

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20300129

研究課題名（和文） グリア細胞は多機能なのか？多種類なのか？

研究課題名（英文） Are astrocytes multifunctional or classified into diverse lineages?

研究代表者

鹿川 哲史（KAGAWA TETSUSHI）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：50270484

研究成果の概要（和文）：中枢神経系の主要なグリア細胞であるアストロサイトは様々な神経活動に関わる多機能な細胞集団である。しかし、個々のアストロサイトが多機能なのか、それぞれの機能に特化された多種類のアストロサイト亜細胞系譜が存在しているのか明らかでない。本研究では、後者の「アストロサイト亜細胞系譜仮説」を作業仮説として想定し、その実証を目的に遂行した。研究代表者自身が作製したグリア線維性酸性蛋白質（GFAP）遺伝子座に loxP-nlacZ-pac-loxP-GAP43GFP を挿入した GFAP/loxP レポーターマウスと、大脳皮質および海馬領域の神経幹細胞に特異的に発現する Emx1 遺伝子のプロモーター支配下に Cre リコンビナーゼ遺伝子を組み込んだ Emx1-CreKI Δneo マウスを交配し、Emx1 陽性幹細胞由来のアストロサイトを GFP で、Emx1 陰性幹細胞由来のアストロサイトを β ガラクトシダーゼで標識した。大脳皮質及び海馬領域のほぼ全てのアストロサイトが GFP 陽性を示したのに対し、脳梁周囲の正中線グリア細胞は β ガラクトシダーゼ陽性であった。正中線グリア細胞は交連線維伸長を促進する特殊な機能を有するアストロサイトである。正中線グリア細胞が近隣の大脳皮質アストロサイトとは異なる幹細胞に由来する事が明らかになったことから、各機能に特化した多種類のアストロサイト亜細胞系譜の存在を支持する結果が得られた。更に、セルソーターを応用して回収した大脳皮質アストロサイトと海馬アストロサイトに特異的に発現する遺伝子をマイクロアレイ解析し、グリア機能の脳領域特異性について考察を加えた。

研究成果の概要（英文）：In the vertebrate central nervous system (CNS), astrocytes perform multiple functions to support neural activities: including provision of nutrients to neurons, recycling of neurotransmitters and formation of blood brain barrier. In addition to their classical roles, recent studies have demonstrated that glial cells are widely involved in the regulation of synaptogenesis and synaptic activities. However, it has been poorly understood whether astrocytes can be classified into widely divergent cell lineages with their specific functions. If so, the mechanisms and timing of astrocyte sub-lineage commitments are interesting subjects. Alternatively, astrocytes may be a homogeneous cell population and adopt to change their functions according to their local environment. To challenge this question, we established a GFAP/Cre-reporter mouse line that carries the “loxP-nlacZ-loxP-GAP43GFP” cassette in glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene locus. In this mouse CNS, only a sub-lineage of astrocytes, whose ancestral progenitor cells express cre recombinase, express GAP43GFP. As a first step, the GFAP/loxP-reporter mice were crossbred with Emx1-Cre KI Δneo mice (provided by Drs. Iwasato and Itoharu) to label Emx1-positive pallial progenitors-derived astrocytes as GFP<sup>+</sup> cells. Most astrocytes in cortical plate were βGal<sup>-</sup>/GFP<sup>+</sup>, while a subpopulation of midline glia that guided corpus callosum formation were βGal<sup>+</sup>/GFP<sup>-</sup>, suggesting that functionally different cortical astrocytes and midline glia were generated from different origins. To further investigate unique functions, if any, for the cortical and hippocampal GFAP<sup>+</sup> cells, they were isolated using cell sorter and subjected for gene expression microarray analysis. Hippocampal GFAP<sup>+</sup> cells expressed several genes characteristic of neural progenitor cells and immature neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 5,600,000  | 1,680,000 | 7,280,000  |
| 2009年度 | 5,100,000  | 1,530,000 | 6,630,000  |
| 2010年度 | 4,400,000  | 1,320,000 | 5,720,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 15,100,000 | 4,530,000 | 19,630,000 |

研究分野：分子神経生物学

科研費の分科・細目：神経科学 ・ 神経化学・神経薬理学

キーワード：グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 中枢神経系の主要なグリア細胞であるアストロサイトはニューロンへの栄養補給や脳血液関門の形成、シナプス間隙の神経伝達物質の再取り込みなど古典的な機能に加え、最近の研究から、ニューロンとの tripartite シナプスを介した神経活動の制御やシナプス形成そのものを誘導する働きがあることがわかってきた。シナプスは興奮性から抑制性まで多種多様であることから、必然的に各々のシナプスを取り囲むアストロサイトの機能的相違が推察される。また、アストロサイトがシナプス形成を調節しているという事実はグリア細胞系譜が神経発生のかなり早い段階から多様に分岐していることを想像させる。しかし、これを識別する特異的細胞マーカーが見つからないため、特殊化した各グリア細胞の発生起源や脳内配置のメカニズムは明らかにされていない。

