

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31日現在

機関番号：34504

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791761

研究課題名（和文） Sox6 遺伝子導入による不死化神経幹細胞の作製と中枢神経系再生への応用

研究課題名（英文） Production of immortalized neuronal stem cells by Sox6-transfection and application to reproduction of a central nervous system

研究代表者

濱田 美知子（Michiko Hamada-Kanazawa）

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：10248106

研究成果の概要（和文）：Sox6 は神経前駆細胞だけでなく、神経幹細胞に対しても、生存率の増加と神経細胞への分化を促進する働きを持つことが分かった。特に神経幹細胞の生存は、胚発生期の早い段階では、他の Sox ファミリーのメンバーで補完出来るが、発生後期の神経幹細胞で Sox6 をノックダウンすると、著しい低下が見られ、この時期の神経幹細胞の生存に Sox6 が中心的に働いていることが分かった。また、Sox6 が神経幹細胞の生存、および神経細胞への分化を促進する効果を仲介する標的遺伝子の候補が見つかった。

研究成果の概要（英文）：Sox6 promotes the increase in the probability of survival, and the differentiation to neuron not only in neuroblast but also in neural stem cells. Especially, survival of a neural stem cell derived early stage of neurogenesis can be complemented with the member of other Sox family, but Survival remarkably decreased by Sox6 is knocked down in a neural stem cell derived later stage of neurogenesis. It suggested that Sox6 is mainly factor for survival of the neural stem cell of this stage. Further, we found some candidates of target genes of Sox6, that promote survival and neural differentiation of neural stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：神経化学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：神経幹細胞、Sox6、apoptosis

1. 研究開始当初の背景

Sox6 はマウス性決定因子 Sry の関連因子として発見された Sox 転写因子ファミリーのメンバーである。Sox ファミリーは性決定を始め、様々な組織の分化に重要な働きをもつ。近年、Sox6 は軟骨組織の分化に関連していることがいくつかのグループによって明らか

かにされてきた。しかし、Sox6 の発現の主な発現部位が、軟骨組織ではなく胎生期の中枢神経系であるにも関わらず、中枢神経系の発達における Sox6 の役割の研究は殆ど行われていない。

我々は本遺伝子の神経細胞分化における役割に注目し、レチノイン酸（以下 RA）で

神経分化を誘導できる胚性腫瘍細胞 P19 (以下 P19) が、Sox6 過剰発現によって神経細胞へ特異的に分化を起こすこと、RA による分化誘導時に Sox6 を発現抑制すると、RA 依存的に著しい Apoptosis を引き起こすことを見出した。

これらの結果は Sox6 が神経前駆細胞の分化と生存を制御する因子である可能性を示唆している。

本遺伝子発現抑制 P19 細胞で RA 依存的な Apoptosis が起こっていることから、in vivo での神経細胞の発生の際に観察される Apoptosis が本遺伝子によって調節されている可能性が考えられ、このメカニズムを解明することは細胞が Apoptosis へ向かうか、分化へ向かうかの運命を決定するメカニズムに迫ることできる。また、神経変性疾患の脳に対する神経幹細胞の移植療法は今まで様々な検討が行われてきたが、依然、成熟動物の脳での神経幹細胞の生存率と神経細胞への分化効率の低さが課題として残されたままである。本遺伝子の過剰発現によって神経細胞にのみ特異的に分化すること、細胞の生存が維持されることなどから、神経再生医療への応用できる可能性が高い。

2. 研究の目的

神経幹細胞を用い、Sox6 が神経幹細胞の分化と生存を制御するメカニズムについて明らかにすることを目的とする。Sox6 が、どの遺伝子の転写の変化が神経前駆細胞の神経細胞特異的な分化を引き起こすのか、また、生存の制御をどのようなメカニズムで行っているのかについて検討する。さらに、これらの研究成果を応用する可能性についても検討する。特に Sox6 の過剰発現神経前駆細胞は生存率が高く、且つグリア細胞には分化せず神経細胞特異的に分化する特徴を持つことから、移植材料として利用できるか、検討を行う。

3. 研究の方法

[1] マウス胎仔由来神経幹細胞の培養

12日胚、14日胚、17日胚からマウス胎仔由来神経幹細胞を採取し、無血清培地で培養した。常法に基づき、浮遊培養で神経幹細胞を維持し、接着培養で EGF を除いた培地で培養することにより神経細胞へ分化させた。また、接着培養で 2% ウシ胎仔血清を含む培地で培養することによりグリア細胞へ分化させた。

