容章・出澤真理、成体中枢神経に存在する幼若細胞の探索 -内在性前駆細胞の賦活化による神経疾患治療を目指して-、第114回日本解剖学会総会・全国学術集会、2009年3月29日、岡山市 (シンポジウム)
6. 北田容章・出澤真理、同種動物作成抗体による多重染色法 -tyramideと monovalent抗体の比較-、日本顕微鏡学会第65回学術講演会、2009年5月28日、仙台市
7. 北田容章、成体中枢神経系における新たな前駆細胞の探索 -内在性前駆細胞の賦活化による神経疾患治療を目指して-、第34回峠の会、2009年7月31日、東蒲原群
8. 北田容章・出澤真理、失われたグリア前駆細胞を求めて -DM-20 mRNA発現細胞に注目して-、第115回日本解剖学会総会・全国学術集会、2010年3月30日、盛岡

市

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0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

北田 容章 (KITADA MASA AKI)  
東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：80324614

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：