

機関番号：17401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370089

研究課題名 (和文) 幹細胞に共通する未分化性維持の分子機構

研究課題名 (英文) Molecular mechanism that keep stem cells as a quiescent condition

研究代表者

太田 訓正 (OHTA KUNIMASA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：90244128

研究成果の概要 (和文)：

私たちは、スモール・ロイシン・リッチ・プロテオグリカンファミリーに属する Tsukushi が、細胞外領域において新たな Wnt シグナル阻害因子として機能することを見出しました。また、Tsukushi が眼の幹/前駆細胞が局在する毛様体、脳幹細胞が局在する側脳室下帯、毛の幹細胞が局在するバルジ領域に強く発現していることが明らかになりました。Tsukushi KO マウスでは、毛様体や側脳室下帯において細胞増殖が亢進していたことから、Tsukushi が眼や脳の幹/前駆細胞の増殖制御に関わるニッチ分子として機能することが示唆されました。

研究成果の概要 (英文)：

We have reported that Tsukushi, which belongs to small leucine-rich proteoglycan family, functions as a novel Wnt signaling inhibitor at the extracellular region. We found that Tsukushi is expressed in the ciliary body in the eye, the subventricular zone in the lateral ventricles, the dentate gyrus in the hippocampus. In the Tsukushi KO mouse brain, the cell proliferation in the ciliary body and the subventricular zone were increase compared to wild type brain. Our data suggested that Tsukushi functions as a niche molecule for the regulation of neural stem/progenitor cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：幹細胞, 再生医学, Tsukushi, Wnt

1. 研究開始当初の背景

私達は、レンズ由来で網膜の発生に重要な役割を持つ分子の探索を、ニワトリ胚のレンズを用いたシグナルシークエンストラップ法を行い、新規分泌型タンパク質 Tsukushi を単離しました。アフリカツメガエル胚を用い

た mRNA 微量注入法や生化学的解析により、Tsukushi が新しいタイプの BMP アンタゴニストであることを明らかにしました (Ohta et al., Dev. Cell 2004)。Tsukushi には、BMP 阻害活性が異なる Tsukushi-A と Tsukushi-B タイプが存在し、Tsukushi-A は BMP アンタゴ

ニストである chordin と共に BMP に結合し、その活性を強く阻害することを示しました。さらに、Tsukushi-B タイプは TGF- β ファミリーに属する Vg1 と相互作用して、原始線条とオーガナイザーの形成に関与することを見出しました (Ohta et al., Development 2006)。ニワトリ胚を用いた gain- and loss-of-function の実験より、Tsukushi が極めて初期の形づくりに重要な役割を持つコンポーネントであることを示しました。

アフリカツメガエル胚の神経提細胞は、正中線に発現する BMP アンタゴニストと表皮に発現する BMP の相互作用により、BMP の濃度がある閾値に達した領域に形成されると考えられてきました。アフリカツメガエル胚を用いて、mRNA 微量注入法による Tsukushi の gain- and loss-of function の実験を行った結果、神経提前駆細胞に発現している Tsukushi が BMP 濃度の微調整を行い、神経提細胞の運命決定に関与していることが明らかになりました。さらに、Tsukushi は Notch リガンドである Delta-1 と相互作用し、単なる BMP アンタゴニストではなく、シグナル伝達経路間の情報を仲介する因子であることが示唆されています (Kuriyama et al., Development 2006)。

網膜における Tsukushi の発現を調べたところ、Tsukushi が動物種を超えて網膜幹細胞が局在する領域（トリやカエルでは毛様体辺縁部、ヒトやマウスでは毛様体と呼ばれている）に発現していました。ニワトリ胚を用いた実験や生化学的解析から、Tsukushi が Wnt 受容体である Frizzled に細胞外で直接結合して、Wnt が持つ細胞増殖活性を阻害し、網膜幹細胞の細胞増殖を抑えることが明らかになりました。また、Tsukushi KO マウスでは、毛様体が大きくなっていることや sphere の大きさや数が増加することから、Tsukushi が網膜幹細胞の未分化性維持に関与していることが明らかになりつつあります (Ohta et al., under revision)。

私達は Tsukushi 遺伝子領域を LacZ 遺伝子と組み換えた Tsukushi KO マウスを、理研 CDB との共同研究で作製し、脳の切片の b-gal 染色を行ったところ、神経幹細胞が局在する成体側脳室下帯と海馬・歯状回に強い発現が見られました。また、毛包の幹細胞が局在するバルジ領域にも、Tsukushi の強い発現が観察されました。これらの領域の幹細胞の増殖・分化は Wnt シグナルによって制御されている