[2] Sox6 過剰発現細胞の作成

GFP-Sox6 vector を神経幹細胞に導入して、Sox6 過剰発現細胞を作成し、Sox6 の発現を GFP で可視化した。

[3] Sox6 発現抑制細胞の作成

pSingle-tTS-shRNA ベクターを用いて、

Sox6-siRNA を薬剤で発現誘導する系を確立した。この系で、Sox6 の mRNA レベルは siRNA によって、90%以上抑制された。

[4] 細胞の分化の評価

神経幹細胞の未分化能は、Sphere 形成能、未分化マーカーの発現、継代後の多分化能の有無によって評価した。

神経細胞への分化は、突起伸展、神経特異的マーカーの発現によって評価した。

グリア細胞への分化は、細胞の形態とグリア細胞特異的マーカーの発現によって評価した。

[5] Sox6 の標的遺伝子の検索

RT-PCR 法によって、既知の分化関連遺伝子の発現を調べ、Sox6 過剰発現細胞で発現が増加する遺伝子のうち、Sox6 発現抑制細胞で発現量が顕著に減少する遺伝子、Sox6 過剰発現細胞で発現量が少なく、Sox6 発現抑制細胞で発現量が顕著に増加する遺伝子を検索した。

[6] Sox6 の標的遺伝子転写活性化の検討

Sox6 の標的遺伝子への結合は、ゲルシフト法と ChIP 法によって、転写活性についてはルシフェラーゼによるレポーター遺伝子分析によって測定した。

[7] Sox6 のパートナー因子の検索

Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System を用いて、神経幹細胞で Sox6 のパートナー因子を検索した。

[8] Apoptosis の評価

Apoptosis は初期では Annexin-V 染色によって評価した。カスパーゼ-3, 8, 9 の活性の上昇や DNA の断片化、クロマチンの凝縮像の観察も行った。

4. 研究成果

私は、Sox6 が神経幹細胞の分化と生存を制御するメカニズムについて明らかにするために、Sox6 の標的遺伝子を検索した。その結果、いくつかの候補遺伝子が明らかとなった。またその一つである Wnt-1 について、詳細に検討して、以下の結果を得た。Wnt-1 promoter へ Sox6 が直接結合した。Gel shift assay によって、Wnt-1 promoter に少なくとも 2カ所の Sox6 結合領域が存在することが分かった。またこれら 2つの結合部位について、細胞内クロマチンへの結合を ChIP assay によって確認した。Sox6 は Wnt-1 promoter を活性化した。Wnt-1 promoter をもつルシフェラーゼベクターを用いた reporter gene assay の結果、Sox6 は Wnt-1 promoter を活性化した。

次に Wnt-1 が Sox6 が神経幹細胞の分化と生存を制御するメカニズムのどこに関わっているかを明らかにするために、Sox6 抑制による影響を Wnt-1 によって回復出来るかどうか検討した。その結果 Sox6 抑制による細胞死は、Wnt-1 の overexpression により殆ど

影響がなかったこと。 Sox6 抑制による神経細胞およびグリア細胞分化の抑制は、Wnt-1 の overexpression により著しく回復したことが分かった。即ち Wnt-1 は Sox6 の下流で神経系への分化に関連し、生存には余り関与しないのではないかと示唆された。

次に、Sox6 が神経幹細胞の分化と生存を制御するメカニズムについて明らかにするために、マウス胚由来神経幹細胞 (NSC) とマウス胚性幹 (ES) 細胞で、Sox6 の過剰発現と発現抑制による神経細胞への分化及び生存を検討した。Sox ファミリーの発現が異なる 14 日胚 (E14) と 17 日胚 (E17) 由来 NSC を用いた。即ち、E14NSC では、Sox1, Sox2, Sox6 が発現しているが、E17NSC では、Sox6 が主で、他は発現量が顕著に低下している。また、我々の系では、E14NSC では、分化誘導した時、殆どが神経細胞へ分化し、グリア細胞の出現率が著しく低い、E17NSC では、神経細胞に遅れてグリア細胞も高頻度で出現する。E14NSC では、Sox1, Sox2, あるいは Sox6 の発現抑制だけでは細胞の生存率は少し減少したが、Sox2 と Sox6 のダブルノックダウンによって、著しい細胞死が起こった。このとき、細胞は Annexin-V で染色され、DNA の断片化も検出されたことから、Apoptosis だと考えられた。また、E14NSC での Sox6 の過剰発現は、神経細胞への分化までの時間を短縮し、分化した細胞数も有意に増加させた。E17NSC では、Sox6 のノックダウンによって、著しい細胞死が見られ、Sox6 の過剰発現で、神経細胞への分化までの時間の短縮と、グリア細胞への分化を減少させた。マウス ES 細胞では、Sox6 は殆ど発現しておらず、SDIA 法によって神経細胞へ分化誘導した時に、Sox6 の発現が増加した。このとき、Sox6 を過剰発現すると、神経細胞へ分化するまでの時間が短縮されたが、分化後、やはり早い段階で胚様体の崩壊が見られた。また SDIA 法で神経細胞へ分化誘導した ES 細胞で、Sox6 をノックダウンすると、著しい細胞死が起こり、神経細胞へ分化する細胞の割合が低下した。

