

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：82404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06792

研究課題名(和文) アストロサイトの新規分化制御因子の解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of a new regulator of astrocyte differentiation

研究代表者

長尾 元史 (Nagao, Motoshi)

国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・研究所 運動機能系障害研究部・研究室長

研究者番号：00359671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系の細胞の一種であるアストロサイトは、神経幹細胞から生み出されるが、その分子メカニズムは不明な点も多い。本研究では、大脳新皮質の発生過程において、Zbtb20がアストロサイト産生を促進する新規転写因子であることを明らかにした。マウス神経幹細胞でZbtb20を過剰発現させるとアストロサイト産生は促進し、逆にノックダウンすると、その産生は抑制された。さらに、Zbtb20のアストロサイト産生促進のメカニズムを検討したところ、Zbtb20は転写因子Sox9とNFIAと協調して働き、ニューロン産生に必須の因子であるBrn2の発現を直接抑制することでアストロサイト産生を制御することが示された。

研究成果の概要(英文)：Multipotent neural precursor cells (NPCs) generate astrocytes at late stages of mammalian neocortical development, but the underlying mechanisms remain poorly understood. Here I show that Zbtb20 regulates astrocyte specification in the mouse neocortex. Zbtb20 is highly expressed in late-stage NPCs and their astrocytic progeny. Overexpression and knockdown of Zbtb20 promote and suppress astrocytogenesis, respectively. Astrocyte induction by Zbtb20 is suppressed by knockdown of Sox9 or NFIA. Furthermore, in the astrocyte lineage, Zbtb20 directly represses the expression of Brn2, which encodes a protein necessary for upper-layer neuron specification. Zbtb20 is thus a key determinant of astrocytogenesis, in which it collaborates with Sox9 and NFIA and acts in part through direct repression of Brn2 expression.

研究分野：神経発生 幹細胞

キーワード：神経幹細胞 グリア アストロサイト 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の中枢神経系において、アストロサイトは最も数の多い細胞であり、これまで長い間、ニューロンなど他の神経系細胞の支持細胞と考えられてきた。しかし近年の研究により、中枢神経系におけるアストロサイトの機能がしだいに明らかにされ、特にシナプス形成やシナプス可塑性に積極的に関わりニューロンの機能を制御することが注目されはじめている。このことは、ニューロンの機能異常によって引き起こされていたと考えられていた多くの神経疾患に、アストロサイトが関与していることを示唆している。しかし、この重要な役割をもつアストロサイトがいつ、どこから、どのように生み出されるかという、その起源や発生の分子メカニズムに関しては、ニューロンやオリゴデンドロサイトの発生と比較して、その研究が遅れており、未だ不明な点も多い。

アストロサイトは、ニューロンやオリゴデンドロサイトと同様に神経幹細胞(神経系前駆細胞)から生み出される。これまで、JAK-STAT 経路、BMP-SMAD 経路、Notch-Hes/NFIA 経路などがアストロサイト分化を制御することが報告されている。しかし、哺乳類の脳において、アストロサイト分化の最初のステップである特異化に関わる因子(特異化因子)は明らかにされていない。

様々な神経疾患により失われたニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを再生させるためには、これらの細胞が神経幹細胞(神経系前駆細胞)からどのように生み出されるかを明らかにし、そこで得られた知見を応用することが考えられる。再生医療に必要な細胞を作り出すための基礎的な研究として重要である。

## 2. 研究の目的

アストロサイトは、発生後期に神経幹細胞(神経系前駆細胞)から生み出されるが、その産生の分子メカニズムは不明な点も多い。本研究では、新しいアストロサイト分化制御因子を探索し、その新規因子によるアストロサイト分化の制御メカニズムを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 発生期または成体マウス脳において、転写因子 Zbtb20 の発現パターンを免疫組織染色で解析した。神経幹細胞、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの分子マーカーとの共染色を行い、Zbtb20 がどの細胞に発現しているか詳細な解析を行った。

(2) マウス神経系前駆細胞の培養系(neurosphere culture)とレトロウイルスを使った発現系を用いて、培養した神経系前

駆細胞で Zbtb20 を過剰発現またはノックダウンし、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に対する影響を検討した。