ことが報告されています。本申請では、神経幹細胞や毛包の幹細胞における Tsukushi の機能を明らかにすることを目標とし、その延長として、Tsukushi による幹細胞に共通した未分化性維持機構の法則や原理の確立を目指しました。

2. 研究の目的

Tsukushi は、神経幹細胞が局在する成体側脳室下帯や海馬・歯状回や、毛包の幹細胞が局在するバルジ領域において強く発現することから、これらの領域における Tsukushi のニッチ分子としての機能解析を、Tsukushi 遺伝子欠損マウスを用いた in vivo & in vitro の実験により明らかにします。これらの解析から得られた結果を基に、細胞認識などによる幹細胞の未分化性維持機構を解き明かし、多様な細胞外環境を統合的に理解したいと考えます。

成体ほ乳類の中樞神経は再生しないと考えられてきましたが、成体脳での神経幹細胞の発見や、神経幹細胞の未分化状態での培養が成功したことにより、細胞移植による中樞神経系の機能再生が現実味を帯びてきています。しかしながら、華やかな再生医療への応用とは裏腹に、神経幹細胞の未分化性維持機構については、分子レベルにおいてほとんど研究が進んでおりません。

私達が研究している Tsukushi 分子は、生物種を越えて成体網膜幹細胞を多く含む毛様体辺縁部に発現しています。Tsukushi は Wnt2b による網膜幹細胞への増殖効果を抑制しますが、それは、Tsukushi が Wnt の受容体である Frizzled に直接結合して、Wnt2b の Frizzled への結合を阻害するからです。Wnt シグナルに関する論文は 6,000 報以上報告されていますが、細胞外において Frizzled に結合し、細胞内へのシグナル伝達を遮断する分子としては、Tsukushi が世界で最初に発見された阻害因子です。これらの結果を、脳の神経幹細胞研究に応用することにより、その未分化性維持機構を解明できれば、「なぜ成体における神経幹細胞が成熟した神経ネットワークに参入することが難しいのか」という課題に回答することができ、将来の神経再生医療の基礎になると考えます。

毛包には、成長期、退行期、休止期という 3 つの毛周期があり、毛周期に応じて毛

の産生と脱毛が繰り返されています。毛乳頭は Wnt, BMP4, Shh など様々な因子を分泌して細胞の増殖・分化を制御していますが、休止期を維持する分子メカニズムは不明です。毛包における Tsukushi のニッチ分子としての機能を示せば、毛周期全体の分子制御機構を明らかにできます。

細胞外領域は、さまざまなクラスの分子が飛び交い、自由自在に影響を与え合う戦場であり、特異性こそが細胞外環境の命であると言えます。Tsukushi の分子特性として注目すべき点は、Tsukushi は、この細胞外領域において、TGF- β 経路、Notch 経路、Wnt 経路、FGF 経路に属する分子群に特異的に結合し、これらのシグナル伝達経路の相互連絡を仲介することにより、生物の発生に関与することです。Gain-of-function や Loss-of-function は、個々の遺伝子の機能を調べるには有効な実験手法ですが、生物の正常発生においては、このようなことは起こり得ません。Tsukushi の研究をとおして、細胞外領域におけるシグナル伝達制御の分子メカニズムを明らかにすることは、一見複雑で多様に見える細胞認識にもルールがあることを示し、生物の正常発生の分子メカニズムの解明に寄与すると考えます。

3. 研究の方法

(1) 神経幹細胞を用いた *in vitro* での機能解析

Tsukushi は、成体マウス脳の神経幹細胞が存在すると言われている、側脳室下帯と海馬・歯状回に強く発現しています。神経幹細胞の増殖、分化、維持における Tsukushi の役割を調べるために、本プロジェクトでは精製された神経幹細胞を培養し、その培養液中に Tsukushi や他の液生因子を様々な組み合わせで加えることにより、その影響を調べました。また、神経幹細胞の未分化性維持に寄与と言われている RNA 結合タンパク質 Musashi や bHLH 型転写因子 Hes, また神経幹細胞からニューロンに分化・成熟する段階に作用する Hu RNA 結合タンパク質などとの、相互作用を調べました。