(2) 申請者は、細胞分裂の盛んなグリア前駆細胞を恒久的に標識する独自の手法を開発し、これを用いてグリア細胞の一種である大脳皮質のオリゴデンドロサイトが胎生期の脳基底核原基近傍の脳室層から特異的に発生することを示した。このことは、胎仔脳の各領域の神経幹細胞が各々異なる機能や種類のグリア細胞を産生することを示唆している。胎生期の脳皮質(Cx)と海馬領域(Hpc)には解剖学に明瞭な境界があり、Cx-type 神経幹細胞と、Hpc-type 神経幹細胞はマーカー遺伝子発現に於いて異なる性質を示す。ニューロン産生の後には、各領域の神経幹細胞は機能の異なるグリア細胞を産生するのではないかと推察し、本研究の発現に至った。

2. 研究の目的

本研究では、「アストロサイトは多種類であり、由来する神経幹細胞系譜の違いによって異なる機能を示す」という仮説を立て、その実証を目的とした。各領域の神経幹細胞由来のグリア細胞系譜を同定するために、研究代表者自身が作製した GFAP 遺伝子座に loxP-nlacZ-pac-loxP-GAP43GFP を挿入した遺伝子改変マウス (GFAP/loxP レポーターマウス) を用いた。Cre リコンビナーゼ遺伝子のドライバーとして、大脳皮質および海馬領域の神経幹細胞に特異的に発現している Emx1 遺伝子のプロモーター支配下に Cre 遺伝子を組み込んだ Emx1-CreKI Δneo マウス、および大脳基底核原基神経幹細胞由来の細胞を標識するために Olig2 遺伝子に Cre または CreER 遺伝子を組み込んだマウスを用いた。また、子宮内 DNA エレクトロポレーション法で大脳各領域の神経前駆細胞特異的に Cre 遺伝子を発現するための遺伝子プロモーターについて検討を加えた。GFAP/loxP レポーターマウスの中枢神経系において Cre を発現した神経幹細胞由来のアストロサイトは GAP43-EGFP を発現し緑色蛍光を発する。一方、Cre 非発現神経幹細胞由来のアストロサイトは β ガラクトシダーゼを発現するため X-gal 反応により青色の色素で可視化できる。これにより、Cre 発現幹細胞由来と Cre 非発現細胞由来のアストロサイトの脳内配置を検討した。また、大脳皮質アストロサイトと海馬アストロサイトを各々セルソーターで回収し、各領域のアストロサイトに特異的に発現する遺伝子をマイクロアレイ解析することによりグリア機能の領域特異性について考察を加えた。

3. 研究の方法

我々が作製した GFAP/Cre レポーターマウス

スと *Emx1*/*Cre* ノックインマウス（国立遺伝学研究所の岩里琢治博士および理化学研究所系原重美博士より供与）を交配し、ダブルトランスジェニックマウス系統を得た。ダブルトランスジェニックマウスの各発生段階より大脳の凍結切片を作成し、抗 GFAP 抗体、抗 GFP 抗体及び  $\beta$  ガラクツシダーゼ基質である X-Gal で染色した。GFP 陽性細胞および X-Gal 陽性細胞の脳内分布や各領域における GFP 陽性細胞の形態を顕微鏡下で比較観察した。

GFAP/*Cre* レポーターマウスと *Olig2*/*Cre* ノックインマウス（熊本大学の竹林浩秀博士より供与）を交配し、ダブルトランスジェニックマウス系統を得た。ダブルトランスジェニックマウスの各発生段階より大脳の凍結切片を作成し、抗 GFAP 抗体、抗 GFP 抗体及び  $\beta$  ガラクツシダーゼ基質である X-Gal で染色した。GFP 陽性細胞および X-Gal 陽性細胞の脳内分布や各領域における GFP 陽性細胞の形態を顕微鏡下で比較観察した。

生後 1 週目のダブルトランスジェニックマウス大脳皮質および海馬細胞を分散後、初代培養し、蛍光顕微鏡下で GFP 発現細胞を生観察出来ることを確認した。一週間後セルソーターを用いて GFP 陽性細胞の回収が可能であることを確認した。

