

機関番号：13201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590381

研究課題名 (和文) 神経幹細胞分化を誘導する血小板由来増殖因子の機能解明

研究課題名 (英文) Functional analysis of PDGF inducing neural stem cell differentiation.

研究代表者

石井 陽子 (ISHII YOKO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・准教授

研究者番号：00361949

研究成果の概要 (和文)：血小板由来増殖因子 β 受容体 (PDGFR- β) conditional knockout 神経幹細胞は、細胞死が増加し、増殖能が低下した。また、PDGF-BB および bFGF 刺激に反応する遊走能、神経細胞への分化能が減少した。bFGF は、PDGFR- β promoter 活性を増加させ、PDGFR- β のリン酸化蛋白質の発現を増加させた。PDGFR- β は神経幹細胞の survival に必要で、bFGF の遊走と神経細胞の分化に与える影響は PDGFR- β の誘導を介する可能性が示唆された。PDGFR- β conditional knockout mouse は、control mouse と比較して中大脳動脈閉塞による虚血病変が大きく機能回復が遅延し、Astroglial scar 形成が低下した。PDGFR- β signaling は、病変部の血管成熟と glial scar 形成に関与し、脳虚血後の組織修復と機能回復に重要であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：PDGFR- β knockout neural stem cells showed a higher rate of apoptosis and significant decrease in proliferation. They demonstrated reduced capacities of migration and neuronal differentiation in response to not only PDGF-BB but also bFGF. bFGF increased the activity of the PDGFR- β promoter as well as the expression and phosphorylation of PDGFR- β . PDGFR- β is needed for survival, and the effects of bFGF in migration and neural differentiation of the cells may be potentiated by induction of PDGFR- β . PDGFR- β knockout mice exhibited delayed recovery of body weight and behavior, as well as a larger infarction volume after middle cerebral artery occlusion (MCAO) than controls. Astroglial scar formation was less in PDGFR- β knockout mice than in controls. These data suggest that PDGFR- β signaling is crucial for endogenous tissue repair and functional recovery following cerebral ischemia by vascular maturation and glial scar formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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・実験病理学

キーワード：細胞・血小板由来増殖因子・神経幹細胞・細胞分化

1. 研究開始当初の背景

成体神経幹細胞は、側脳室脳室下帯(SVZ)と海馬歯状回顆粒細胞下層(SGZ)に認められる。この2つの領域はNicheと呼ばれ、成体においても胎児期中枢神経の環境(micro-environment)を維持することにより、生後も新生神経細胞を供給している。我々はPDGF-Bおよびその受容体PDGFR-βが、脳で最も豊富に発現することを発見して以来、一貫してPDGFが神経賦活因子として作用する独自の仮説に基づく研究を推進してきた。今回新生仔から成体までのmouseのSVZにPDGFR-βが、強く発現することを見だし、神経栄養因子と血管新生因子の両方の作用をもつPDGFがNicheの環境維持と新生神経細胞の生存に重要な役割を果たすのではないかとこの着想に至った。本研究は、Nicheの制御機構におけるPDGFおよびPDGFR-βの役割を解明することにより、生後の神経細胞新生を誘導する新しい増殖因子の応用の可能性を模索するものである。

2. 研究の目的

血小板増殖因子PDGFおよびその受容体が中枢神経ニッチ(Niche)の環境維持と、神経幹細胞の分化、遊走、生存に重要な役割を果たすことを、独自に開発したCre-loxP systemを用いたPDGF β受容体(PDGFR-β)のconditional knockout mouseを用いて明らかにする。また、関連するシグナルを解析することにより、Nicheの制御機構解明に寄与し、中枢神経再生における新しい増殖因子の応用の可能性を提示する。

3. 研究の方法

研究材料としてPDGFR-β conditional knockout mouseとコントロールマウスを用い、in vivoとin vitroの両側面からの比較検討により、Nicheの環境維持と神経幹細胞に対するPDGFとPDGFR-βの機能を明らかにする。

