

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：平成21年度～平成22年度

課題番号：21800037

研究課題名(和文) 転写因子ネットワーク制御による成体脳海馬神経幹細胞の未分化維持機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms for maintenance of undifferentiated adult hippocampal neural stem cells by the transcription factor-network system

研究代表者：

下崎 康治 (SHIMOZAKI KOJI)

長崎大学・先導生命科学研究支援センター・助教

研究者番号：40379540

研究成果の概要(和文)：成体脳海馬領域における神経幹細胞の未分化維持と分化制御機構の解明のために、Type-II神経幹細胞に感染するSox2及びTLX遺伝子に対するshRNA発現レトロウイルスベクターの構築を行った。機能的なノックダウンを確認後、in vivo用の高感染効率遺伝子発現ウイルスを作成した。この濃縮ウイルス溶液を成体マウス脳海馬領域に注入接種し、感染導入実験を行った結果、Sox2、TLX遺伝子は共に神経分化に必要な遺伝子ということが示された。これらの結果から、Sox2とTLXの新たな役割と位置づけが想定されると同時に、Type-IからType-II神経幹細胞の制御は当初予想のような単純な機構では説明がつかず、新たな遺伝子の探索が必要であることが意義づけられた。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the mechanism for maintenance and differentiation of neural stem cells (NSCs) in an adult hippocampal region, we developed shRNA for Sox2 or TLX expressing retroviral vectors that specifically infect Type-II NSCs. After confirming functional gene knockdown, high titer vector-viruses were created for the high efficiency of infection experiments in vivo. When these viruses were injected into the mouse hippocampal region, Sox2 and TLX gene showed that both genes are essential for neuronal differentiation. These results suggested that Sox2 and TLX has new roles, and the molecular controlling from Type-I to Type-II NSCs is not a simple mechanism as we have expected. It is supposed that exploring new genes is necessary to understand this system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1280000	384000	1664000
2010年度	1200000	360000	1560000
年度			
年度			
年度			
総計	2480000	744000	3224000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：神経科学、神経幹細胞、ニューロン新生、未分化維持機構、転写因子

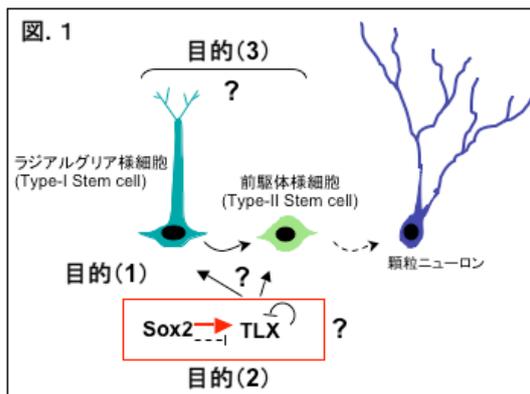
## 1. 研究開始当初の背景

現在まで一貫して、細胞の運命決定機構の分子メカニズムの解明を焦点にして研究を行ってきた。申請者はES細胞の未分化維持に

必要な役割を果たす転写因子 Oct4 が初期神経幹細胞の確立に必須であることを示した。申請者は Oct4 を中心とした初期神経幹細胞発生機構の分子解析を行ってきた。初期発生

において Oct4 は転写因子 Sox2 をパートナーとする。しかしながら Oct4 は成体脳では発現していないことから、成体脳神経幹細胞における Sox2 の Oct4 に相当する因子は不明であった。申請者は米国ソーク研究所にて、分子生物学的、生化学的手法によって、成体脳における Sox2 結合因子の探索を行ってきた結果、核内受容体である TLX が Sox2 と結合することを明らかにした。TLX は培養細胞系及び in vivo 成体脳において神経幹細胞の未分化維持を制御していることが報告されているが、その分子メカニズムは不明である。そこでさらなる新規領域探求を独自で行うべく、本申請となった。

## 2. 研究の目的



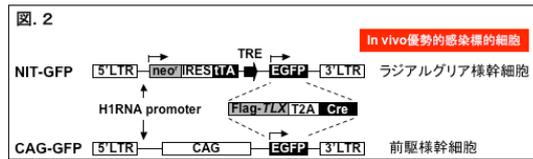
転写因子のネットワーク制御システムによる成体脳海馬領域における神経幹細胞の未分化維持と分化の制御機構解明を目指す。成体脳海馬神経幹細胞のサブタイプ特異的に感染する遺伝子組み換え発現レトロウイルスを用いて Sox2 と TLX による転写因子ネットワーク振動発現制御機構を in vivo で明らかにすることを目的とした (図. 1)。