生後 1 週目のダブルトランスジェニックマウス大脳皮質および海馬細胞を分散後、それぞれの GFP 陽性細胞をセルソーターで回収した。RNA を精製後、増幅し、Agilent 社の Whole Mouse Genome Array (4x44K, G4846A) を用いて発現遺伝子をマイクロアレイ解析した。

#### 4. 研究成果

マウス大脳皮質及び海馬領域の神経幹細胞由来のグリア細胞系譜を可視化するために、GFAP/*loxP* レポーターマウスと、大脳皮質および海馬領域の神経幹細胞に特異的に *Cre* を発現する *Emx1-CreKI*  $\Delta$  *neo* マウスを交配した。ダブルトランスジェニックマウスでは *Emx1* 陽性幹細胞由来のアストロサイトは GFP で、*Emx1* 陰性幹細胞由来のアストロサイトは  $\beta$  ガラクツシダーゼで標識された。生後 0、3、7 日齢及び 2 ヶ月齢のマウス大脳の凍結切片を作成し、抗 GFP 抗体及び Xgal で染色した。7 日齢および 2 ヶ月齢マウスでは大脳皮質及び海馬領域のほぼ全てのアストロサイトが GFP 陽性を示したのに対し、脳梁周囲の正中線グリア細胞は  $\beta$  ガラクツシダーゼ陽性であった（図 1）。正中線グリア細胞は交連線維伸長を促進する特異的な機能を有することが報告されている。正中線グリア細胞が近傍の大脳皮質アストロサイトとは異なる幹細胞に由来する事が明らかになったことから、「アストロサイト亜細胞系譜仮説」

を支持する結果が得られた。

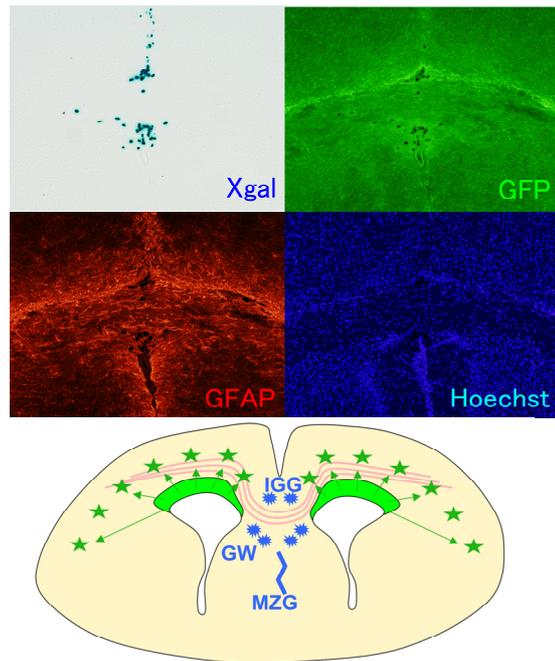


図 1 正中線グリア細胞と大脳皮質アストロサイトは異なる神経幹細胞に由来する。上段の写真は生後 7 日齢大脳に観察される Xgal 陽性正中線グリアと GFP 陽性アストロサイト

上記ダブルトランスジェニックマウスより大脳皮質アストロサイトと海馬アストロサイトを回収する手法について条件検討を重ねた。GFP の発現が最大となる生後 1 週目のマウスより摘出した大脳皮質および海馬領域を Papain および Accutase で消化することで生存率高く細胞を分散する方法を樹立した。また、酵素消化の際に生じた夾雑物は Ficoll-Paque PLUS の密度勾配遠心で除くことが出来た。得られた細胞を poly-lysine コートした培養皿に播種し、10% 牛胎仔血清を含む DF/N2 培地で 7 日間培養した後に蛍光顕微鏡下で観察するとアストロサイトが発現する GFP を live で検出することが出来た。発現 GFP を指標としてセルソーターを用いた細胞分別にも応用可能であった。

そこで、ダブルトランスジェニックマウスの大脳皮質および海馬領域由来の細胞を同等の方法で分散し、GFP 陽性細胞を直接セルソーターで分取した。RNA を回収後、増幅し、Agilent 社の Whole Mouse Genome Array (4x44K, G4846A) で発現遺伝子をマイクロアレイ解析した（図 2）。解析ソフトウェアに Agilent 社の GeneSprints を使い、サンプル間ノーマライズ、Scatter plots、発現差解析、GO 解析、ネットワーク解析を行った。

