

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590271  
 研究課題名（和文）EGF 依存的に神経幹細胞で発現する転写因子、その動態と分化制御機構の解析  
 研究課題名（英文）Control of astrocyte differentiation in EGF-responsive neural stem cells from developing mouse cerebellum.  
 研究代表者  
 内田 孝幸（UCHIDA TAKAYUKI）  
 群馬大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：80334093

研究成果の概要：幼弱マウス小脳には EGF 依存的に増殖する神経幹細胞が存在する。本研究では、この EGF 反応性神経幹細胞を純化し、その未分化性維持に働く分子機構の解析を行った。磁気ビーズによる細胞分離 (MACS) を行った結果、EGF 反応性神経幹細胞は prominin-1 陽性細胞画分に多く存在することが明らかとなった。この細胞はサイトカイン BMP2 や CNTF により GFAP 陽性アストロサイトへと選択的に分化する。Notch シグナルの活性化はこの細胞のアストロサイトへの分化を抑制し、その抑制には *Hes5* が働いていることが示唆された。神経幹細胞からアストロサイトへの分化制御における Notch シグナルの新たな役割を明らかにすることができた。

#### 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：小脳、神経幹細胞、アストロサイト、分化、Notch

#### 1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞は自己複製能と多分化能を合わせ持つ細胞で、神経変性疾患や脳・脊髄損傷からの機能回復のための細胞移植治療においてその実用性が期待されている。成体脳で神経幹細胞がもとなりニューロン新生が起る部位は側脳室の脳室下帯 (subventricular zone: SVZ) と海馬歯状回に限局されている。一方で、大脳皮質や脊髄からも神経幹細胞様の細胞が単離できるこ

とが数多く報告されている。しかし、何故 SVZ と海馬歯状回以外の部位ではニューロン新生が起らないのか、詳しい分子機構については未だ解明されていない。

研究代表者らは幼弱 (生後 7 日前後) のマウス小脳から得られる EGF 反応性増殖細胞が、神経幹細胞としての性質を有することを見出していた。この小脳由来神経幹細胞に着目して、生後の発生過程での変化を追跡して生体内における神経幹細胞の維持機構を明らかにすることを目的に研究を開始した。また、

小脳から神経幹細胞を効率良く単離する方法の確立、小脳由来神経幹細胞の未分化性維持に働く分子機構を転写因子 Olig2 および Notch シグナルに焦点を当てて解明することを目的として研究計画を立案した。

## 2. 研究の目的

- (1) **生後発生期小脳における EGF 反応性増殖細胞の追跡**：幼弱マウス小脳より得られる神経幹細胞は EGF 依存的に増殖する。そこで、生後発生期小脳に存在する増殖細胞の日齢変化、また小脳より単離した細胞における EGF 反応性の変化について生後 7 日から成体まで解析し、EGF 反応性神経幹細胞が生体内でどの時期まで維持されているかを明らかにすることを目的とした。
- (2) **細胞表面マーカーを利用した小脳神経幹細胞の単離方法の確立**：細胞表面マーカーの発現を利用した磁気ビーズによる細胞分離法 (magnetic cell sorting: MACS) を用いて、幼弱マウス小脳に存在する EGF 反応性神経幹細胞を効率良く単離する方法を確立することを目的とした。
- (3) **神経幹細胞の未分化性を維持する分子機構の解明**：Olig2 はオリゴデンドロサイトやモーターニューロンの発生に重要な働きをする転写因子である。また、神経幹細胞の未分化性維持には細胞間相互作用により活性化する Notch シグナルが重要な役割を果たすとされていた。小脳由来 EGF 反応性神経幹細胞の未分化性維持において Olig2 および Notch シグナルの果たす役割を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) **生後発生期小脳における EGF 反応性増殖細胞の追跡**：小脳における増殖細胞をラベルするためにマウス腹腔内に BrdU を投与した。真の増殖細胞だけを評価するために、BrdU 注射 5 時間後に小脳を摘出、固定後にマイクロサライサーを用いて厚さ 50・ $\mu$ m のスライスを作製した。間接蛍光抗体法により BrdU 陽性細胞を検出、同時に増殖細胞マ-

ーカー Ki-67 に対する抗体染色による評価も行った。また、生後 7、14、21 日および成体マウスの小脳より細胞を単離、EGF 存在下で増殖する細胞の有無、増殖細胞の神経幹細胞としての性質 (自己複製能と多分化能) の有無を neurosphere assay により解析した。

- (2) **細胞表面マーカーを利用した小脳神経幹細胞の単離方法の確立**：幼弱マウス小脳より細胞を単離し、細胞表面マーカー prominin-1 マイクロビーズを用いて prominin-1 陽性、陰性群に細胞を分離し、EGF および bFGF 反応性増殖能について比較した。
- (3) **神経幹細胞の未分化性を維持する分子機構の解明**：①小脳由来神経幹細胞においてサイトカイン CNTF (ciliary neurotrophic factor) による GFAP 陽性アストロサイトへの分化過程における転写因子 Olig2 の動態を解析した。②小脳由来神経幹細胞にアデノウイルスを用いて Notch 細胞内ドメイン (Notch intracellular domain: NICD) を過剰発現させ、Notch の標的分子を RT-PCR により同定した。この細胞はサイトカイン BMP2 (bone morphogenetic protein 2) や CNTF の作用により選択的に GFAP 陽性アストロサイトへと分化する。Notch シグナルの活性化が神経幹細胞からアストロサイトへの分化にどのような影響を与えるかを、GFAP、Nestin の発現、BrdU 取り込みによる増殖能について解析を行った。

