

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300115

研究課題名（和文）神経幹細胞の増殖と分化を制御する脂肪酸および脂肪酸結合タンパク質の機能解析

研究課題名（英文）Roles of fatty acids and fatty acid binding proteins for regulating proliferation and differentiation of neural stem cells

研究代表者

大隅 典子 (OSUMI NORIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00220343

研究成果の概要（和文）：

野生型の胎仔ラット胎仔に由来する神経幹細胞を用いてニューロスフェア培養を行い、アラキドン酸（ARA）またはドコサヘキサエン酸（DHA）が神経幹細胞の増殖・分化に与える影響について解析した結果、ARA や DHA は神経幹細胞の増殖や分化を制御し、発生の段階に応じて異なる役割を担うことが示された（Sakayori et al., 2011）。また同様のスフェア培養実験から、脂肪酸結合タンパク質 Fabp7 が神経幹細胞の増殖と分化の制御に関わることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Neurosphere assays using neural stem cells (NSCs) derived from the wild type rat embryo revealed that arachidonic acid (ARA) and docosahexanoic acid (DHA) regulate proliferation and differentiation of NSCs in a stage-dependent manner (Sakayori et al., 2011). From neurosphere assays using NSCs derived from mice deficient for fatty acid binding protein 7 (Fabp7), it is shown that Fabp7 is required for proliferation and differentiation of NSCs (in prep).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2010 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：神経発生学、幹細胞生物学、脂質生物学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：神経幹細胞、高度不飽和脂肪酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸、脂肪酸結合タンパク質、細胞増殖、細胞分化

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の神経新生は、胎生期の中枢神経系でしか見られないと従来考えられてきた。しかしながら近年、海馬歯状回の顆粒細胞下層と側脳室の脳室下帯には神経幹細胞が存在し、新たなニューロンが一生産され、神経回路に組み込まれていることが明らかになった。また、加齢や様々な疾患に伴う生後脳

における神経新生の増減も確認されており（Ming and Song, 2005）、神経新生という現象の生理的意義に注目が集まっている。

我々はこれまで、中枢神経系の発生のごく初期から特異的に発現し、マスターコントロール因子として脳形成の様々な現象に関わっている転写因子 Pax6 に着目して研究を進めてきた。特に Pax6 遺伝子に変異を有する

自然発症変異ラット (*rSey*²) の表現型解析等を通じて、Pax6 が大脳皮質層形成、嗅球の形成、神経管腹側神経細胞の特異化、嗅皮質ニューロンの移動など、神経系の重要な発生事象に関わることを明らかにした (Osumi, 2001; Osumi et al., 2008)。

この過程において、我々は Pax6 の下流因子として脂肪酸結合タンパク質 FABP7 を見いだした (Arai et al., 2005)。FABP7 は胎生期の前脳 (Arai et al., 2005)、生後脳の海馬歯状回顆粒細胞下層 (Kurtz et al., 1994)、側脳室脳室下帯において発現が認められ、さらに *Fabp7* のノックアウトマウスにおける神経新生の解析により、海馬での神経幹細胞・神経前駆細胞の数の減少、増殖能の低下が確認された (Watanabe et al., 2007)。すなわち、脂肪酸結合タンパク質 FABP7 は神経幹細胞の増殖維持に必須であることを見出した。

一方、脳内において多量に存在する脂肪酸 ARA および DHA が神経幹細胞の増殖と分化において重要な役割を担っている可能性が推測された。そこで、FABP7 に結合しうる高度不飽和脂肪酸である ARA および DHA を含む餌をラットに食べさせたところ、ARA 投与により生後海馬での神経新生が有意に向上した (Maekawa et al., 2010)。