(1) In vivo の成体脳海馬神経幹細胞における Sox2 と TLX の詳細な分子階層関係とその役割の解明。

(2) In vivo 成体脳海馬における TLX ネガティブフィードバック阻害及びコントロールによる Sox2/TLX 振動制御の生理的役割の解明

(3) In vivo 成体脳海馬領域におけるラジアルグリア様神経幹細胞 (Type-I 神経幹細胞) と前駆体様幹細胞 (Type-II 神経幹細胞) の網羅的遺伝子発現比較解析による、静から動への細胞特異性分子メカニズムの解明。

## 3. 研究の方法



CAG 及び NIT の shRNA ウィルスベクターの各種構築を行う(図. 2)。CAG 及び NIT ベクターに PCR 法によって得た H1 プロモーターと shRNA 配列を含む遺伝子断片を導入する。さらに shRNA 耐性の TLX サイレンス変異体と T2A 配列及び Cre 遺伝子との融合体を PCR 法によって作製後、上記ベクターに組み入れることで完成させる。高導入率 293T 細胞と哺乳類高感染用パッケージングコンストラクトを用いて、高感染効率の遺伝子発現ウイルスを作製する。感染効率を飛躍的に高めるために、このウイルス上清液は遠心高濃縮させる。その後、ステレオタクシスを用いてこの濃縮ウイルス溶液を成体マウス脳海馬領域に注入接種し、感染実験を行う。ウイルス接種後、マウスを飼育するが、4日目、6日目、12日目とタイムコースをとり、それぞれのマウス脳をパラホルムアルデヒドにて還流固定する。脳の適宜回収後、GFAP、Nestin、BLBP 等の神経幹細胞マーカー、Doublecortin、Prox 1 等の神経初期分化マーカー、さらに成熟アストロサイトやオリゴドンドロサイトのマーカー遺伝子に対する抗体を用いて免疫染色を行い、その表現系を解析する。各分化ステージマーカー陽性細胞の割合をカウントし、統計解析を行い、その機能を判定する。また、細胞増殖マーカー Ki67 の免疫染色や、BrdU 投与後取り込み率等の解析から、ラベルされた細胞の時間空間的解析を行う。これは各時点での細胞増殖能力を過去に遡って推察するための非常に有効な手段である。

さらに目的(2)のために、shRNA システムを導入した NIT 及び CAG ベクターを基盤にして、TLX-T2A-Cre 融合体の発現系を構築する。これはラジアルグリア及び前駆幹細胞における内在性 TLX を破壊する一方で、TLX に対する shRNA に抵抗性の TLX サイレンス変異体を恒常的に発現させることで、想定される内在性 TLX 遺伝子の振動転写を阻害すると想定している。この発現系に組込まれる TLX 遺伝子は Flag 標識に加え、T2A 配列を介した Cre 遺伝子とのキメラタンパク質として発現されるが、細胞内でプロセッシングを受けることで、この2つのタンパク質

は別々に切り離され、各自機能する。このコンストラクトから作製された発現ウイルスを、ROSA26 プロモーター制御下に loxP 配列が EGFP 遺伝子の直前に挿入されているレポーターマウスの脳海馬領域に、ステレオタキシスを用いて注入接種する。そしてテトラサイクリンを時限的に投与することで、TLX 遺伝子の発現を自在にコントロールし、得られる細胞表現系の解析から目的 (2) の *in vivo* 成体脳における TLX の転写制御システムの包括的解明を行う。さらに、shRNA システムによる Sox2 の遺伝子破壊を行いながら同時に TLX 遺伝子の導入発現を行い、TLX の機能相補性を検証することで、*in vivo* における Sox2 と TLX 遺伝子間の分子階層機序も明らかにする。

