

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 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500316

研究課題名（和文） NG2 細胞のジェノサイドによる *in vivo* 機能解析研究課題名（英文） *in vivo* analysis of NG2+ cells

研究代表者

森 徹自 (MORI TETSUJI)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：30285043

研究成果の概要（和文）：コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの一つである NG2 を発現する細胞（NG2 細胞）は、詳細な機能は不明であるが、*in vitro* 実験系では多分化能を有すると考えられている。本研究では、*in vivo* における NG2 細胞の機能解析を行った。NG2 細胞の特徴として、ニューロンの過剰興奮に反応して分裂増殖が亢進するという特徴を持つ。てんかんモデル動物を用いて、細胞周期の進行の観点から、脳室下帯や海馬に存在する内在性神経幹・前駆細胞との比較を行ったところ、それぞれ異なる反応性を示すことが判明した。

研究成果の概要（英文）：NG2 is one of chondroitin sulfate proteoglycans. NG2+ cells are abundant in the adult brain. The function of NG2+ cells is not clear, but it is suggested that NG2+ cells can be multi-potent in *in vitro* culture system. In this study, I analyzed the function of NG2+ cells *in vivo*. Because previous studies show that excessive neuronal excitation induce proliferation of NG2+ cells, I analyzed and compared responses of NG2+ cells and endogenous neural stem/precursors against neuronal excitation in the seizure model mice. Present study showed that these precursors exhibit differential responses in terms of cell cycle progression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：NG2 細胞、神経幹・前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの一つである NG2 を発現する細胞（NG2 細胞）は、哺乳類の中樞神経系において、成獣哺乳類の脳内では最大約 10% を占めると言われる。NG2 細胞は、従来から知られるアストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアと

は異なる「第 4 のグリア」とも呼ばれている。NG2 細胞は、その発見の歴史は浅く、機能解析は不十分であり、謎が多い細胞である。これまでに分かっていた点は、以下の 4 点である。

（1） マーカー分子の発現などから、オリゴデンドロサイト前駆細胞であると考えら

れてきたが、ニューロンやアストロサイトへの分化能をも有する事が in vitro 実験から示されていた。

(2) in vivo では、損傷時に NG2 細胞は分裂が促進され、反応性アストロサイトへと分化する事で、「通常の」アストロサイトと共にグリア瘢痕形成に関与する事が示されていた。

(3) ニューロンの過剰興奮（脳表面に塩化カリウム溶液の滴下）に反応して NG2 細胞の増殖性が顕著に上昇する事が、申請者の所属研究室から報告されていた。

(4) 申請者は、正常の成獣終脳皮質内でもくわずかではあるが、恒常的に分裂増殖している細胞のうち、ほぼ全てが NG2 細胞であることを、組織学的手技を用いて証明していた。

2. 研究の目的

In vitro 実験系、および脳損傷時の in vivo における NG2 細胞の挙動については、若干の解析が報告されていたが、正常状態の in vivo における機能、そしてニューロンの興奮性と NG2 細胞の増殖性との関係は謎であった。本研究では、主に以下の 2 点の項目について研究を進めた。

(1) 発生・遺伝子工学を応用して考案した手技により、NG2 細胞特異的かつ非侵襲的に脳内の特定領域から除去する実験系（ジェノサイド）を確立する。形態学的解析を主としつつ、多角的な解析を行う事で、in vivo における NG2 細胞の機能を解明する事を目的とした。

(2) 前述の通り、NG2 細胞は、in vitro 実験から、多分化能を持った神経幹・前駆細胞としての性質を持つことが示されていた。また、成獣脳における内在性の神経幹・前駆細胞は、ニューロンの過剰興奮を原因とする病態であるてんかん発作後に増殖が亢進する事が示されていた。ニューロンの過剰興奮という現象を軸に、NG2 細胞と内在性神経幹・前駆細胞との共通点、および相違点を検討した。