加えて我々は、FABP7 と同じ FABP ファミリーの分子である FABP5 についても、生後脳の海馬歯状回顆粒細胞下層において発現を確認し、より未分化な神経幹細胞/早期前駆細胞では FABP7 が、後期前駆細胞では FABP5 が発現していることを見出した (Matsumata et al., 2012)。また、さらに、FABP5 は脂溶性ビタミン代謝産物であるレチノイン酸 (RA) と結合し、核内受容体型転写因子 PPAR β /d に RA を受け渡し、細胞死の抑制に関わることが報告されている (Schug et al., 2007)。これらのことから、神経幹細胞では、まず FABP7 が ARA を介して増殖を促進し、発生が進むにつれて FABP5 が DHA を介して分化を促進するようになるという仮説が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 神経幹細胞のモデル細胞株、(2) 胎仔ラット由来の神経幹細胞、(3) 生後ラット由来の神経幹細胞、(4) ヒト iPS 細胞由来の神経幹細胞に、*in vitro* においてアラキドン酸 (ARA) またはドコサヘキサエン酸 (DHA) を添加し、増殖能と分化能を評価することにより、これらの脂肪酸の神経幹細胞への影響を解析する。さらに (5) *Fabp5*, *Fabp7*, およびその両方のノックアウトマウス由来の神経幹細胞の脂肪酸添加時における遺伝子発現解析を行い、脂肪酸が神経幹細胞に与える影響について、さらに詳細な分子メカニズムについて解析することを目的と

する。

3. 研究の方法

【脂肪酸による増殖・分化解析】

(1) MEB5 細胞を用いた脂肪酸添加実験

ARA および DHA が神経幹細胞に与える影響を解析するため、まず E14.5 マウス前脳由来の神経幹細胞株である MEB5 (Nakagaito et al., 1998) を用いて、脂肪酸添加実験を行う。

① MEB5 細胞における脂肪酸の増殖促進・抑制効果の解析

② MEB5 細胞を用いた脂肪酸の分化促進・抑制効果の解析

(2) 胎仔ラットに由来するニューロスフェアを用いた脂肪酸添加実験

MEB5 細胞を用いた実験は樹立された神経幹細胞株を用いたものであるが、胎仔脳の初代培養細胞においても ARA および DHA が神経新生に与える影響を検証するため、胎仔ラットの大脳皮質原基から神経幹細胞・神経前駆細胞を選択培養し (Reynolds et al., 1992)、脂肪酸添加による細胞の増殖能・分化能の変化を解析する。

【脂肪酸の作用機序解析】

(3) 脂肪酸添加による FABP7 および FABP5 の発現解析

前述のように、ARA や DHA は FABP7 のリガンドとして働く可能性がある。さらに生後マウスの海馬歯状回顆粒細胞層における神経幹細胞/前駆細胞には、FABP7 だけではなく FABP5 も発現している。そこで、ARA および DHA が神経幹細胞に作用するメカニズムを解析するために、まずこれらの脂肪酸が添加されたときの、FABP7 および FABP5 の発現の変化を解析する。

(4) 脂肪酸添加による FABP7、FABP5、核内受容体型転写因子の定量解析

前述の実験で脂肪酸添加時における FABP7 と FABP5 の細胞内局在解析を行うが、さらに詳細に発現を解析するため、ここでは Western blot を用いた定量解析を行う。さらにその下流で働くと想定される核内受容体型転写因子 (Schug et al., 2007) についても定量解析を行う。

【脂肪酸による増殖・分化解析】

(5) 生後ラット海馬由来のニューロスフェアを用いた脂肪酸添加実験

続いて生後脳においても脂肪酸が神経新生に同様の影響を与えるかどうかを検証するため、生後脳から神経幹細胞・神経前駆細胞を選択培養し (Reynolds and Weiss, 1992)、脂肪酸添加による細胞の増殖能・分化能の変化を解析する。

(6) ヒト iPS 細胞に由来するニューロスフェアを用いた脂肪酸添加実験

これまでの実験はマウス由来の細胞株、およびラットの神経幹細胞を用いたものであり、ヒトの神経幹細胞・神経前駆細胞でも同様の反応を示すかどうかは定かではない。そこでヒト由来の iPS 細胞 (Takahashi et al., 2007) を神経幹細胞・神経前駆細胞へ誘導させ、脂肪酸添加による細胞の増殖能・分化能の変化を解析する。

なお、ヒト iPS 細胞からニューロスフェアへの誘導は未だ報告されていないが、iPS 細胞は ES 細胞と似た性質を持つことから、ES 細胞からニューロスフェアへの誘導法 (Tropepe et al., 2001) を参考に実験を行う。