目的 (3) を遂行するために NIT-GFP と CAG-GFP でそれぞれ感染ラベルされた細胞を成体脳海馬より回収する。成体脳からの神経幹細胞樹立法にて細胞を分離し、FACS Aria セルソーターを用いて GFP 陽性細胞を単離回収する。前出のように、NIT-GFP 及び CAG-GFP ベクターから産出された発現ウイルスは成体マウス脳海馬においてラベルする細胞が各自異なり、成体脳海馬神経幹細胞のうち Type-I と Type-II をそれぞれ特異的にラベルすることができる。NIT-GFP と CAG-GFP でそれぞれラベルされた直後の細胞を回収するために、ウイルス感染後 4 日目にマウスから海馬を解剖摘出し、酵素処理にて緩やかに細胞分離後に FACS ソーティングを行って GFP 陽性細胞を回収し、素早く RNA 抽出を行う。その後マイクロアレイ解析を行い、ラジアルグリア様細胞と前駆体様幹細胞の網羅的遺伝子発現比較解析から成体脳海馬神経幹細胞の動態を明らかにする。さらに、細胞特異性や非対称分裂に関与する可能性が高い因子に着目し、NIT 及び CAG の shRNA ウィルスベクターによるターゲット遺伝子の破壊系解析から、成体脳海馬神経幹細胞の新規分子制御機構の解明を行う。

#### 4. 研究成果

成体脳海馬領域における神経幹細胞の未分化維持と分化制御機構の解明のために、成体脳海馬神経幹細胞のサブタイプ特異的に感染する遺伝子組換え発現レトロウィルスを用いて Sox2 と TLX による転写因子ネットワーク振動発現制御機構を *in vivo* で明らかにすることを目的とした。実施した研究概要は本研究申請計画に準じ、まず shRNA ウィルスベクターの構築を行った。Sox2 遺伝子及び TLX 遺伝子に対する shRNA 断片は、それぞれ別ベクターの H1RNA プロモーターと下流の shRNA 配列を含む

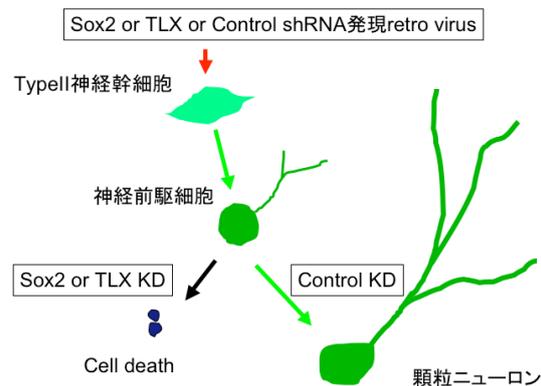
遺伝子配列を PCR によって増幅し、T-vector に挿入した。この断片を NIT-GFP ベクター及び CAG-GFP ベクターに挿入し、クローンを得た。これらのベクターの shRNA システムの機能を確認するため、Flag 配列と融合した Sox2cDNA 及び TLXcDNA を 293T 細胞に共発現させた後、ウェスタンブロッティングにて機能判定を行った。この結果、新規に shRNA システムを組込んだベクターでは shRNA システムがうまく機能しないことが判明した。また長期発現によって内在性の遺伝子のノックダウンを誘導できるかを判定するため、これらよりベクターウイルスを作製したが、タイターが極端に低いものしか得られないことが分かった。GFP 遺伝子発現には影響は出ていないので、組み込んだ shRNA 配列によってパッケージング効率が落ちてしまう可能性が示唆された。また、この低タイターウイルスベクターを培養神経幹細胞に感染させて、GFP 陽性細胞のみを FACS Aria によってソーティングした後、増殖培養を 1 週間行った。内在性 Sox2 遺伝子及び TLX 遺伝子の発現低下が期待されたが、得られた細胞を定量 PCR で測定した結果、野生型と差異は観察されなかった。以上の結果より、このベクターシステムでは当初予定していた解析が行えない可能性が非常に高くなったので、レトロウィルスとレンチウィルスを共感染させる方法にシフトすることにした。

そこで新たに Sox2 と TLX の shRNA を組込んだレンチウィルスベクターを米国 GeneCopoeia 社より購入した。この shRNA 発現レンチウィルスベクターと細胞腫特異的に感染する NIT-GFP と CAG-GFP レトロウィルスベクターとの共感染によって目的の達成を試みた。まず購入したレンチウィルスベクターを培養神経幹細胞に感染導入し、puromycin による薬剤選択の後、定量 PCR 法によって内在性遺伝子のノックダウンを査定した。その結果、コントロール遺伝子のノックダウンは効果的に検出されたが、Sox2 及び TLX 遺伝子に関してはその効果が検出されなかった。同社に問い合わせを行い、新たに数種類のベクターを試したがいずれも効果は見られなかった。以上から外注製品に信頼性を見い出せなかったため、Type-II 神経幹細胞に感染導入されることが確認済みのレトロウィルスベクターを新たに入手し、Sox2 及び TLX 遺伝子に対する shRNA-GFP ベクターの構築を行った。培養神経幹細胞に感染導入後、FACS ソーティングにより GFP 陽性細胞のみを回収し、定量 PCR にて判定を行った。その結果遂に、機能的に内在性 Sox2 及び TLX 遺伝子をノックダウンできることが判明したため、研究実施計画通り哺乳類

