

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18962

研究課題名(和文) 海馬神経幹細胞の胎生期から成体期に至るまでの細胞系譜解析

研究課題名(英文) Fate analysis of hippocampal neural stem cells from embryonic to adult stage

研究代表者

柏木 太一 (Kashiwagi, Taichi)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：10398232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：海馬では例外的に神経幹細胞が長期にわたって維持され、成体においても神経新生が認められる。このことから海馬歯状回の神経幹細胞は異なった性質を持っていると考えられる。成体期の神経新生を知ることは、幹細胞を用いた神経系の再生医療において重要な知見となり得る。そのためには成体海馬神経幹細胞の性質および形成過程を知る必要があるが、その詳細は今のところ不明である。本研究では成体海馬神経幹細胞の形成メカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the hippocampus, neural stem cells (NSCs) are present even in adulthood, and neurogenesis occur throughout life. Therefore, the hippocampal NSCs presumably possess the special mechanisms to maintain stemness for long-term period. It is useful for regenerative therapies in the nervous system to find mechanisms of neurogenesis in adulthood. To accomplish this, it is necessary to uncover characteristics of adult hippocampal NSCs, however detail processes of adult hippocampal NSC generation and mechanisms of long-term maintenance has not been understood. In this study, we partly elucidated the mechanisms of adult hippocampal NSC generation.

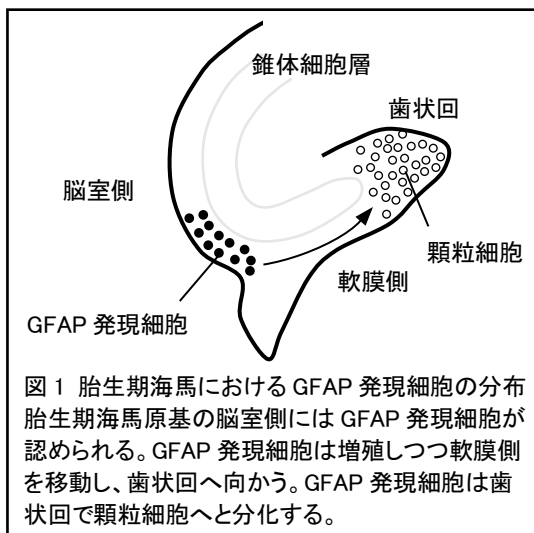
研究分野：神経発生学

キーワード：海馬 歯状回 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

海馬は大脳皮質の中では進化的に古い皮質に分類され、記憶の形成に関わる。海馬はアンモン角と歯状回の二つの領域に分けられ、アンモン角は主に錐体細胞、歯状回は顆粒細胞がそれぞれ神経細胞層を形成している。大部分の神経新生は生後まもない頃には完了してしまうが、海馬歯状回では例外的に成体になっても神経幹細胞の存在が確認され、顆粒細胞の新生が起きる。このことは、海馬歯状回の神経幹細胞には胎生期から成体にいたるまで長期間にわたって未分化性を維持するメカニズムの存在を示唆している。成体神経幹細胞は胎生期神経幹細胞に比べその数が少ないため、解析を行うことが困難で、その性質についてはよく分かっていなかったが、2011年に成体海馬歯状回の神経幹細胞の運命を追跡した論文が報告され、非常に注目された (Cell, 2011,145:1142-55, Cell Stem Cell,2011, 8: 566-79)。一方で、成体海馬歯状回の神経幹細胞がどのような細胞に由来し、どのような形成過程を経て誕生するかについては未だによく分かっていない。このような状況において Seki らによって興味深い報告がなされた (J Comp Neurol. 2014 522; 261-83)。この報告によると、胎生期の海馬原基ではアストロサイトのマーカーであるグリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) を発現する神経前駆細胞が限局して存在し、この GFAP 発現細胞は歯状回へ移動し、顆粒細胞を生み出していた (図 1)。そこで、この研究結果を発展させるため、Seki らが用いたマウス GFAP プロモーター制御下で緑色蛍光タンパク質 (GFP) が発現するマウス (mGFAP-GFP トランスジェニックマウス) の胎生期海馬から神経前駆細胞を単離し、培養系に供したところ、GFAP 発現細胞はニューロスフェアと呼ばれる細胞塊を形成することができた。ニューロスフェア形成能は神経幹細胞の指標として用いられているため、この結果は GFAP 発現細胞が多分化能を有する神経幹細胞を含んでいることを示唆している。つまり、GFAP 発現細胞は単に顆粒細胞を生み出す神経前駆細胞ではなく、神経幹細胞やグリア細胞も生み出す能力を有していることが推測された。実際に、培養系において GFAP 発現細胞の多分化能を確認することができた。成体海馬神経幹細胞も GFAP を発現する点や神経幹細胞は

自己複製によって維持されるということを考慮すると、胎生期海馬の GFAP 発現細胞が成体神経幹細胞の起源の有力な起源ではないかと推測した。成体海馬神経幹細胞の形成過程、メカニズムを明らかにするために、本研究では GFAP 発現細胞に焦点を絞り、解析を行った。