(1) 非傷害脳および傷害後脳のSVZにおけるPDGFとPDGFR-βの機能評価

非傷害脳および傷害後脳のSVZの神経幹細胞の分化、遊走、生存を、形態学、遺伝子発現、タンパク質解析等で比較検討することにより、Nicheにおけるneurogenesisに対するPDGFとPDGFR-βの機能を明らかにする。傷害モデルとしては、主として中大脳動脈閉塞による脳虚血を検討する。

(2) 培養神経幹細胞の増殖と分化におけるPDGFとPDGFR-βの機能評価

非傷害脳および傷害後脳のSVZより分離培養した神経幹細胞について、増殖能、分化能を比較検討し、cDNAマイクロアレイ等の網羅的解析により発現する関連因子の差異を調べる。

4. 研究成果

(1) 非傷害脳および傷害後脳のSVZにおけるPDGFとPDGFR-βの機能評価

Nesti-Cre PDGFR-β conditional knockout mouseにおける免疫組織化学的検討では、非傷害脳においては、PDGFR-β conditional knockout mouseでSVZの神経幹細胞および遊走神経細胞数に有意な差異は認められなかった。Nesti-Cre PDGFR-β conditional knockout mouse (胎児期中枢神経特異的にknockout)およびESR-Cre PDGFR-β conditional knockout mouse (生後にタモキシフェン投与により全身でknockout)において中大脳動脈閉塞による脳虚血を誘導した。いずれのタイプのknockout mouseも、コントロールと比較してPDGFR-β conditional knockout mouseで優位に大きく、特にESR-Cre PDGFR-β conditional knockout mouse治療遅延も観察された。治療遅延の主な原因としてはpericyteのcoverageによる血管成熟の低下、glial scar形成の低下と判断された。脳虚血後のSVZにおける神経細胞新生の差異については検討中である。

(2) 培養神経幹細胞の増殖と分化におけるPDGFとPDGFR-βの機能評価

血小板由来増殖因子β受容体(PDGFR-β) conditional knockout神経幹細胞は、細胞死が増加し、増殖能が低下した。また、PDGF-BBおよびbFGF刺激に反応する遊走能、神経細胞への分化能が減少した。さらにPDGFR kinase阻害剤STI571は、コントロール神経幹細胞においてもbFGFの効果を阻害した。bFGFは、PDGFR-β promoter活性を増加させ、PDGFR-βのリン酸化蛋白質の発現も増加させた。これらはPDGFとFGFとのシグナリングの近似現象を示唆するものである。PDGFR-βは神経幹細胞のサバイバルに必要で、bFGFの遊走と神経細胞の分化に与える影響はPDGFR-βの誘導を介する可能性が示唆された。さらに、RT-PCR arrayを用いた網羅的な関連遺伝子解析においては、PDGFR-β conditional knockout神経幹細胞において、BDNFおよびbFGFの減少が見られた。PDGF/PDGFR-βは、神経幹細胞の生存に重要とされるbFGF、神経細胞への分化と成熟に重要とされるBDNFとのsynergisticな作用、あるいはこれらの因子の発現の制御に関与することにより、神経幹細胞の生存と分化に関与する可能性が考えられた。PDGFR-β conditional knockout mouseおよびコントロールマウスのそれぞれから新生仔の神経細胞を分離培養し、過酸化水素を用いた酸化ストレスを加え、生存能や生存に関するシグナルを検討した。PDGFR-β conditional knockout神経細胞は、酸化ストレスに対し、脆弱性を示し、そのシグナルにはPI3K/AKT, MAPKが重要であることが明らかとなった。脳虚血後の

SVZ より分離した神経幹細胞については検討中である。

我々は、独自に PDGFR- β conditional knockout mouse を開発することにより、生後個体において PDGFR- β および PDGF 関連経路全体を遮断した状態の解析を可能とした。本研究は中枢神経再生における PDGF の役割解明という包括的かつ独創的な研究と考えられる。

神経幹細胞において、初めて bFGF との相互作用を証明した。今後はその関連 signaling を解明することにより、中枢神経再生において増殖因子を中心とした分子基盤の一翼を解き明かすことができると考えられる。さらに、今回確立した脳虚血誘導実験に治療実験を加えることにより、新しい増殖因子の応用の可能性が提示でき、中枢神経系の再生研究に貢献することが期待される。