3. 研究の方法

解析には ICR マウスを用いた。

(1) NG2 細胞のジェノサイド実験系の確立

正常脳内において、恒常的に分裂増殖している細胞のほぼ全てが NG2 細胞であることに注目した。胎児脳に対して、電気穿孔法により普遍的プロモーター制御下にチミジンキナーゼを発現させるプラスミドを導入する。その際にトランスポゾンシステムを用いて、放射状グリア（胎生期の神経幹細胞）由来細胞

のゲノムに安定的にベクターを組み込む。放射状グリア由来細胞（ニューロン、グリア）のうち、分裂増殖する NG2 細胞を特異的に除去するために、ガンシクロビルを投与する事で、分裂細胞を特異的に除去する実験系の確立を目指した（図 1）。

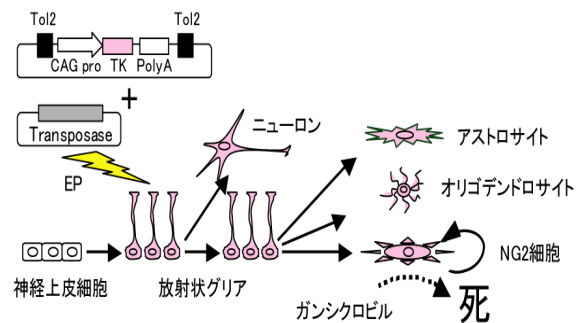


図 1 ジェノサイドによる NG2 細胞の除去

(2) ニューロンの過剰興奮と前駆細胞の反応

正常状態では、分裂増殖する NG2 細胞は僅かである。より多くの NG2 細胞を除去する目的で、てんかん発作モデル動物を用いた。モデル動物作成には、GABA-A 受容体拮抗薬である pentylenetetrazole (PTZ) の腹腔内投与により作成した。また、てんかんモデル動物を用いて、内在性神経幹・前駆細胞と NG2 細胞の反応に関して、BrdU や IdU（共にチミジン類似体）投与による S 期細胞の標識と、細胞周期マーカーとの二重免疫染色により、細胞周期の進行という観点に注目して比較検討した。

4. 研究成果

(1) NG2 細胞のジェノサイドについて
予備実験として、胎児脳に普遍的プロモーター制御下に GFP を発現するトランスポゾンプラスミドを電気穿孔法で導入して、導入効率などを検討した。その結果、放射状グリア由来細胞のうち、ニューロンでは成獣期においても安定的な GFP 発現を検出した。しかし、放射状グリア自身、および NG2 細胞を含むグリア系細胞では、長期実験系においては GFP 発現をほとんど検出する事が出来なかった。NG2 細胞は CNPase など、オリゴデンドロサイト前駆細胞と共通のマーカー分子を発現する。複数の普遍的プロモーターに加えて、CNPase など数種類のオリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカー分子のプロモーターを検討したが、いずれも NG2 細胞を含めたグリア系細胞では GFP 発現を検出する事は出来なかった。電気穿孔法に替えて、成獣脳に対して様々なプロモーター制御下に GFP を発現するレンチウイルスを注入し、NG2 細胞を標識する事を

試みた。レンチウイルスシステムでも、やはり NG2 細胞を含むグリア系細胞を標識する事は出来なかった。

これらの結果から、グリア系細胞は外来の遺伝子プロモーターを不活性化させる能力が高いことが示唆された。内在性の成獣神経幹・前駆細胞は、マーカー分子の発現から、特殊なアストロサイトであるとされている。NG2 細胞も多分化能を持つ細胞として、類似の性質を持つ可能性が示唆された。