## 4. 研究成果

- (1) **生後発生に伴う EGF 反応性増殖細胞の消失**：生後 7 日のマウス小脳では外顆粒層に存在する顆粒細胞 (ニューロン) 前駆細胞以外に、バークマングリア、白質に存在する細胞 (GFAP 陽性アストロサイトを含む) において BrdU の取り込みがみられ、Ki-67 も陽性であった。しかし、生後 14 日になると Ki-67 陽性細胞はほとんどみられなかった。また、小脳より単離した細胞において EGF 依存性の増殖を調べた結果、生後 10 日前後までは EGF 反応性増殖細胞が得られ、それらが神経幹細胞の性質を持つことが明らかになった。しかしそれ以降、日齢の進んだマウス小

脳からはEGF反応性に増殖する細胞は得られなかった。以上の結果から、マウス小脳では生後1週間まではEGF反応性神経幹細胞が存在するが、生後2週までにはそれを維持する機構が失われることが示唆された。

(2) **Prominin-1 陽性細胞としての小脳由来神経幹細胞の単離**

：生後7日前後のマウス小脳より細胞を単離し、prominin-1 マイクロビーズを用いたMACS法により陽性、陰性細胞群に分離した。Prominin-1 陽性細胞群は分離に使用した細胞の1%程度と少なかったが、prominin-1 陰性細胞と比べて $10^{\sim}30$ 倍の効率でEGF反応性増殖細胞が得られることが明らかとなった。MACSを行うことで、細胞にダメージを与えることなくEGF反応性神経幹細胞を濃縮して単離することに成功した。また、幼弱マウス小脳より得られるprominin-1 陽性細胞はbFGF依存的に増殖する神経幹細胞であると報告されていた (Lee et al., 2005) が、今回得られたprominin-1 陽性細胞はbFGFではなくEGFに非常に良く反応して増殖する神経幹細胞であった。

(3) **転写因子Olig2およびNotchシグナルによる小脳由来神経幹細胞のアストロサイト分化抑制**

：①小脳由来神経幹細胞では転写因子Olig2が核内に局在する。サイトカインCNTFによるGFAP陽性アストロサイトへの分化時にはOlig2が核内から消失した。さらに、核外輸送阻害剤であるレプトマイシンBで処理した細胞ではCNTF刺激後もOlig2が核内に留まり、GFAP陽性アストロサイトへの分化が阻害された。②次に、小脳由来神経幹細胞にアデノウイルスを用いてNICDを過剰発現させた結果、Notch直接の標的因子の中で*Hes5* mRNAの顕著な発現上昇が認められた。一方、BMP2やCNTFでアストロサイトへの分化を誘導した際には、*Hes5*の発現低下がみられた。さらに、NICDを過剰発現させた細胞ではBMP2やCNTFで刺激してもGFAP陽性アストロサイトへの分化が抑制された。このときNestinの発現や増殖能、さらに*Hes5*の発現が高く維持されていた。以上の結果から、小脳由来神経幹細胞においては、Notchシグナルは*Hes5*の発現を介してアストロサイトへの分化を抑制することが示唆された。従来、

Notchシグナルは神経幹細胞を未分化状態に維持し、ニューロンやオリゴデンドロサイトへの分化は抑制する一方で、アストロサイトへの分化を促進するとされていた。今回の結果はそれとは反するものである。これは神経幹細胞としての性質を有する細胞でも、発生のどの時期にどの部位に存在する細胞かによってその分化制御におけるNotchシグナルの作用が異なることを示す成果となった。

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)

[学会発表] (計3件)

① 岡野-内田孝幸、関本研一、倉知正、磯達也、倉林正彦、齋藤繁、石崎泰樹  
(標題) Notch signaling regulates astrocyte differentiation of the EGF-responsive cells in the postnatal mouse cerebellum, BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会)、2008.12.10、神戸

② 岡野-内田孝幸、関本研一、倉知正、磯達也、倉林正彦、齋藤繁、石崎泰樹  
(標題) 幼弱マウス小脳に存在するEGF応答性細胞のアストロサイト分化におけるNotchシグナルの役割, BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会)、2007.12.12、横浜

③ 関本研一、岡野-内田孝幸、倉知正、磯達也、倉林正彦、齋藤繁、石崎泰樹  
(標題) Notchシグナルはマウス発生期小脳に存在するEGF応答性細胞のグリア細胞への分化を抑制する、Neuro2007、2007.9.10、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 孝幸 (UCHIDA TAKAYUKI)  
群馬大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：80334093

(2) 研究分担者

石崎 泰樹 (ISHIZAKI YASUKI)  
群馬大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：90183003

倉知 正 (KURACHI MASASHI)  
群馬大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：20271546

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：