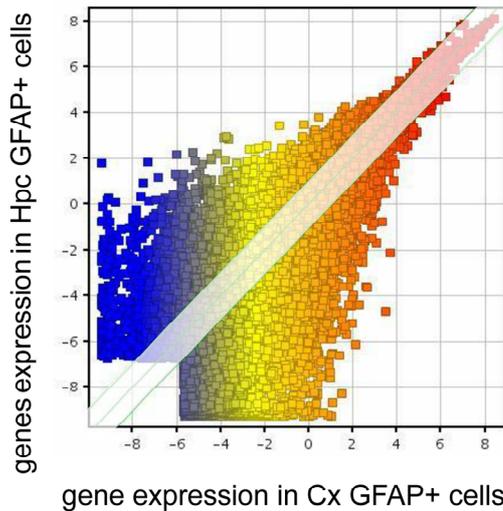


図2 大脳皮質および海馬GFAP陽性細胞の発現遺伝子のScatter Plot解析

大脳皮質と海馬領域それぞれのGFAP陽性細胞間ではGABAトランスポーターや神経成長因子遺伝子の発現量の違いが検出されたほか、特に海馬GFAP陽性細胞には神経前駆細胞や幼弱神経細胞で機能する遺伝子の発現も検出された。これまでに成体海馬神経幹細胞もGFAPを発現していることが報告されている。今回の解析で検出された遺伝子群は新たな成体神経幹細胞マーカーとなり得る点で興味深い(図3)。

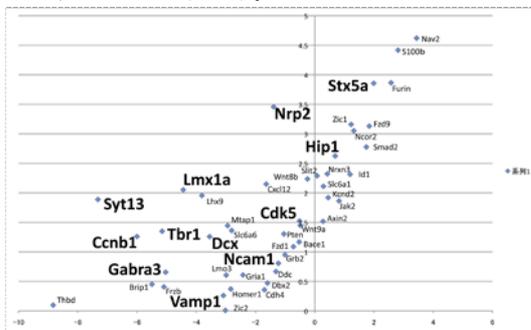


図3 海馬GFAP陽性細胞に発現する遺伝子のうち神経前駆細胞や幼弱神経細胞で機能していることが予想される遺伝子群

## 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 6件)

Yoshinaga Y, Kagawa T, Shimizu T, Inoue T, Takada S, Kuratsu J, Taga T. 2010. Wnt3a Promotes Hippocampal Neurogenesis by Shortening Cell Cycle Duration of Neural Progenitor Cells. *Cell Mol Neurobiol.* Oct;30(7):1049-58. Epub 2010 Jun 30.

(Corresponding Author).

Inoue T, Kagawa T, Inoue-Mochita M, Isono K, Ohtsu N, Nobuhisa I, Fukushima M, Tanihara H, Taga T. 2010. Involvement of the Hipk family in regulation of eyeball size, lens formation and retinal morphogenesis. *FEBS Letters.* Jul 16;584(14):3233-8. Epub 2010 Jun 19.

Shimizu T, Kagawa T\*, Inoue T, Nonaka A, Takada S, Aburatani H, Taga T\*. 2008. Stabilized b-Catenin Functions through TCF/LEF Proteins and the Notch/RBP-Jk Complex To Promote Proliferation and Suppress Differentiation of Neural Precursor Cells. *Mol Cell Biol.* 28(24):7427-7441. (\*Co-corresponding authors).

鹿川哲史、田賀哲也。Wnt・FGF・Notch シグナル相互作用による神経幹細胞自己複製の制御機構、*医学のあゆみ* 233: 10, 1032-1036, 2010

榑康一、鹿川哲史、田賀哲也。癌幹細胞の自己複製へのアプローチ、*実験医学* 28: 4, 517-524, 2010

鹿川哲史。幹細胞の挙動追跡のための子宮内胎仔への遺伝子導入法、*再生医療*、8: 3, 335-340, 2009

[学会発表] (計 16件)

Tetsushi Kagawa, Takeshi Shimizu, Kimi Araki, Naoki Takeda, Naomi Nakagata, Ikuo Nobuhisa, Tetsuya Taga (2010.9.2 -4) Analysis of glial cell sub-lineages in the developing central nervous system using GFAP/Cre-reporter mouse system 中枢神経系グリア亜集団細胞系譜のGFAP/Creレポーターマウスを用いた解析 Neuro2010 (兵庫、神戸コンベンションセンター)

鹿川哲史、田賀哲也 中枢神経系グリア亜集団細胞系譜の発生起源解析、第115回日本解剖学会総会・全国学術集会、シンポジウム発表 2010年3月29日 (岩手、岩手県民会館)

Norihisa Bizen, Toshihiro Inoue, Takeshi Shimizu, Tetsushi Kagawa, Tetsuya Taga (2010.12.7-10) Cyclin D1 inhibits astrocyte differentiation from neural stem/progenitor cells in a manner independent of cell cycle progression. 第