【脂肪酸の作用機序解析】

(7) ノックアウトマウスを用いた、脂肪酸添加によるニューロスフェアの解析

神経幹細胞の初期においては ARA が FABP7 を介して増殖を亢進し、後に DHA が FABP5 を介して分化を亢進するという可能性を検証するために、野生型 C57BL/6 マウス、*Fabp7*、*Fabp5*、その両方のノックアウトマウス由来のニューロスフェアを用いて脂肪酸を添加し、神経幹細胞の増殖や分化に対する影響や、脂肪酸添加により発現が変化する遺伝子の解析を行う。

4. 研究成果

【研究成果】

(1) MEB5 細胞を用いた脂肪酸添加実験

ARA および DHA が神経幹細胞に与える影響を解析するため、マウス前脳由来の神経幹細胞株 MEB5 を用いた培養系を立ち上げてみた。しかしながら、結果が安定せず、むしろ次に述べるニューロスフェア系がうまく確立できたので、この系を用いた脂肪酸添加実験の計画は中止した。

(2) 胎仔ラットに由来するニューロスフェアを用いた脂肪酸添加実験

E14.5 ラット胎仔大脳新皮質原基に由来する神経幹細胞のニューロスフェアアッセイ系を確立することができた。この選択培養アッセイ系を用いて、脂肪酸添加による神経幹細胞の増殖・分化・生存への影響を解析した。継代数の少ない神経幹細胞は主に神経細胞に分化し、継代数の多い神経幹細胞は主にアストロサイトへ分化した。それぞれの神経幹細胞に対し ARA または DHA を添加することにより、これらの脂肪酸が神経幹細胞の増殖と分化に与える影響について解析した。主に神経細胞に分化する発生初期の神経幹細胞においては、ARA、DHA ともにその増殖を亢進した。一方で神経細胞やアストロサイトへの分

化に対しては効果を持たなかった。主にアストロサイトへ分化する発生後期の神経幹細胞においては、DHA はその増殖を亢進したものの、ARA は増殖に対しては効果を持たなかった。一方、分化に関しては、ARA はアストロサイトへの分化を、DHA は神経細胞への分化を亢進した。これらの結果から、ARA や DHA は直接的に神経幹細胞の増殖や分化を制御し、発生の段階に応じて異なる役割を担うことが示された。この研究成果は *Genes to Cells* という査読性のある国際誌に発表した (Sakayori et al., 2011)。

(3) 脂肪酸添加による FABP7 および FABP5 の発現解析

ニューロスフェアアッセイ系において FABP7 および FABP5 の免疫染色を行うことはできたが、DHA や ARA 添加により、脂肪酸結合タンパク質が細胞質から核内に移行する様子について、うまく判定できる実験系にはならなかった。こちらに関しては、今後、COS 細胞株等を用いた実験系を立ち上げる方が良いと考えられる。

(4) 脂肪酸添加による FABP7、FABP5、核内受容体型転写因子の定量解析

スフェアの収量の関係により、残念ながら定量的な解析ができなかった。この点に関しては、最近 Western blotting 技術の向上がみられたので、今後は解析可能と思われる。

(5) 生後ラット海馬由来のニューロスフェアを用いた脂肪酸添加実験

生後の海馬歯状回由来の神経幹細胞の培養系の確立を試みたが、これまでの報告 (Seaberg and van der Kooy, 2002) 通り、その培養は困難であった。そこで、生理学研究所 (当時) の等博士に技術指導を頂き、側脳室下帯由来の神経幹細胞および胎生期海馬原基由来神経幹細胞の培養系の確立を試みた。これらの神経幹細胞からは多くの一次スフェアが形成され、また分化アッセイも可能であることがわかった。残念ながら、研究期間内には脂肪酸添加実験を行うところまでは到達できなかったが、今後、これらの実験を行う見通しが立った。

(6) ヒト iPS 細胞に由来するニューロスフェアを用いた脂肪酸添加実験

震災の影響もあり、本実験は行うことができなかった。なお、この研究期間終了直後に、マウス皮膚細胞から iPS 細胞を経ずに直接、ニューロスフェアを効率良く作製する技術について報告されたことから (Matsui et al., *Stem Cells*, 2012)、ヒト神経幹細胞への脂肪酸添加実験に関しては、このような培養系を取り入れる方が良いと考えられる。