(2) ニューロンの過剰興奮に対する前駆細胞の反応

内在性の成獣神経幹・前駆細胞は、脳室下帯 (SVZ) と海馬歯状回に存在する。てんかんモデル動物では、一過性に内在性神経幹・前駆細胞の分裂が促進されることが報告されている。この分野の研究は、海馬での解析が非常に進んでいるが、脳室下帯についての解析はほとんど無い。更に、重積てんかんモデル動物のような、非常に激しい刺激に対する反応を解析した研究がほとんどである。PTZ 投与によるてんかんモデル動物では、一過性の発作が誘発される、比較的マイルドなモデル動物である。SVZ および海馬の神経幹・前駆細胞では、PTZ 単回投与後それぞれ 20 時間後および 3 日後に有意な分裂促進を検出したが、NG2 細胞は変化がなかった。

PTZ 単回投与後の急性期における SVZ 神経幹・前駆細胞の細胞周期の進行を、BrdU と G2/M 期のマーカーである PH3 (リン酸化ヒストン H3) の二重免疫染色により検討した。BrdU 標識された S 期の細胞が G2/M 期に入る割合を、経時的に計算する事で、細胞周期の速度を求めることができる。その結果、PTZ 投与直後の 2 時間では、細胞周期の進行が一過性に遅れることが分かった。その後、細胞周期が 1 回転する間 (約 17 時間) に、通常速度に戻ることが分かった (図 2)。このような現象は海馬では検出されなかった。

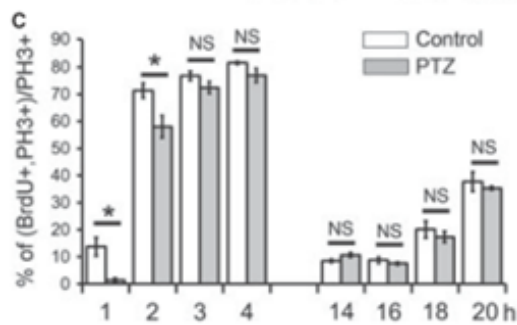


図 2 PTZ 単回投与による SVZ 神経幹・前駆細胞の細胞周期解析

SVZ の神経幹・前駆細胞は、嗅球に移動して成熟ニューロンに分化する。PTZ 単回投与による長期的な影響を、産生細胞の数と種類について組織学的に検討したが、影響はなかった。

これらの事から、成獣脳の内在性神経幹・前駆細胞は、それぞれニューロンの過剰興奮に対する反応性が異なることが示唆された。NG2 細胞は、SVZ や海馬よりも強いニューロンの興奮が必要である。反応性の違いは、それぞれの細胞自身、あるいは細胞を取り巻く環境の違いによるものと考えられる。

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 6 件)

- ① Iseki K, Hagino S, Nikaido T, Zhang Y, Mori T, Yokoya S, Hozumi Y, Goto K, Wanaka A, Tase C
Gliosis-specific transcription factor OASIS coincides with proteoglycan core protein genes in the glial scar and inhibits neurite outgrowth.
Biomed Res, 33(6):345-353, 2012. 12
<http://dx.doi.org/10.2220/biomedres.33.345>
- ② Mori T, Wakabayashi T, Hirahara Y, Takamori Y, Koike T, Kurokawa K, Yamada H.
Differential responses of endogenous adult mouse neural precursors to excess neuronal excitation.
Eur J Neurosci, 36(9):3184-3193, 2012. 11
DOI: 10.1111/j.1460-9568.2012.08244.x.
- ③ Wakabayashi T, Kosaka J, Mori T, Yamada H
Prolonged Expression of Puma in Cholinergic Amacrine Cells During the Development of Rat Retina.
J Histochem Cytochem, 60(10):777-788, 2012. 10
DOI: 10.1369/0022155412452737
- ④ Iseki K, Hagino S, Zhang Y, Mori T, Sato N, Yokoya S, Hozumi Y, Goto K, Tase C
Altered expression pattern of testican-1 mRNA after brain injury.
Biomed Res, 32(6):373-378, 2011. 12
<http://dx.doi.org/10.2220/biomedres.32.373>
- ⑤ Wakabayashi T, Mori T, Hirahara Y, Koike T, Kubota Y, Takamori Y, Yamada H
Nuclear lamins are differentially expressed in retinal neurons of the adult rat retina.
Histochem Cell Biol, 136(4):427-436, 2011. 10