(3) エレクトロポレーションによるマウス個体への遺伝子導入系(In utero electroporation(EP) / Postnatal EP)を用いて、Zbtb20 を生体内の神経系前駆細胞で過剰発現またはノックダウンし、ニューロン、アストロサイト分化に対する影響を検討した。

(4) Zbtb20 を過剰発現させた神経系前駆細胞で、Sox9 または NFIA をノックダウンし、Zbtb20 によるアストロサイト分化制御に Sox9 と NFIA がどうかを検討した。

(5) 免疫沈降法を用いて、Zbtb20 と相互作用する分子を検討した。

(6) Zbtb20 を過剰発現させた神経系前駆細胞を用いてマイクロアレイを行い、Zbtb20 の標的分子を探索した。

(7) クロマチン免疫沈降アッセイとルシフェラーゼアッセイを行い、Brn2 が Zbtb20 の直接の標的分子であることを検討した。

## 4. 研究成果

アストロサイトは、ニューロンへの栄養供給、ニューロンが放出した神経伝達物質の回収、シナプス周辺のイオン環境の維持、血液脳関門の制御、シナプス形成など、中枢神経系の様々な機能において重要な役割を果たす。アストロサイトはニューロン、オリゴデンドロサイトと同様に神経幹細胞(神経系前駆細胞)から生み出されるが、アストロサイトの分化制御メカニズムは未だ不明な点も多い。発生過程において、神経幹細胞は、先にニューロンを産生し、その後、アストロサイトを産生する。そこで、本研究では神経幹細胞がアストロサイトを産生し始める時期に、神経幹細胞で発現量が高くなる因子を探索し、転写因子 Zbtb20 を同定した。Zbtb20 は、胎生 14 日頃のマウス大脳新皮質の脳室帯でその発現が始まり、その後、アストロサイト系譜の細胞で発現が維持された。成体マウスの大脳新皮質において、Zbtb20 はアストロサイトで発現し、ニューロンとオリゴデンドロサイトでは発現が観察されなかった。この Zbtb20 の発現パターンから、Zbtb20 は神経幹細胞のアストロサイトへの分化に関与する可能性が考えられ、次に培養したマウス神経幹細胞を用いて検討した。主にニューロンを産生する時期の神経幹細胞(胎生 11 日のマウス脳由来)において、Zbtb20 を過剰発現したところ、ニューロン産生量が減り、神経幹細胞は主にアストロサイトを産生するようになった。

た(図1A)。一方、アストロサイトを産生する時期の神経幹細胞(胎生16日のマウス脳由来)において、Zbtb20をノックダウンしたところ、アストロサイト産生量は減り、代わりに神経幹細胞はニューロンを産生ようになった(図1B)。さらに、マウス個体内の神経系前駆細胞でZbtb20を過剰発現またはノックダウンしても、同様の結果が得られた。以上の結果は、Zbtb20はアストロサイトの産生を促進することを示している。

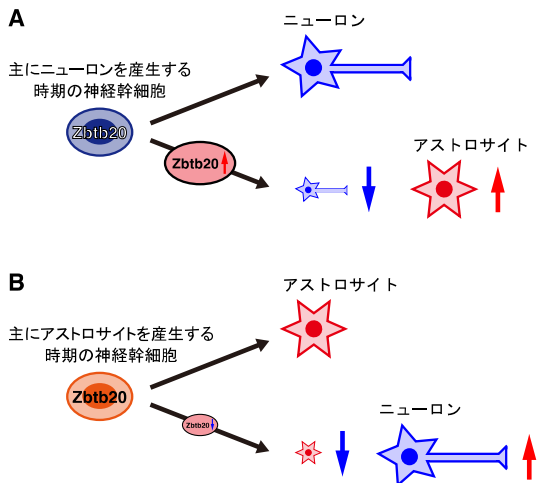


図1 Zbtb20によるアストロサイト産生

- (A) 主にニューロンを産生する時期の神経幹細胞でZbtb20の発現量を増加させると、ニューロン産生が減りアストロサイト産生が増える。
- (B) 主にアストロサイトを産生する時期の神経幹細胞でZbtb20の発現量を低下させると、アストロサイト産生が減りニューロン産生が増える。