また、神経幹細胞と ES 細胞の両方でおこる Sox6 発現抑制による細胞死について、詳細に検討した。Sox6 発現抑制時、活性酸素が上昇し、細胞の過酸化が起こっていることが観察された。また、NO 発生基質によってこの Apoptosis は増悪された。

さらに、Sox6 が神経幹細胞の分化と生存を制御するメカニズムについて明らかにするために、Sox6 の標的遺伝子を検索した。その結果、遺伝子 A, B, C の 3 つの候補遺伝子を同定し、過剰発現、RNAi によって発現抑制実験を行い、その役割について検討した。

遺伝子 A の発現抑制により、Sox6 による神経細胞への分化が抑制されること、遺伝子 A

の発現を戻すことで、神経細胞への分化が回復することなどから、Sox6 による神経細胞への分化が、遺伝子 A によって仲介されている可能性が示唆された。

しかし、遺伝子 A による細胞生存率への影響はなかった。

遺伝子 B は過剰発現させることで細胞の生存率が減少し、逆に RNAi 法によって発現抑制することで、神経幹細胞の生存率が増加した。またその結果として神経幹細胞から神経細胞への分化が促進された。

遺伝子 C は過剰発現することで、細胞の生存率が増加し、逆に RNAi 法によって発現抑制することで細胞の Apoptosis が観察された。

Sox6 は Leu-Zipper タンパクであり他の分子と複合体を作って働くと考えられている。精巣では Sox6 のパートナーとなる分子 Solt が発見されたが、中枢神経系では未知である。Sox6 の作用メカニズムを明確にするためにもパートナー分子の同定が必要である。そこでイーストツーハイブリッド法によって神経幹細胞での Sox6 のパートナー分子の検索を行った。また、神経幹細胞での Sox6 と共に働く分子の検索を行い、その候補遺伝子として 6 つの遺伝子を同定した。それぞれが Sox6 と結合することがわかった。転写活性を変化させるかどうかについては今後の検討課題である。

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 3 件)

濱田美知子 (1 番目)、三宅正治 他 3 名
-Citryl-L-glutamate acts as an iron carrier to activate aconitase activity.
Biological and Pharmaceutical Bulletin 査読有り、34(9) 2011、1455-64.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.34.1455>
檜原正則、濱田美知子 (2 番目)、三宅正治 他 2 名

Superoxide scavenging and xanthine oxidase inhibiting activities of copper- β -citryl-L-glutamate complex.
Biological and Pharmaceutical Bulletin 査読有り、33(12) 2010、1938-1943

DOI: <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.33.1938>
濱田美知子 (1 番目)、甲田真紀子、三宅正治 他 5 名

-Citryl-L-glutamate Is an Endogenous Iron Chelator That Occurs Naturally in the Developing Brain
Biological and Pharmaceutical Bulletin 査読有り、33(5) 2010、729-737

DOI: <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.33.729>

[学会発表](計6件)

濱田美知子 胚性腫瘍細胞 P19 の神経分化における Sox6 の標的遺伝子の検索、日本薬学会近畿支部大会、2011年10月22日 神戸学院大学

中道 絢子 神経幹細胞の神経分化における Sox6 の役割、日本薬学会近畿支部大会、2011年10月22日 神戸学院大学

高橋 壺里紗 胚性幹細胞の神経分化における Sox6 の役割、日本薬学会近畿支部大会、2011年10月22日 神戸学院大学

濱田美知子 The mechanism of survival by Sox6 during differentiation of neural stem cell. 日本分子生物学会 2010年12月10日 神戸国際会議場

濱田美知子 胚性腫瘍細胞 P19 の神経分化における Sox6 とその標的遺伝子 Wnt-1 の働き 日本薬学会第130年会 2010年3月30日 岡山総合体育館

濱田美知子 Sox6 promote neuronal differentiation in mouse neuronal stem cells. 日本分子生物学会 2009年12月9日 パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 美知子 (Michiko Hamada-Kanazawa)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：10248106