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. Nakagawa T, Izumino K, Ishii Y, Oya T, Hamashima T, Shen J, Ishizawa S, Tomoda F, Fujimori T, Nabeshima Y, Inoue H, Sasahara M. Roles of PDGF receptor-beta in the structure and function of postnatal kidney glomerulus. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 査読有, Vol. 26, 2010, pp458-468.
2. Dong XY, Sun X, Guo P, Li Q, Sasahara M, Ishii Y, Dong JT. ATBF1 inhibits ER function by selectively competing with AIB1 for binding to ER in ER-positive breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 査読有, Vol. 112, 2010, pp32801-32809.
3. Zheng L, Ishii Y, Tokunaga A, Hamashima T, Shen J, Zhao QL, Ishizawa S, Fujimori T, Nabeshima Y, Mori H, Kondo T, Sasahara M. Neuroprotective effects of PDGF against involved. *J Neurosci Res.* 査読有, Vol. 88, 2010, pp1273-1284.
4. Ohi Y, Ishii Y, Sasahara M, Haji A. Involvement of Platelet-Derived Growth Factor-BB and Its Receptor-beta in Hypoxia-Induced Depression of Excitatory Synaptic Transmission in the Nucleus Tractus Solitarius of Mice. *J Pharmacol Sci.* 査読有, Vol. 112, 2010, pp477-481.
5. Yamazaki T, Sabit H, Oya T, Ishii Y, Hamashima T, Tokunaga A, Ishizawa S, Jie S, Kurashige Y, Matsushima T, Furuta I, Noguchi M, Sasahara M. Activation of MAP kinases, Akt and PDGF receptors in injured peripheral

nerves. *J Peripher Nerv Syst.* 査読有, Vol. 14, 2009, pp165-176.

6. Doshi M, Kuwatori Y, Ishii Y, Sasahara M, Hirashima Y. Hypothermia during ischemia protects against neuronal death but not acute brain edema following transient forebrain ischemia in mice. *Biol Pharm Bull.* 査読有, Vol. 32, 2009, pp1957-1961.
7. Takasawa A, Kato I, Takasawa K, Ishii Y, Yoshida T, Shehata MH, Kawaguchi H, Mohafez OMM, Sasahara M, and Hiraga K. Mutation-, aging-, and gene-dosage-dependent accumulation of FENIB-type neuroserpin (G392E) in ERs and lysosomes of neurons in transgenic mice. 査読有, Vol. 283, 2008, pp35606-35613.
8. Kato I, Oya T, Suzuki H, Takasawa K, Ichsan AM, Nakada S, Ishii Y, Shimada Y, Sasahara M, Tobe K, Takasawa S, Okamoto H, and Hiraga K. A novel model of insulin-dependent diabetes with renal and retinal lesions by transgenic expression of CaMK IIalpha (Thr286Asp) in pancreatic beta-cells. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 査読有, Vol. 24, 2008, pp486-497.
9. Tokunaga A, Oya T, Ishii Y, Motomura H, Nakamura C, Ishizawa S, Fujimori T, Nabeshima Y, Umezawa A, Kanamori M, Kimura T, and Sasahara M. PDGF receptor β is a potent regulator of mesenchymal stromal cell function. *J. Bone Miner. Res.* 査読有, Vol. 23, 2008, pp1519-1528.
10. Ishii Y, Matsumoto Y, Watanabe R, Elmi M, Fujimori T, Nissen J, Cao Y, Nabeshima Y, Sasahara M, and Funa K. Characterization of neuroprogenitor cells expressing the PDGF β -receptor within the subventricular zone of postnatal mice. *Mol. Cell. Neurosci.* 査読有, Vol. 37, 2008, pp507-518.