次に、Zbtb20がどのようにアストロサイト産生を制御するのかを検討した。グリア細胞産生において重要な働きをすることが報告されている転写因子Sox9とNFIAが、Zbtb20によるアストロサイト産生の促進に関与するかを調べた。Zbtb20を過剰発現させた神経系前駆細胞で、Sox9またはNFIAをノックダウンしたところ、Zbtb20によるアストロサイト産生は顕著に抑制された。また、免疫沈降法によりZbtb20がSox9またはNFIAと相互作用するかを検討したところ、Zbtb20とNFIAは複合体を形成することが明らかとなった。これらの結果より、Zbtb20はSox9とNFIAの2つの因子と協調して働き、アストロサイト産生を促進していることが示唆された(図2)。

さらに、Zbtb20を過剰発現させた神経系前駆細胞を用いてマイクロアレイを行い、Zbtb20の標的分子を探索した。Zbtb20の過剰発現により、大脳皮質の上層ニューロンの産生に必須の転写因子Brn2とオリゴデンドロサイト産生に必須の転写因子Sox10の発現が抑制されていた。クロマチン免疫沈降アッセイを行い、Zbtb20がBrn2とSox10の制御領域に結合するかを検討したところ、Zbtb20はBrn2の制御領域に結合するが、Sox10の制御領域には結合しなかった。さらに、ルシフェラーゼアッセイにより、Zbtb20

はBrn2のプロモーター活性を抑制することが明らかとなった。これらの結果より、Brn2はZbtb20の直接の標的分子であることが明らかとなった。そして、Zbtb20はBrn2とSox10の発現を抑制し、神経幹細胞のニューロンやオリゴデンドロサイトへの分化を抑えていることが示唆された(図2)。

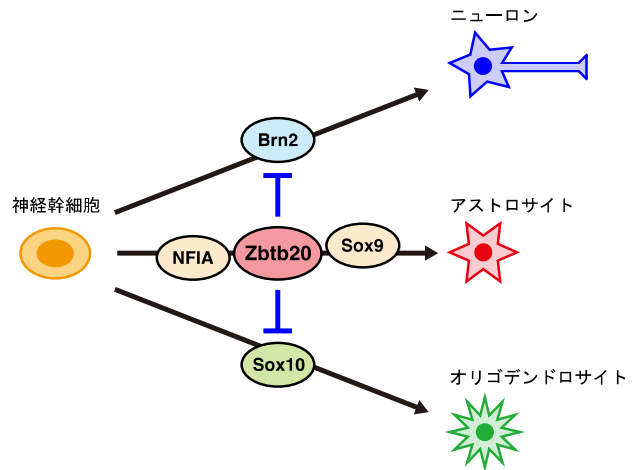


図2 Zbtb20によるアストロサイト産生の分子メカニズム

- Zbtb20はNFIAとSox9と協調してアストロサイト産生を促進する。
- Zbtb20はBrn2の発現を抑制してニューロン産生を抑制する。
- Zbtb20はSox10の発現を抑制してオリゴデンドロサイト産生を抑制する。

Zbtb20と同じZbtbファミリーに属する分子であるZbtb16とZbtb45はグリア分化に関与することが報告されている。そこで、Zbtb16とZbtb45が、Zbtb20と同様にアストロサイト産生を促進するかを検討した。Zbtb16とZbtb45を培養したマウス神経系前駆細胞で過剰発現させてもアストロサイト産生は促進されなかった。また、神経系前駆細胞においてZbtb20をノックダウンすると、アストロサイト産生が抑制され、ニューロン産生が促進するが、そこにZbtb16あるいはZbtb45を過剰発現させてもZbtb20ノックダウンの表現型はレスキューされなかった。この結果から、Zbtb20はグリア分化制御において、Zbtb16とZbtb45とは異なる機能をもつことが示唆された。

Zbtb20は成体の脳の成熟したアストロサイトにも発現している。このことは、Zbtb20が神経幹細胞のアストロサイトへの分化制御の他に重要な働きをする可能性を示唆しており、その機能の解明は今後の課題である。

### 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7件)

Ryu Y, Ogata T, Nagao M, Sawada Y, Nishimura R, Fujita N. Effects of treadmill training combined with serotonergic interventions on

spasticity after contusive spinal cord injury.