(2) Tsukushi 遺伝子欠損マウスを用いた *in vivo* 解析 Tsukushi 遺伝子欠損マウスの脳内に BrdU を

インジェクションし、脳神経幹細胞である B 細胞の増殖を調べました。B 細胞から分化した A 細胞の増殖はマーカー分子である Mash1 抗体を用いて免疫染色を行い、Mash1 陽性細胞の数をカウントしました。C 細胞の増殖を調べるためには、マーカー分子である DCX 抗体を用いて免疫染色を行い、DCX 抗体陽性細胞の数をカウントしました。

Tsukushi は繊毛を脳室内に伸ばしている E 細胞に発現していることから、脳室表面の繊毛の形態を電子顕微鏡を用いて観察し、野生型マウスと Tsukushi KO マウスにおける形態の違いを調べました。

さらに、脳内に存在する神経回路網の形成を、様々な神経線維を認識する抗体や染色法を用いて、神経回路網形成に異常がないか調べました。

(3) 成体マウス Lac-Z 染色による Tsukushi の毛包での発現とその機能

成体 Tsukushi ヘテロマウスの Lac-Z 染色により、Tsukushi は毛包のバルジと毛乳頭と呼ばれる領域に発現していることが明らかになりました。毛包は 3 系統の細胞(上皮系細胞、色素細胞、及び、毛乳頭を形成する間葉系細胞) から構成され、それぞれが毛周期の伸展に伴い再生と細胞死を繰り返しています。個々の系統の細胞にそれぞれの幹細胞システムが存在することにより、周期的な再生が維持されています。

①毛包の様々な分子マーカーを用いて、Tsukushi を発現する細胞を同定します。また、毛包の毛周期 (21 日間) をとおした Tsukushi の発現パターンを調べました。
②Tsukushi の (+/+), (+/-), (-/-) マウスを用いて毛包の形態を調べます。
③バルジ部位の培養方法は確立しているので、Tsukushi の (+/+), (+/-), (-/-) マウス由来のバルジを培養し、細胞の分化・増殖を比較検討しました。

4. 研究成果

Tsukushi はスモール・ロイシン・リッチ・プロテオグリカンファミリーに属し、その構造の大部分を 12 個のロイシン・リッチドメインから構成されている。私達は、Tsukushi が Wnt 受容体 Frizzled4 に直接結合する新たな Wnt シグナルの阻害因子として、網膜幹/前駆細胞をそのままの状態に保持するニッチ分子として機能することを明らかにしました。また、1 個のロイシン・リッチドメインでも Frizzled4 に結合することはできるが、機能的に Wnt シグナルを抑制するためには、少な

くとも4個のロイシン・リッチドメイが必要であることを示しました (Ohta et al., under revision)。

私達の次の問題は、Tsukushiの脳神経幹細胞に対してどのような作用を持つかということです。脳神経幹細胞は、脳室に局在していることがよく知られているが、Tsukushiはこの領域に発現しており、マーカー分子を用いた免疫組織染色から、Tsukushiは脳室表面に存在する上皮細胞に発現していることが分かりました。次に、Tsukushi遺伝子欠損マウスの脳切片を作製し、観察を行ったところ、Tsukushi遺伝子欠損マウスでは、脳室が野生型と比べて約10倍拡張していました。BrdUを脳に注入して、その取り込みを調べたところ、Tsukushi遺伝子欠損マウスではBrdU陽性細胞 (B細胞) の数、Mash1陽性細胞 (C細胞) の数、DCX陽性細胞 (A細胞) の数がTsukushi KOマウスで増加していました。

私たちは、Tsukushi が動物種を超えて網膜幹・前駆細胞が局在する領域 (トリやカエルでは毛様体辺縁部、ヒトやマウスでは毛様体と呼ばれている) に発現し、その増殖をWntシグナル阻害因子として制御することが明らかにしました。また、Tsukushi は神経幹細胞が局在する成体側脳室下帯や海馬・歯状回や、毛包の幹細胞が局在するバルジ領域において強く発現しています。様々なマーカー分子を用いた免疫染色法やBrdU取り込み実験により、Tsukushi 遺伝子欠損マウスでな野生型マウスと比べて細胞の増殖が亢進していたことから、Tsukushi は神経幹細胞の増殖を制御していることが示唆されました。さらに、成体TsukushiヘテロマウスのLac-Z染色により、Tsukushiは毛の幹細胞が局在するバルジ領域と毛乳頭と呼ばれる領域に発現していることが明らかになりました。現在、毛や皮膚を傷つけ、再生時におけるTsukushiの機能解析を行っています。これらの解析結果から、Tsukushiは外胚葉由来の幹細胞の未分化性維持に関わるニッチ分子として、細胞外領域においてシグナル伝達を調節するシグナル仲介因子であることが示唆されました。

脳神経幹細胞や毛の幹細胞の増殖は様々なシグナルカスケード (Wnt、BMP、Notch など) により制御されています。今後は、Tsukushi KOの解析により明らかになった表現形が、どのシグナルカスケードの変化によ

り引き起こされたものかを解明していきます。

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 4 件)

- ① Uejima A, Anterior shift in gene expression precedes anteriormost digit formation in amniote limbs. *Dev. Growth Differ.* 査読有, Vol.52(2), 2010, 223-234
- ② Ayako Ito, Tsukushi is required for anterior commissure formation in mouse brain. *Biochemical Biophysics Research Communications.* 査読有, 402(4), 2010, 813-818
- ③ Momoko Hayashida, PC3 is involved in the shift from proliferation to differentiation and maturation in spiral ganglion neurons. *Neuroreport.* 査読有, Vol.21, No.2, 2010, 90-93.
- ④ Shahidul.MD. Islam, Draxin, a Repulsive Guidance Protein for Spinal Cord and Forebrain Commissures. *Science.* 査読有, Vol. 323. No. 5912, 2009, 388-393

[学会発表] (計 15 件)

- ① 太田訓正, Cellular and Molecular Basis for Neuro-vascular Wiring. GfE - JSDB Joint Meeting. 2011年3月23日-26日 University of Dresden (ドイツ)
- ② 太田訓正, TSUKUSHI IS NOVEL WNT INHIBITOR INVOLVED THE REGULATION OF NEURONAL STEM CELL AND ANTERIOR COMMISSURE FORMATION. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting. 2010年9月21日-25日、Cold Spring Harbor (U.S.A)
- ③ 伊藤綾子, Analysis of Tsukushi (TSK) function in the mouse brain. 第33回日本神経科学学会年会, 2010年9月2日-4日、神戸コンベンションセンター (神戸)
- ④ 太田訓正, Tsukushi is a Frizzled ligand that regulates the proliferation of neuronal stem/progenitor cells. 第43回

日本発生物学会年会, 2010年6月21日-22日、国立京都国際会館(京都)

⑤ 太田訓正, Tsukushi による網膜幹細胞／前駆細胞の未分化性維持機構, 第2回 Retina Research Meeting, 2009年12月12日、東京大学医科学研究所(東京)

⑥ 太田訓正, Tsukushi is a novel Wnt signaling inhibitor involved in ciliary body formation in mammalian eye by regulating retinal progenitor cells proliferation. Okinawa Institute of Science and Technology International Workshop. 2009年11月9日-12日、科学技術研究交流センター(沖縄)

⑦ 太田訓正, Molecular function of Tsukushi in brain. 第32回日本神経科学大会, 2009年9月16日-18日、名古屋国際会議場(名古屋)

⑧ 太田訓正, Tsukushi is Frizzled ligand that, in competition with Wnt2b, regulates the proliferation of neuronal stem/progenitor cells. 第16回国際発生物学会, 2009年9月6日-10日、エジンバラ国際会議場(イギリス)

⑨ 太田訓正, Tsukushi is Feizzled4 ligand that regulates neuronal stem cells proliferation. 第42回大会日本発生物学会, 2009年5月28日-31日、朱鷺メッセコンベンションセンター(新潟)

⑩ 太田訓正, Tsukushi is Frizzled ligand that regulates the proliferation of neuronal stem/progenitor cells. 第7回幹細胞シンポジウム, 2009年5月15日-16日、慶応義塾大学(東京)

⑪ 太田訓正, Tsukushi is a Frizzled4 ligand that regulates retinal stem/progenitor cells proliferation in competition with Wnt2b. 第23回内藤コンファレンス, 2008年11月23日、湘南国際村センター(神奈川)

⑫ 太田訓正, Tsukushiによる網膜幹／前

駆細胞の未分化性維持機構, 第1 Retina Research Meeting, 2008年11月18日、順天堂大学(東京)

⑬ 太田訓正, Tsukushiによる網膜幹細胞の未分化性維持機構, 第31回日本神経科学大会, 2008年7月9日-11日、東京国際フォーラム(東京)

⑭ 太田訓正, Tsukushiは網膜幹／前駆細胞の増殖を制御するWntシグナル阻害因子である, 日本発生物学会第41回大会, 2008年5月28日-30日、徳島県郷土文化会館(徳島)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 訓正 (OHTA KUNIMASA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：90244128