[学会発表] (計 13 件)

1. Nguyen PTH, Hori E, Zhao J, Li R, Urakawa S, Uwano T, Hamashima T, Ishii Y, Matsushima T, Sasahara M, Ono T, Nishijo H. Conditional depletion of PDGF- β receptor gene in the central nervous system induced deficits in higher brain functions in mice. 第 57 回中部日本生理学会, 2010, 10, 15-16, 豊明.
2. 申 杰, 石井陽子, 徐 桂華, 石澤 伸, 濱島 丈, 倉茂洋一, 松島貴子, 笹原正清. マウス局所脳虚血後の修復過程を正に制御する因子としての PDGFR- β の役割. 2010, 4, 27-29, 東京.
3. Shen J, Ishii Y, Xu G, Hamashima T, Matsushima T, Yamamoto S, Takatsuru Y, Nabekura J, Sasahara M. The Involvement of

- PDGFR- β in the Maturation of Blood Vessel after Focal Cerebral Ischemia. The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience, 2010, 9, 2-4, Kobe.
4. Nakagawa N, Ichikawa K, Yamazaki H, Hamashima T, Shen J, Ishii Y, Tomoda F, Inoue H, Sasahara M. Impaired Glomerular Adaptability Against Subtotal Nephrectomy after Conditional Knock-Out of Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR)- β in Mice. The American Society of Nephrology, Renal Week 2010, 2010, 11, 16-21, Denver, CO.
 5. Sasahara M, Ishii Y, Shen J, Hamashima T. Neurovascular signaling of PDGF receptor beta protects CNS from insults, a study using conditional knockout mouse. BIT'S 1st Annual World Congress of NeuroTalk 2010, 2010, 6, 25-28, Singapore.
 6. Shen J, Ishii Y, Hamashima T, Sasahara M. The Role for PDGFR-s as a Positive Regulator of Vessels Maturation after Focal Cerebral Ischemia in Mice. BIT'S 1st Annual World Congress of NeuroTalk 2010, 2010, 6, 25-28, Singapore.
 7. 山崎隆志, 石井陽子, 濱島丈, 石澤伸, 尾矢剛志, Sabit H., 徐桂華, 松島貴子, 笹原正清. 末梢神経の再生における PDGF 受容体および細胞シグナル活性化の解析. 第 98 回日本病理学会総会, 2009, 5, 1-3, 京都.
 8. 笹原正清, 鄭蓮順, 石井陽子, 濱島丈, 申杰, 徐桂華, 石澤伸. Cultured neuron deficit in PDGFR- β vulnerable to oxidative stress. 第 98 回日本病理学会総会, 2009, 5, 1-3, 京都.
 9. Nakagawa T., Izumino K, Tokunaga A, Ishii Y, Oya T, Hamashima T, Shen J, Ishizawa S, Tomoda F., Inoue H., Fujimori T., Nabeshima Y. and Sasahara M. Roles of PDGFR- β in the postnatal kidney glomerulus. ASN (American Society of Nephrology) Renal Week 2009, 2009, 10, 27-11, San Diego, CA.
 10. Ishii Y, Funa K, and Sasahara M. Role of PDGF β -receptor signaling in the neurogenesis of postnatal mouse brain. The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2008, 7, 9-11, Tokyo.
 11. Zheng L, Ishii Y, Hamashima T, Shen J, Ishizawa S., and Sasahara M. Cultured neuron deficit in PDGF receptor is vulnerable to oxidative stress. The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2008, 7, 9-11, Tokyo.
 12. 徳永綾乃, 尾矢剛志, 石井陽子, 石澤伸, 濱島丈, 藤森俊彦, 鍋島陽一, 梅澤明弘, 笹原正清. PDGF Receptor β is a Potent

Regulator of Mesenchymal Stromal Cell Function. 第 97 回日本病理学会総会, 2008, 5, 15-17, 金沢.

13. 石井陽子, 鮎 恵子, 笹原正清. 神経幹細胞分化における PDGFR- β の役割の検討. 第 97 回日本病理学会総会, 2008, 5, 15-17, 金沢.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/pathol2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 陽子 (ISHII YOKO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・准教授

研究者番号：00361949

(2) 研究分担者

笹原 正清 (SASAHARA MASAKIYO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・教授

研究者番号：20154015

高崎 一郎 (TAKASAKI ICHIRO)

富山大学・生命科学センター・助教

研究者番号：00397176