2. 研究の目的

(1) GFAP 発現細胞の細胞系譜解析

成体海馬神経幹細胞の由来を明らかにするために、その有力な候補である GFAP 発現細胞の細胞系譜解析を行う。細胞運命を追跡するために胎生期の GFAP 発現細胞を標識し、成体になったときにどのような細胞になるかを調べる。様々な発生段階で解析を行うことにより、GFAP 発現細胞がニューロン(顆粒細胞)をいつ、どれだけ生み出すのか、また、成体神経幹細胞はいつ誕生するのか、成体神経幹細胞を生み出すまでに何回分裂を行うか、といった細胞系譜の解明を目指す。神経幹細胞の細胞系譜解明は海馬形成機構を理解する上で重要な知見となる。

(2) 成体海馬神経幹細胞の形成メカニズムの解明

これまでの実験で、胎生期海馬に限局する GFAP 発現細胞の誕生に BMP シグナルが重要な役割を果たしていることを見出した。このことから BMP シグナルが GFAP 発現細胞の性質に関与しているのではないかと推測した。そこで、BMP シグナルの阻害実験を行うことで、GFAP 発現細胞の性質および、成体海馬神経幹細胞の形成

に影響があるかどうかを調べる。BMP シグナルの阻害にはドミナントネガティブ型変異体である BMP 受容体を導入することで行った。

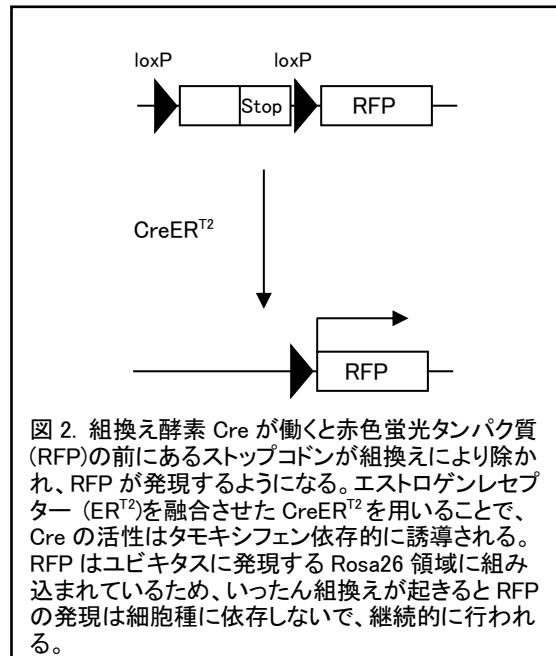
一方で、準備実験として胎生期海馬と大脳新皮質における遺伝子発現を網羅的に解析するために DNA マイクロアレイ解析を行った。得られた海馬原基の遺伝子発現プロファイルをもとに特に BMP シグナル関連因子に着目し、海馬神経幹細胞の性質、分化に影響を及ぼす因子を探索することで成体海馬神経幹細胞の形成メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 発生期海馬に局限する GFAP 発現細胞の標識

mGFAP-GFP トランスジェニックマウスでは GFP の発現をマウス GFAP プロモーター活性に依存する。このため、ニューロンに分化すると mGFAP プロモーターの活性が低下するため、GFP の発現が消失してしまう。また、GFP の発現がいつ始まったのか確認することができない。従って、細胞系譜解析を行うためには、任意の発生段階で GFAP 発現細胞を標識し、いったん標識されると継続して標識されるシステムが必要となる。そこで、Cre-loxP システムを用いる (図 2)。このシステムではタモキシフェンを投与することで標識することが可能なので任意の発生段階で GFAP 発現細胞を標識することができ、RFP の発現は細胞の種類にかかわらず、継続的に行われるので、分化後でも検出が可能である。さらに、マウス GFAP プロモーター制御下で Cre を発現するトランスジェニックマウスと組換え後に RFP を発現するレポーターマウスである Ai9 とを交配し、胎仔を作る。妊娠マウスにタモキシフェンを投与することで胎生期 GFAP 発現細胞を標識し、成体における細胞系譜を各細胞マーカーで免疫染色を行うことで解析を進める。しかし、ヒトの GFAP プロモーター制御下で CreER^{T2} を発現するマウスは報告されているが、マウス GFAP プロモーターを用いたマウスは報告されていない。ヒト GFAP プロモーター制御下の GFAP 発現はマウスにおける GFAP の発現とは異なるため、マウス GFAP プロモーターを使用する必要がある。そこでまず、mGFAP-CreER^{T2} マウスの作成を試みる。成体神経幹細胞は歯状回の顆粒細胞下帯(Subgranular

zone, SGZ)に存在し、突起を顆粒細胞層側へ伸ばす放射状グリア様の形態を示すため、細胞の位置、形態、および成体神経幹細胞マーカー (Sox2, GFAP)の発現を免疫組織化学法で調べることにより同定した。



(2) 成体海馬神経幹細胞形成メカニズムの解析

BMP シグナルが成体海馬神経幹細胞の形成に関与しているかどうかを調べるためにドミナントネガティブ型変異体である BMP 受容体を導入することで BMP シグナルの抑制実験を行った。BMP 受容体変異体の導入にはレトロウイルスを用いた。変異体を導入した細胞は GFP も同時に発現するため、GFP を発現した細胞が成体海馬神経幹細胞になったかどうかを免疫組織化学法で同定し、定量を行った。