高感染用パッケージングコンストラクトを用いてin vivo用高感染効率遺伝子発現ウイルスを作成した。この濃縮ウイルス溶液を7週齢のc57/BL6成体マウス脳海馬領域に注入接種し、感染導入実験を行った。遺伝子発現ウイルス接種後3日後、14日後、28日後とタイムコースをとって脳固定をし、GFAP, Nestin, DCX等のマーカー遺伝子に対する抗体で免疫染色を行った。その結果、コントロールGFP発現ウイルスベクターにおいて、成体脳海馬に導入接種3日後にもGFP陽性かつNestin及びGFAP陽性神経幹細胞が検出され、14日後に神経前駆細胞マーカーのDCXとGFPの共陽性細胞が検出された。28日後ではGFPとNeuNの共陽性の成熟顆粒ニューロンが検出された。一方Sox2及びTLX遺伝子に対するshRNAを発現するウイルスを成体脳海馬に導入した場合、3日後、14日後ではコントロールウイルス導入とほぼ同様な結果が得られた。しかしながら、28日後では樹状突起と神経軸索が消失し、さらに細胞体が丸く収縮した形態を示すようになった。細胞の性状を調べるため、アポトーシスを起こした細胞で活性化されるカスパーゼ3の活性化型特異的に反応する抗体で免疫染色を行ったところ、Sox2及びTLX遺伝子をノックダウンした細胞はすべて活性化カスパーゼ3陽性ということが判明した。これは成体脳海馬領域の神経新生において、神経前駆細胞から成熟顆粒ニューロンに分化する段階でSox2, TLX遺伝子がそれぞれ共に必須な役割を果たしていることを示唆している。また申請者は培養神経幹細胞にSox2及びTLX遺伝子shRNA-GFPベクターを導入後、FACSソーティングにてGFP陽性細胞のみ回収し、定量PCR法によって神経幹細胞マーカー遺伝子の発現を調べたところ、Sox2はTLXの遺伝子発現調節の一部に関与し得る一方で、TLXはSox2の遺伝子発現に変化を与えないというデータが得られた。さらにSox2及びTLX遺伝子ノックダウン時にそれぞれTLX及びSox2遺伝子を相補発現させ、神経幹細胞のBrdU取り込み率低下がレスキューされるか検討したが、どちらもノックダウンによる現象を回復することができなかった。これらの結果からSox2とTLXはそれぞれ別の経路で神経幹細胞の自己複製を制御していることが推察された。

申請当初、Sox2とTLXがTypeI-からType-II神経幹細胞のドライバー遺伝子となっているという予想であった。即ちSox2及びTLXがType-II神経幹細胞で発現増加することで増殖性の性状になり、これらの遺伝子発現量を抑えると増殖性の低いType-I神経幹細胞に遷

移するという仮説である。またさらに、成体脳海馬神経幹細胞はType-IIからType-Iに逆行性に細胞が性質を変化する現象もある。Sox2とTLXがこのスイッチ因子として働いているということが予想されていたが、申請者が行ったType-II特異的遺伝子ノックダウンの系において、Sox2とTLXはin vivo成体脳内ではType-II神経幹細胞からの神経分化における細胞生存に必須な因子ということが示唆された。Sox2とTLXは神経幹細胞の自己複製機構及び未分化維持機構に重要であるが、成体脳内では幹細胞の階層によって異なる役割を果たしているのかもしれない。これらの結果から、Sox2とTLXの新たな役割と位置づけが想定された。同時にType-IとType-II神経幹細胞間の制御は当初予想のような単純な機構では説明がつかず、新たな遺伝子探索が必要であることが意義づけられた。



## 5. 主な発表論文等

Functional roles of Sox2 for the molecular regulation of TLX/NR2E1 in adult neural stem/progenitor cells (K. Shimozaki et al., 投稿準備中)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

下崎 康治 (SHIMOZAKI KOJI)

長崎大学・

先端生命科学研究支援センター・助教

研究者番号：40379540

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

Fred H. Gage

ソーク研究所 (米国)・教授