(7) ノックアウトマウスを用いた、脂肪酸添加によるニューロスフェアの解析

Fabp7 遺伝子ノックアウトマウス胎仔大脳新皮質原基由来の神経幹細胞を用い、ニューロスフェアアッセイを行った。その結果、*Fabp7* の発現がまったく無い神経幹細胞では、野生型に比して著しく一次スフェアの形成数が減少することがわかった。また、DHA を添加すると、低濃度では若干、一次スフェア形成数が増加したため、*Fabp7* 以外の脂肪酸結合タンパク質が機能していることが伺われた。

上記(4)と同様の理由により、*Fabp5* や *Fabp3*、その他、PPAR 等の発現に関する定量解析はできなかった。その代わりに、我々が神経幹細胞の維持や分化を制御することをラット海馬で証明した *rSey*^{fl} 胎仔の大脳新皮質原基に由来する神経幹細胞を用いて、増殖と分化に対する影響を解析した。その結果、*rSey*^{fl} 胎仔大脳新皮質原基に由来する神経幹細胞では、*Pax6* タンパク質の発現量が 50.3% に低下していることを Western blotting により明らかにした。*Pax6* 変異ヘテロ接合神経幹細胞は、一次スフェアの形成数は野生型の 9 割程度であるが、継代を減るごとに減少し、五次スフェアを用いたアッセイでは約 60% にまで低下した。また、分化の様態について解析を行うと、継代を経たスフェアにおいて、GFAP 陽性のアストロサイトへの分化が更新していることが分かった(投稿準備中)。

【研究の意義】

今回我々はニューロスフェア法を用いて、神経幹細胞の増殖能および種々の神経系細胞への分化能を制御する分子メカニズムの一旦を明らかにした。とくに、ARA や DHA という、脳に大量に存在する脂質が神経幹細胞の増殖や分化に影響を与えることや、脂肪酸結合タンパク質がその作用を介在することは、栄養素という環境因子が脳内の神経新生に与える影響を考える上で、重要な知見と考えられる。

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 14 件)

- (1) Matsumoto, Y., Tsunekawa, Y., Nomura, T., Suto, F., Matsumata, M., Tsuchiya, S., and Osumi, N. : Differential Proliferation Rhythm of Neural Progenitor and Oligodendrocyte Precursor Cells in the Young Adult Hippocampus. *PLoS ONE*. 6(11), e27628, 2011. 査読有
- (2) Sakayori, N., Maekawa, M., Numayama-Tsuruta, K., Katura, T., Mori, T. and Osumi, N. : Distinctive effects of arachidonic

acid and docosahexaenoic acid on neural stem/progenitor cells. *Genes Cells*. 16(7), 778-790, 2011. 査読有

- (3) Maekawa, M., Iwayama, Y., Watanabe, A., Nozaki, Y., Ohnishi, T., Ohba, H., Toyoshima, M., Hamazaki, K., Osumi, N., Aruga, J. and Yoshikawa, T. : Excessive ingestion of long-chain polyunsaturated fatty acids during developmental stage causes strain- and sex-dependent eye abnormalities in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 402(2), 431-437, 2010. 査読有
 - (4) Hara, Y., Nomura, T., Yoshizaki, K., Jonas Frisen, J., and Osumi, N. : Impaired hippocampal neurogenesis and vascular formation in ephrin-A5-deficient mice. *Stem Cells*. 28(5), 974-983, 2010. 査読有
 - (5) Maekawa, M., Iwayama, Y., Arai, R., Nakamura, K., Ohnishi, T., Toyota, T., Tsujii, M., Okazaki, Y., Osumi, N., Owada, Y., Mori, N. and Yoshikawa, T. : Polymorphism screening of brain-expressed FABPs7, 5 and 3 genes and association studies in autism and schizophrenia in Japanese subjects. *J Hum Genet*. 55(2), 127-130, 2010. 査読有
 - (6) Maekawa, M., Iwayama, Y., Nakamura, K., Sato, M., Toyota, T., Ohnishi, T., Yamada, K., Miyachi, T., Tsujii, M., Hattori, E., Maekawa, N., Osumi, N., Mori, N. and Yoshikawa, T. : A novel missense mutation (Leu46Val) of PAX6 found in an autistic patient. *Neurosci Lett*. 462(3), 267-271, 2009. 査読有
 - (7) Maekawa, M., Takashima, N., Matsumata, M., Ikegami, S., Kontani, M., Hara, Y., Kawashima, H., Owada, Y., Kiso, Y., Yoshikawa, T., Inokuchi, K. and Osumi, N. : Arachidonic acid drives postnatal neurogenesis and elicits a beneficial effect on prepulse inhibition, a biological trait of psychiatric illnesses. *PLoS One* 4(4), e5085, 2009. 査読有
- [学会発表] (計 30 件)
- (1) Osumi, N. Impact of postnatal and adult neurogenesis on animal behavior: The 3rd International Conference on Cognitive Neurodynamics, 2011 年 6 月 12 日, 北海道・ニセコ
 - (2) Osumi, N. : Neurogenesis - Its implication in and application for mental diseases. Cold Spring Harbor Asia Francis Crick Neurobiology Symposium 2011 年 4 月 17 日, 中国・蘇州
 - (3) 酒寄信幸、前川素子、松股美穂、沼山恵