4. 研究成果

(1) mGFAP-CreER^{T2} トランスジェニックマウスの作成と GFAP 発現細胞の標識

胎生期海馬に局限する GFAP 発現細胞を標識し、細胞系譜解析を行うために、mGFAP-CreER^{T2} トランスジェニックマウスの作成を試みた。その結果、12 系統のトランスジェニックマウスが得られた。胎生期海馬における CreER^{T2} の発現を確かめるために組織から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。そのうち、高い発現が認められるものについては Ai9 と交配し、タモキシフェンを投

与することで GFAP 発現細胞の標識を試みた。しかしながら、GFAP 発現細胞の標識効率が著しく低く、統計的に十分な解析を行えるようなマウスを得ることができなかった。

(2)ベクターを用いた GFAP 発現細胞の標識

GFAP-CreER^{T2}トランスジェニックマウスを作成する一方で、Cre 発現ベクターを用いた GFAP 発現細胞の標識を試みた。Cre の発現が GFAP プロモーターで制御されるベクターを作製し、エレクトロポレーション法を用いて Ai9 マウス胎仔の海馬に導入を行った。エレクトロポレーション法を行う時期によって任意の発生段階で導入することが可能であるのでタモキシフェン誘導性の CreER^{T2}ではなく、ノーマルな Cre を用いた。その結果、GFAP 発現細胞を RFP にて標識することができた。さらに、胎生期に標識した GFAP 発現細胞の運命を成体マウスになってから確認すると、多くは歯状回の顆粒細胞へと分化していた。一部の細胞において、グリア細胞と成体海馬神経幹細胞への分化が認められた。同様に、CreER^{T2}とタモキシフェンを用いた場合でも GFAP 発現細胞を標識することができた。この結果より、胎生期海馬に限局する GFAP 発現細胞が成体海馬神経幹細胞を生み出していることが示唆された。また、導入した遺伝子が染色体に組み込まれるレトロウイルスベクターを用いた GFAP 発現細胞の標識も試みており、この方法によって単一の GFAP 発現細胞がどのような細胞系譜をたどるかを調べるのが可能となるため、詳細な解析が期待できる。

(3) 成体海馬神経幹細胞の形成メカニズムの解析

mGFAP-Cre 発現ベクターによる胎生期の GFAP 発現細胞標識実験により、成体海馬神経幹細胞の由来の一つが胎生期の GFAP 発現細胞である可能性を示した。GFAP 発現細胞の形成に BMP シグナルが関与しているため、成体神経幹細胞の形成にも BMP シグナルが関与しているかどうかを調べた。BMPシグナルを阻害するためにドミナントネガティブ型 BMP 受容体を導入することで行った。導入方法には長期間安定した発現させることが可能であるレトロウイルスベクターを用いた。胎生期海馬にドミナントネガティブ型 BMP 受容体を導入したところ、成体神経幹細胞

の形成が阻害された。一方、DNA マイクロアレイ解析により胎生期海馬には BMPシグナルを制御するいくつかの因子が強く発現していることを確認した。これらの因子は BMP シグナルを負に制御する働きを有しており、免疫組織化学による解析の結果、歯状回以外の領域に強い発現が認められた。従って、歯状回とアンモン角の領域化に関与していることが推測された。成体神経幹細胞の形成に関与する因子については現在も探索中である。

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 2 件)

①Matsue K, Minakawa S, Kashiwagi T, Toda K, Sato T, Shioda S, Seki T.、Dentate granule progenitor cell properties are rapidly altered soon after birth.、Brain structure & function、査読有、223 巻、2018、357-369
DOI: 10.1007/s00429-017-1499-7.

②Mimura-Yamamoto Y, Shinohara H, Kashiwagi T, Sato T, Shioda S, Seki T.、Dynamics and function of CXCR4 in formation of the granule cell layer during hippocampal development.、Scientific reports、査読有、7 巻、2017 年
DOI: 10.1038/s41598-017-05738-7.

[学会発表](計 6 件)

① 柏木太一、BMP シグナルによる海馬神経細胞形成制御、第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2018

② Taichi Kashiwagi、Control of granule and pyramidal cell generation by BMP signaling in the developing hippocampus、2017 年度生命科学系合同年次大会、2017 年

③ 柏木太一、胎生期海馬に存在する神経幹・前駆細胞の性質、第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017

④ Taichi Kashiwagi、The role of BMP signaling

regulation in the dentate gyrus formation、第 39 回日本分子生物学会年会、2016

⑤ Taichi Kashiwagi、Mechanisms of BMP signaling regulation in the developing hippocampus、第 39 回日本神経科学大会、2016

⑥ 柏木太一、胎生期海馬歯状回形成過程における BMP シグナルの役割、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016

[その他]

ホームページ等

<http://www.tokyo->

[med.ac.jp/med/course/10.html](http://www.tokyo-med.ac.jp/med/course/10.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

柏木 太一 (KASHIWAGI Taichi)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号:10398232