- DOI: 10.1007/s00418-011-0853-8.
- ⑥ Wakabayashi T, Kosaka J, Mochii M, Miki Y, Mori T, Takamori Y, Yamada H
C38, equivalent to BM88, is developmentally expressed in maturing retinal neurons and enhances neuronal maturation.
J Neurochem, 112(5):1235-1248, 2010. 1
DOI:
10.1111/j.1471-4159.2009.06536.x.
[学会発表] (計 12 件)
- ① 森徹自, 若林毅俊, 平原幸恵, 高森康晴,
小池太郎, 山田久夫
線条体ニューロンにおけるヒストンのリン酸化上昇
第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013 年 3 月 28-30 日, 高松
- ② 森徹自, 若林毅俊, 高森康晴, 平原幸恵,
小池太郎, 山田久夫
重積てんかん発作後の脳内におけるクロマチン再構築と遺伝子発現変化
第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 18-21 日, 名古屋
- ③ 平原幸恵, 若林毅俊, 森徹自, 松田賢一,
小池太郎, 高森康晴, 河田光博, 山田久夫
オリゴデンドロサイトにおける膜型エストロゲン受容体 GPER1 の生理機能
第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 18-21 日, 名古屋
- ④ Hirahara Y, Wakabayashi T, Mori T, Matsuda K, Koike T, Takamori Y, Kawata M, Yamada H
Expression and function of the G protein-coupled receptor 30 in oligodendrocyte
14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2012.8.26-29, Kyoto (京都)
- ⑤ Koike T, Wakabayashi T, Mori T, Hirahara Y, Takamori Y, Yamada H
Histochemical demonstration of Sox2 and cell-markers in sensory nervous system
14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2012.8.26-29, Kyoto (京都)
- ⑥ Mori T, Wakabayashi T, Hirahara Y, Takamori Y, Koike T, Kurokawa K, Yamada H
Cell cycle analysis of neural precursors in the adult mouse subventricular zone
14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2012.8.27.26-29, Kyoto (京都)
- ⑦ 紅林秀治, 森徹自, 若林毅俊, 山田久夫

- 海馬歯状回における神経細胞の増殖に影響を与える生育環境—『豊かな環境』を定量化した解析—
第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2012 年 3 月 26-28 日, 甲府
- ⑧ Mori T, Wakabayashi T, Hirahara Y, Takamori Y, Koike T, Kurokawa K, Yamada H
The effects of seizures induced by pentylentetrazole on cell cycle progression of adult subependymal zone precursors.
Society for Neuroscience 41th Annual Meeting, 2011.11.12-16, Washington D.C., USA (アメリカ合衆国)
- ⑨ 森徹自, 若林毅俊, 平原幸恵, 高森康晴,
小池太郎, 黒川清, 山田久夫
てんかん発作が成獣脳室下帯の神経前駆細胞に与える影響
第 34 回日本神経科学大会, 2011 年 9 月 14-17 日, 横浜
- ⑩ 若林毅俊, 大村大輔, 小阪淳, 森徹自,
高森康晴, 平原幸恵, 小池太郎, 山田久夫
P19EC 細胞のニューロンへの分化過程におけるミトコンドリアの形態変化
第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会, 2011 年 3 月 28-30 日, 誌上開催
- ⑪ 森徹自, 若林毅俊, 高森康晴, 北宅弘太郎, 平原幸恵, 小池太郎, 山田久夫
てんかん発作後の成獣脳における神経幹/前駆細胞の細胞周期に関する組織学的解析
第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会, 2011 年 3 月 28-30 日, 誌上開催

[その他]
ホームページ等
所属研究室 HP
<http://www3.kmu.ac.jp/anat1/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
森 徹自 (MORI TETUJI)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号: 30285043