- 子、若松義雄、大隅典子：神経系前駆細胞の増殖と分化に対するアラキドン酸とドコサヘキサエン酸の効果の解析。第33回日本分子生物学会大会 2010年12月10日，神戸
- (4) Sakayori, N., Maekawa, M., Numayama-Tsuruta, K. and Osumi, N. : The effects of arachidonic acid and docosahexaenoic acid on neural stem/progenitor cells. Society of Neuroscience 40th Annual Meeting, Neuroscience 2010, 2010年11月14日, San Diego, CA, USA
- (5) 大隅典子：脂肪酸シグナルと神経新生～精神疾患病態への関与。第18回日本精神行動遺伝医学会，2010年9月18日，仙台
- (6) Matsumata, M., Maekawa, M., Arime, Y., Owada, Y., Sora, I., Yoshikawa, T. and Osumi, N. : The role of FABPs in postnatal hippocampal neurogenesis and function. 第33回日本神経科学大会 Neuro2010, 2010年9月2日，神戸
- (7) 松股美穂、前川素子、有銘預世布、大和田祐二、曾良一郎、吉川武男、大隅典子：成体マウス海馬の神経新生及び機能における脂肪酸結合タンパク質 FABP の役割。日本分子生物学会第10回 春期シンポジウム，2010年6月7日，松島
- (8) Osumi, N. : The effects of arachidonic acid and docosahexaenoic acid on neural stem/progenitor cells. 9th Conference of the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL), 2010年5月31日, Maastricht, Netherlands
- (9) Osumi, N. : Fatty acid signals in neurogenesis: for potential prevention and treatment of psychiatric diseases. Adult Neurogenesis: Structure and Function, 2010年5月28日, Frauenchiemsee, Germany
- (10) 酒寄信幸、大隅典子：神経系前駆細胞におけるアラキドン酸とドコサヘキサエン酸の効果の解析。第8回幹細胞シンポジウム，2010年5月13日，淡路島
- (11) 酒寄信幸、沼山恵子、大隅典子：神経系前駆細胞の増殖と分化におけるアラキドン酸とドコサヘキサエン酸の効果の解析，第32回日本神経科学大会，2009年9月17日，名古屋
- (12) Osumi N. : Roles of fatty acid binding proteins and polyunsaturated fatty acids in hippocampal neurogenesis. 16th International Society of Developmental Biologists Congress 2009, 2009年9月8日, Edinburgh, UK

- (13) Osumi, N. : Fatty acid signals in neurogenesis : for potential prevention and treatment of psychiatric diseases. Neurogenesis 2009 Hippocampal neurogenesis: Its implication in neural functions and mental diseases. 2009年6月2日，淡路

〔図書〕（計7件）

- (1) Osumi, N. and Nannan, G. Impaired Neurogenesis as a Risk Factor for Schizophrenia and Related Mental Diseases . Neurogenesis in the Adult Brain II (Eds. Tatsunori, S., Kazunobu, S., Jack M. Parent and Arturo Alvarez-Buylla), Springer. 109-131, 2011

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dev-neurobio.med.tohoku.ac.jp/en/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大隅 典子 (OSUMI NORIKO)
 東北大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：00220343

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：