J Neurotrauma 35:1358-1366, 2018.  
doi:10.1089/neu.2017.5400. 【査読有】

Doi T, Ogata T, Yamauchi J, Sawada Y, Tanaka S, Nagao M.

Chd7 collaborates with Sox2 to regulate activation of oligodendrocyte precursor cells after spinal cord injury.

J Neurosci 37:10290-10309, 2017.  
doi:10.1523/JNEUROSCI.1109-17.2017. 【査読有】

Miyamoto Y, Torii T, Tanoue A, Kawahara K, Arai M, Tsumura H, Ogata T, Nagao M, Terada N, Yamamoto M, Takashima S, Yamauchi J. Neuregulin-1 type III knockout mice exhibit delayed migration of Schwann cell precursors.

Biochem Biophys Res Commun 486:506-513, 2017.  
doi:10.1016/j.bbrc.2017.03.074. 【査読有】

Ryu Y, Ogata T, Nagao M, Kitamura T, Morioka K, Ichihara Y, Doi T, Sawada Y, Akai M, Nishimura R, Fujita N.

The swimming test is effective for evaluating spasticity after contusive spinal cord injury.

PLoS One 12:e0171937, 2017.  
doi:10.1371/journal.pone.0171937. 【査読有】

Ichihara Y, Doi T, Ryu Y, Nagao M, Sawada Y, Ogata T.

Oligodendrocyte Progenitor Cells Directly Utilize Lactate for Promoting Cell Cycling and Differentiation.

J Cell Physiol 232:986-995, 2017.  
doi:10.1002/jcp.25690. 【査読有】

Okazaki R, Doi T, Hayakawa K, Morioka K, Imamura O, Takishima K, Hamanoue M, Sawada Y, Nagao M, Tanaka S, Ogata T.

The crucial role of Erk2 in demyelinating inflammation in the central nervous system.

J Neuroinflammation 13: 235, 2016.  
doi:10.1186/s12974-016-0690-8. 【査読有】

Nagao M, Ogata T, Sawada Y, Gotoh Y. Zbtb20 promotes astrocytogenesis during neocortical development.

Nat Commun 7: 11102, 2016.  
doi:10.1038/ncomms11102. 【査読有】

〔学会発表〕(計4件)

Doi T, Ogata T, Sawada Y, Tanaka S, Nagao

M.

Chd7 collaborates with Sox2 to regulate activation of oligodendrocyte precursor cells after spinal cord injury

北米神経科学会 (Neuroscience2017)

2017年11月11-15日

ワシントン DC、アメリカ合衆国

土肥透、長尾元史、村瀬修平、澤田泰宏、田中栄、緒方徹

クロマチン再構成因子Chd7は脊髄損傷後の再髄鞘化を制御し運動機能回復に寄与する

第32回日本整形外科学会基礎学術集会

2017年10月26-27日

沖縄

Lanjakornsiripan D, Furutachi S, Pior B-J, Kishi Y, Hirabayashi Y, Nagao M, Gotoh Y. Regulation of astrocyte production in the developing mouse neocortex

XIII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease

2017年7月8-11日

Edinburgh, UK

Nagao M.

A new regulator of astrocyte differentiation in the neocortex

第38回日本神経科学大会 New recipes for making glial cells from their precursors and iPS cells (グリア系前駆細胞の新しい分化メカニズムとその応用)

2015年7月28-31日

神戸

〔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

<http://www.rehab.go.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長尾 元史 (NAGAO, Motoshi)

国立障害者リハビリテーションセンター (研究所)・研究所 運動機能系障害研究部・研究室長

研究者番号：00359671

研究者番号：

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )