

機関番号：32203

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590196

研究課題名（和文） 中枢神経系幹細胞特異的遺伝子の機能解析

研究課題名（英文） Identification of novel genes involving in the cell-division of neural progenitor cells.

研究代表者

中舘 和彦（NAKADATE KAZUHIKO）

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80372895

研究成果の概要（和文）：

我々が既に単離同定している神経幹細胞に発現する新規遺伝子群のなかかのひとつ SE90/radmis 遺伝子について解析を進めた。in situ hybridization 解析により、radmis mRNA 発現は胎生期の脳室周囲層、および生後や成体脳の側脳室の脳室下層といった神経幹細胞が局在すると考えられる部位での発現が認められた。また特異的抗体による組織学的解析の結果、radmis タンパクは神経幹細胞の放射状細胞突起と分裂期紡錘体微小管に一過性に局在し、分裂後は速やかに後期促進複合体 APC/Cdh1 によるユビキチン化を受けてタンパクが分解され、幹細胞内から除去される可能性が示された。実際の個体レベルでの神経発生過程での radmis 遺伝子の機能を検討するため、ユビキチン化を受けないよう改変した変異型 radmis 遺伝子を作製し、子宮内電気穿孔法によりマウス胎児の脳室内へ遺伝子導入を行った。その結果、radmis 遺伝子を強制発現した神経幹細胞では分裂の亢進と細胞移動の異常が起きる事が明らかとなった。以上のデータから radmis が神経幹細胞の分裂制御に重要な働きを持つことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate the mechanism that governs the proliferative state in neural stem cells, we looked for genes that are cell-proliferation regulation, using a subtractive hybridization screening between the undifferentiated and differentiating neural stem cells populations. We report a new mitotic spindle protein named radmis that is expressed in both embryonic and adult CNS stem cells in culture, and provided evidence that radmis regulates the dynamics of the mitotic spindles and further controls neural division during cortical development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞・組織、再生医学、脳・神経、発生・分化、神経科学

1. 研究開始当初の背景

| 神経幹細胞は、多分化能と自己複製能を特徴

とする細胞で、発生過程の中枢神経系においてニューロンやグリア細胞を供給するだけでなく成体の脳の機能維持にも積極的に関与していると考えられるが、その中枢神経系での分布や、幹細胞を維持するための遺伝子発現の制御機構については依然不明な点が多い。

2. 研究の目的

我々は現在までに、suppression PCR-subtraction法により、神経幹細胞に特異的に発現する遺伝子群を同定してきた。これらの遺伝子群の中で特に新規遺伝子群に注目して、Northern blot、in situ hybridization解析を行ない、成体脳のニューロン新生が起きている部位に発現が見られる遺伝子群を同定した。このなかのひとつ SE90 遺伝子を我々はradmis (*radial fiber associated mitotic spindle protein*)と命名した。radmisの機能を明らかにすることで、どのようにして神経幹細胞が成体脳で持続的に維持されるのか、その制御機構の一端を明らかにする。また神経幹細胞の成体脳における局在、動態を明らかにするための新たなマーカー分子の確立に寄与する。

3. 研究の方法

(1) 特異的抗体により発生期胎児、成体脳の神経系でradmis陽性細胞の分布、局在を検討する。さらに成体の脳においては電顕による観察を行い、細胞種の同定を行う。さらにradmis遺伝子の神経幹細胞における機能を検討するために、神経幹細胞初代培養への遺伝子導入、生体脳への遺伝子導入、遺伝子発現抑制を行なう。以上の実験によりradmis遺伝子の神経幹細胞における機能を明らかとする。

4. 研究成果

(1) radmisは特徴的なモチーフ構造を持たない、機能的に未知の遺伝子であり、in situ hybridization解析から、そのmRNAは胎児期の脳室周囲のventricular zone (VZ) および成体脳の側脳室前角 subventricular zone (SVZ) に少数存在する神経幹細胞に強く発現していた。またNorthern blotによる解析から、神経幹細胞初代培養のニューロン、グリアへの分化により発現が消失した。

(2) radmis遺伝子産物の局在を調べるために特異的な抗体を作製し、種々の発生段階の神経系での発現パターンを免疫組織化学により検討した。その結果、radmisタンパク質は胎生期から生後、成体のnestin陽性の神経幹細胞の放射状細胞突起(radial fiber)に発現していることが明らかとなった。特に興味深いことに、radmisタンパク質は神経幹細胞が細胞分裂を行なう際の分裂期の紡錘

体に一過性に局在することが明らかとなった。さらに抗Radmis抗体を用いた免疫電顕による観察から、成体のSVZでのRadmisは超微細形態的にtype B cellと呼ばれる神経幹細胞に発現していることが示された。

(3) 培養細胞へのradmis遺伝子の強制発現の結果、分裂期の紡錘体形成が異常(monopolar spindle形成や微小管の過形成)になり、正常な細胞分裂が進行できないことが示された。

(4) 実際の生体の脳の発生過程でのradmis遺伝子の機能を調べるため、radmis遺伝子発現ベクターを子宮内電気穿孔法によりマウス胎児の脳室内へ遺伝子導入を行った。その結果、コントロール遺伝子に比べて、radmis遺伝子を過剰発現する神経幹細胞数は極めて少数であり、その発現レベルも極めて低いことが示された。本遺伝子は生体内ではユビキチン化などによる厳密な発現制御がかかっている可能性が示唆された。

(5) 生化学的解析からradmisタンパクは細胞分裂の際に、後期促進複合体APC/Cdh1(anaphase-promoting complex)によるユビキチン化を受けてタンパクが分解され、幹細胞内から除去される可能性が示された。APC/Cdh1複合体は分裂期サイクリンなどをユビキチン化することで分解し、細胞周期の分裂期を正常に脱出するために重要な因子である。このAPC/Cdh1による認識配列に変異を導入し、ユビキチン化を受けないよう改変した変異型radmis遺伝子を作製し、子宮内電気穿孔法によりマウス胎児の脳室内へ遺伝子導入を行った。その結果、正常では幹細胞分裂期の終了時には発現が消失していたradmisタンパク質の細胞内での半減期が劇的に伸び、radmis遺伝子を強制発現した神経幹細胞の分裂回数が亢進(mitotic index亢進)と細胞移動の異常が起きる事が明らかとなった。

以上のデータからradmisはAPC/Cdh1によるユビキチン化による厳密な発現制御の下、神経幹細胞の分裂期紡錘体形成を促進する働きを持つことが明らかとなった。正常な神経発生には分裂M期を過ぎた神経幹細胞内でRadmisがユビキチン化酵素APCにより速やかに分解除去される必要がある事が示された。

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)

[雑誌論文] (計10件)

① Kuwako K, Kakumoto K, Imai T, Igarashi M, Hamakubo T, Sakakibara S, Tessier-Lavigne M, OkanoHJ, and Okano H. Neural RNA-binding protein Musashil controls midline crossing of

precerebellar neurons through post-transcriptional regulation of Robo3/Rig-1 expression. *Neuron* 67:407-421 (2010) 査読有

② Ueda S, Yoshimoto K, Kadowaki T, Hirata K, and Sakakibara S. Improved learning in microencephalic rats. *Congenit. Anom.* 50:58-63 (2010) 査読有

③ 久野節二, 伊奈鮎香, 吉田さちね, 大桃秀樹, 川野道宏. 小胞性グルタミン酸トランスポーター. *生体の科学*. 61(5): 400-401 (2010) 査読有

④ Nakamura A, Kadowaki T, Sakakibara S, Yoshimoto K, Hirata K, and Ueda S. Regeneration of 5-HT fibers in hippocampal heterotopia of methylazoxymethanol-induced micrencephalic rats after neonatal 5, 7-DHT injection. *Anat. Sci. Int.* 85:38-45 (2010) 査読有

⑤ Ohmomo H, Ina A, Yoshida S, Shutoh F, Ueda S, Hisano S. Postnatal changes in expression of vesicular glutamate transporters in the main olfactory bulb of the rat. *Neuroscience*. 160:419-426 (2009) 査読有

⑥ Sakakibara S, Nakadate K, Ookawara S, and Ueda S. Non-cell autonomous impairment of oligodendrocyte differentiation precedes CNS degeneration in the Zitter rat: implications of macrophage/microglial activation in the pathogenesis. *BMC Neurosci.* 9:35 (Highly Accessed) (2008) 査読有

⑦ Sakakibara S, Nakadate K, Tanaka-Nakadate S, Yoshida K, Nogami S, Shirataki H, and Ueda S. Developmental and spatial expression pattern of alpha-taxilin in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 511:65-80 (2008) 査読有

⑧ Ueda S, Sakakibara S, Kadowaki T, Naitoh T, Hirata K, and Yoshimoto K. Chronic treatment with melatonin attenuates serotonergic degeneration in the striatum and olfactory tubercle of zitter mutant rats. *Neurosci. Lett.* 448:212-216 (2008) 査読有

⑨ Nakadate K, Sakakibara S, and Ueda S.

Attractin/mahogany protein expression in the rodent central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 508:94-111 (2008) 査読有

⑩ Konno J, Yoshida S, Ina A, Ohmomo H, Shutoh F, Nogami H, Hisano S. Upregulated expression of neuropeptide Y in hypothalamic-pituitary system of rats by chronic dexamethasone administration. *Neuroscience Research*. 60:259-265 (2008) 査読有

[学会発表] (計 13 件)

① 中舘和彦, 榊原伸一, 大桃秀樹, 江原鮎香, 上田秀一. げっ歯類脳神経核における attractin 分布の解析. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会. (2010. 3. 30) 盛岡

② 大桃秀樹, 江原鮎香, 中舘和彦, 井上健一, 上田秀一. 新生仔期脳槽内セロトニン神経毒投与による海馬歯状回の神経細胞新生への影響. 第 51 回日本組織細胞化学会総会・学術集会. (2010. 9. 4) 秋葉原

③ 大桃秀樹, 上田秀一. 新生仔期セロトニン神経破壊がおよぼす adult neurogenesis への影響 -セロトニン仮説の再考-. 第 9 回生体脳のニューロン新生懇談会. (2010. 11. 27) 新宿

④ Sakakibara S. Identification of novel genes expressed in the neural progenitor/CNS stem cells. Center for Neuropharmacology & Neuroscience Symposium of Albany Medical College. (2009. 4. 29) Albany

⑤ 中舘和彦, 門脇太郎, 中村新, 榊原伸一, 大桃秀樹, 江原鮎香, 上田秀一. 進行性神経変性疾患モデル動物 (Zitter ラット) 黒質におけるミクログリアの解析. 第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会. (2009. 3. 28) 岡山

⑥ 大桃秀樹, 江原鮎香, 中舘和彦, 榊原伸一, 久野節二, 上田秀一. ラット主嗅球における小胞性グルタミン酸輸送体の発達変化. 第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会. (2009. 3. 28) 岡山

⑦ 上田秀一, 江原鮎香, 大桃秀樹, 中舘和彦, 榊原伸一, 吉本寛司. 選択的神経毒の新生仔期髄液内投与後における再生セロトニン線維の特性. 第 50 回日本組織細胞化学会総会学術集会. (2009. 9. 27) 大津

⑧ 中舘和彦, 大桃秀樹, 江原鮎香, 榊原伸

二, 上田秀一. Zitterラットの進行性黒質ドーパミン神経変性におけるミクログリアの関与. 第 50 回日本組織細胞化学会総会学術集会. (2009. 9. 27) 大津

⑨ 中舘和彦. 階層性と多様性の問題への挑戦. 脳科学最前線 2009. (2009. 11. 25) 前橋

⑩ 上田秀一, 榊原伸一, 中舘和彦. Zitterミュータントラット黒質におけるドーパミンニューロンの細胞死. 第 31 回日本神経科学大会. (2008. 7. 11) 東京

⑪ 中舘和彦, 榊原伸一, 大桃秀樹, 江原鮎香, 上田秀一. 進行性神経変性に関与するMahogunin Ring Finger 1 (Mgrn1)のラット中枢神経系における分布解析. 第 49 回日本組織細胞化学会総会・学術集会. (2008. 10. 5) 長崎

⑫ 江原鮎香, 中舘和彦, 上田秀一. Zitter ratにおけるFluoro-Jade C(FJC)を用いた神経変性解析の有用性. 第 49 回日本組織細胞化学会総会・学術集会. (2008. 10. 5) 長崎

⑬ 大桃秀樹, 江原鮎香, 中舘和彦, 久野節二, 上田秀一. ラット主嗅球における小胞性グルタミン酸輸送体 1 (VGLUT1)とVGLUT2の発達. 日本解剖学会関東支部第 96 回学術集会. (2008. 11. 22) つくば

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中舘 和彦 (NAKADATE KAZUHIKO)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80372895

(2) 研究分担者

大桃 秀樹 (OHMOMO HIDEKI)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：9045346

榊原 伸一 (SAKAKIBARA SHIN-ICHI)

早稲田大学・人間科学学術院・教授

研究者番号：70337369