33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会 (兵庫、神戸コンベンションセンター)

Yasuhiro Kokubu, Yuhei Yamaguchi, Satoko Hattori, Keizo Takao, Joji Inazawa, Tsuyoshi Miyakawa, Tetsushi Kagawa, Tetsuya Taga (2010.12.7 -10) Gene expression and functional analyses of histone demethylase Gasc1 in brain. 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会 (兵庫、神戸コンベンションセンター)

備前典久、井上俊洋、清水健史、鹿川哲史、田賀哲也 (2010.9.2-4) 神経幹細胞/前駆細胞における細胞周期調節因子 cyclin D1 のアストロサイト分化抑制機構 Molecular mechanism underlying cyclin D1 mediated inhibition of astrocyte differentiation from neural stem/progenitor cells. Neuro2010 (兵庫、神戸コンベンションセンター)

Norihisa Bizen, Toshihiro Inoue, Takeshi Shimizu, Tetsushi Kagawa, Tetsuya Taga (2010.5.13-15) Molecular mechanism underlying cyclin D1 mediated inhibition of astrocyte differentiation from neural stem/progenitor cells. 第 8 回幹細胞シンポジウム(兵庫、淡路夢舞台国際会議場)

備前典久、井上俊洋、清水健史、鹿川哲史、田賀哲也 (2010.3.19-20) 神経幹細胞前駆細胞における細胞周期調節因子 Cyclin D1 のアストロサイト分化抑制機構 神経発生討論会 (愛知、岡崎カンファレンスセンター)

Taichi Kashiwagi, Tetsushi Kagawa, and Tetsuya Taga (2009.12.11) FGF signaling inhibitor Sprouty 4 contributes to neural stem cell proliferation and fate determination. The 32nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (Yokohama)

Kagawa, T., Shimizu, T., and Taga, T. (2009.8.19-23) Studies on FGF2 Signaling in Neural Precursor Cells. Myelin Development, Function and Related Diseases, 9<sup>th</sup> Biennial Satellite Meeting of International Society for Neurochemistry on Myelin Biology (TEMF Hotel, Gyeongju, Korea)

鹿川哲史、田賀哲也 中枢神経系グリア細胞亜集団の細胞系譜解析、第 52 回日本神経化

学会大会、シンポジウム発表 2009 年 6 月 22 日 (群馬、伊香保温泉ホテル天坊)

備前典久、井上俊洋、清水健史、鹿川哲史、田賀哲也 (2009.6.21-24) 神経幹細胞画分における細胞周期調節因子 cyclin D1 は細胞周期調節非依存的にアストロサイト分化を阻害する 第 52 回日本神経化学会大会 (伊香保、ホテル天坊)

Bizen, N., Inoue, T., Shimizu, T., Kagawa, T., and Taga, T. (2009.5.15-16) Cyclin D1 inhibits astrocyte differentiation from neural stem/progenitor cells in a manner independent of cell cycle regulation. The 7<sup>th</sup> Stem Cell Research Symposium (Izumi Garden Gallery, Tokyo)

鹿川哲史、清水健史、荒木喜美、竹田直樹、田賀哲也 (2008.11.8) 中枢神経系グリア細胞亜集団の発生起源解析 第 13 回グリア研究会 (東京、シェーンバッハサポー)

鹿川哲史、清水健史、荒木喜美、竹田直樹、田賀哲也 (2008.9.11-13) マウス中枢神経系グリア細胞系譜の解析 第 51 回日本神経化学会大会 (富山、富山国際会議場)

備前典久、井上俊洋、清水健史、鹿川哲史、田賀哲也 (2008.9.11-13) 神経幹細胞画分における細胞周期調節因子 cyclinD1 はアストロサイト分化を阻害する 第 51 回日本神経化学会大会 (富山、富山国際会議場)

鹿川哲史、荒木喜美、竹田直樹、清水健史、田賀哲也 (2008.5.28-30) Analysis of glial cell sub-lineages in the developing mouse central nervous system. 中枢神経系グリア細胞亜集団の発生起源解析 第 41 回日本発生活物学会大会 (徳島、徳島産業文化会館)

〔図書〕(計 1 件)

田賀哲也、鹿川哲史、清水健史、福田信治 神経系の分化、形成、再生、改訂第 3 版分子生物学イラストレイテッド、pp269-275、2009.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/scr/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鹿川 哲史 (KAGAWA TETSUSHI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教

授

研究者番号：50272484

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

柏木 太一 (KASHIWAGI TAICHI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任  
助教

研究者番号：10398232