

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：32610  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2018～2022  
課題番号：18K07074  
研究課題名（和文）成体脳の神経前駆細胞における分化誘導因子の解析

研究課題名（英文）Differentiation factor of adult neurogenesis

## 研究代表者

新井田 素子 (Niida, Motoko)

杏林大学・保健学部・教授

研究者番号：40385381

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）：TGF- $\beta$ 、BMPをシグナル伝達の主要介在分子であるSmad4を神経前 細胞選択的に欠損させたマウス (Smad4 CKOマウス)の解析を行った。Smad4CKOマウスは加齢に比例し、成熟神経細胞に発現する 細胞マーカーNeuNの細胞数が大脳皮質や嗅皮質で減少していた。neurosphereではSmad4のCKO細胞は成熟 アストロサイトにも神経 細胞にも分化する細胞数が減少していた。neurosphereの網羅的解析を行った。NGSの結果から神経細胞分化を阻害するファクターが20個有意差を持ち変化しており、現在それらを免疫染色および蛋白の分析を行っている。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

成体における新規の神経細胞はTGF- $\beta$ やBMPシグナルにより維持されていることが示された。このことは、頭部外傷や神経変性疾患における治療法の開発に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We analyzed Smad4 CKO mice, a major intermediary molecule for TGF- $\beta$  and BMP signaling, in neural progenitor cells. In Smad4CKO mice, the cerebral cortex becomes thin, and the number of NeuN express cells is low in the cerebral cortex and olfactory cortex. Primary cultures of neurospheres were generated. As a result of cell staining, the number of Smad4 CKO cells that differentiated into mature astrocytes and neurons decreased under all conditions. This suggests that Smad4 is required not only for neural cells but also for the differentiation of stem cells into brain cells. We also performed an exhaustive analysis of the neurosphere for confirmation. From the results of NGS, 20 factors that inhibit neuronal differentiation have changed with significant differences, and we are currently performing immunostaining and protein analysis on them.

研究分野：神経病理学実験

キーワード：成体脳 神経分化 神経幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

成体脳では、神経幹細胞から生じた神経前駆細胞は嗅球や大脳皮質に移動し、成熟神経細胞へと分化するが、神経前駆細胞の分化や維持機構は不明である。申請者は、TGF- $\beta$ /BMP シグナル伝達の主要介在分子である Smad4 を神経前駆細胞選択的に欠損させたマウス(Smad4 CK0)マウスの解析を行い、Smad4 CK0 マウスでは、神経前駆細胞が正常な経路を移動しないことや、成熟神経細胞に分化できず、結果として脳容積が減少することを報告した。

### 2. 研究の目的

Smad4 CK0 マウスの脳容積メカニズムとして、Smad4 CK0 マウスのマイクロアレイ解析で増加を示した Olig1/2 の過剰発現が神経前駆細胞の分化誘導や移動を含めた恒常性への抵抗を惹起することを想定し、神経細胞分化に関する実験を行うことを本研究の目的とする。これらの神経細胞分化の詳細なメカニズムを決定することは、脳梗塞や神経変性疾患における再生医療戦略の一端を担う可能性があるかと想定した。

### 3. 研究の方法

神経前駆細胞特異的 Smad4 CK0 マウスにおける分化制御因子の同定 正常および Smad4 欠損の神経前駆細胞分散培養の作製を行う。具体的には、4-5 週齢の対照および Smad4 CK0 マウスから脳を摘出した後、実体顕微鏡下に脳室下帯を切り出し、酵素処理およびパスツールピペットによる物理的分散処理を行ったあと、神経前駆細胞が選択的に増殖する培養条件下で培養する。数日後に形成される sphere をトリプシンを用いて分散することで、神経前駆細胞を分離して分散培養を作製する。これらの細胞を血清および接着面を用いた培養条件下で分化を誘導し、ウェスタンブロットおよび各種の未分化マーカー:Nestin/sox2/Doublecortin、分化マーカー:アストロサイト, S100; オリゴデンドロサイト, MBP/O4; 神経細胞, NeuN, NF, MAP2 に関して、qPCR、ウェスタンブロット、免疫細胞化学的染色を行い検討した。これらマーカー分子の細胞内局在も検討する。

siRNA による遺伝子機能阻害による Smad4 欠損神経前駆細胞の分化誘導回復を行う。

Smad4 CK0 マウスのマイクロアレイ解析では、転写因子 Olig1/2 遺伝子の発現が増加しており、Olig1/2 の過剰発現が分化誘導の抵抗性を惹き起こすことを想定している。Olig1/2 の siRNA を分化条件下の神経前駆細胞に導入し、分化抵抗性の Smad4 欠損神経前駆細胞が分化するかどうかを各種の未分化/分化マーカーの qPCR、ウェスタンブロットおよび免疫細胞化学的染色を行い検討する。

#### 4 . 研究成果

sphere をトリプシンを用いて分散することで、神経前駆 細胞を分離して分散培養を作製し、これらの細胞を血清および接着面を用いた培養条件下で分化を誘導し、ウェスタンブロットおよび各種の未分化マーカー:Nestin/sox2/Doublecortin、分化マーカー:アストロサイト、S100; オリゴデンドロサイト, MBP/O4; 神経細胞, NeuN, NF, MAP2 に関して、qPCR、ウェスタンブロット、免疫細胞化学的染色を行い検討した。その結果、未分化マーカーに関しては増加傾向を示し、分化マーカーのうちでも神経細胞のマーカーである NeuN, NF, MAP2 嗅皮質を中心に減少していた。

siRNA による遺伝子機能阻害による Smad4 欠損神経前駆細胞の分化誘導回復を行う試みを行ったが、機能阻害がいくつかの手法を用いても導入されなかった。

Smad4 CKO マウスのマイクロアレイ解析では、転写因子 Olig1/2 遺伝子の発現が増加しており、Olig1/2 の過剰発現が分化誘導の抵抗性を惹き起こすことを想定していたが、再度 RNAsequence を行い、Olig1/2 の遺伝子発現量変化が確認されなかった。そのため、現在異なるターゲットに関して検索中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|