

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 6日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500340

研究課題名（和文）内在性神経幹細胞遊走能活性化分子の機能解析と損傷脳再生医療への応用
 研究課題名（英文）Functional analysis of the activating factor for endogenous neural stem cell migration to develop the regeneration therapy for the injured brain.

研究代表者

浜之上 誠（HAMANOUE MAKOTO）

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：00312025

研究成果の概要（和文）：脳神経系の再生医療法開発を目的として、細胞膜透過型 p38MAP キナーゼ蛋白質（以下 Tat-p38）の神経幹細胞遊走活性増強作用を検討した。結果、Tat-p38 は培養神経幹細胞の遊走活性を著明に増強し損傷部位への集積を亢進させた。またその活性には膜透過活性部分とリン酸化活性部分の両者が必要であることも明らかにした。以上の結果は、膜透過型 p38 蛋白質による損傷脳の再生医療の可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：Cell-permeable p38 MAP kinase protein (Tat-p38) significantly enhances neural stem cell (NSC) migration, and also accumulates NSC into the brain legion. In addition, both of cell-permeable domain and kinase domain of Tat-p38 are required for this activity. These results suggest the potential of cell-permeable Tat-p38 protein for the regeneration therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：膜透過型蛋白質、りん酸化酵素、細胞遊走活性、損傷脳

1. 研究開始当初の背景

脳神経系にはすべての神経系細胞に分化可能な神経幹細胞が備わっているため、脳が損傷を受けた際にはこの神経幹細胞が遊走し、損傷部位の機能再生を担うことが期待されている。しかし実際に損傷後に遊走する細胞数はわずかであり、喪失した神経機能の再生のためにはさらなる遊走能力の向上が求められている状況にあった。

2. 研究の目的

p38 MAP キナーゼ（以下 p38 と略す）は神経幹細胞に高発現するが分化に伴って消失する機能不明な内在性蛋白質である。我々はこの内在性 p38 蛋白質をさらに増加させることで神経幹細胞の遊走能を活性化し、結果として損傷脳の機能を改善する新規治療法としての応用可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

（1）培養神経幹細胞の遊走能活性化機構の

解析

①細胞膜透過型 p38 蛋白質の調整：マウス p38cDNA に膜透過活性を持つ Tat 配列を付加したプラスミドを導入した大腸菌から、組み換え p38 蛋白質（以下 Tat-p38 と略す）をカラムにて精製した。

②培養神経幹細胞の調整：マウス胎仔及びアダルト大脳皮質を分散し、成長因子含有培地使用により培養神経幹細胞を得た。

③細胞遊走能の定量化：Transwell 培養器具上部に細胞を播種してから 16 時間後に、培養器具下部に遊走してきた細胞数を定量した。また Dunn Chamber 培養器具にセットした細胞は、16 時間にわたってタイムラプス撮影を行い移動距離を測定した。

④遊走細胞の同定：Transwell 培養器具下部に遊走した細胞の同定は、細胞腫特異的抗体による免疫染色法により実施した。

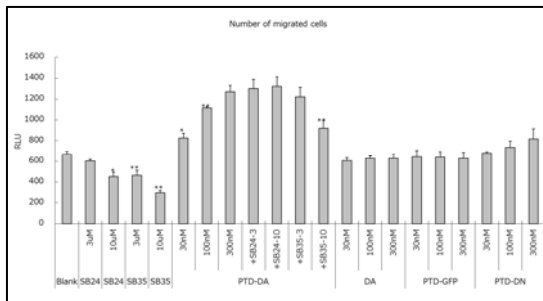
⑤遊走機構の生化学的解析：Tat-p38 で刺激した神経幹細胞を可溶化し各種シグナル伝達因子に対する特異的抗体による Western blot 解析で解析した。

(2) 培養大脳切片中の神経幹細胞遊走能活性化の解析

4 週前に大脳皮質運動野を経頭蓋骨的に傷害したマウスから、大脳脳切片を調整した。Tat-p38 を含んだ培地で 4 週間培養した後に免疫化学法を行い、損傷部位への遊走細胞の集積度を解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞膜透過型の Tat-p38 蛋白質添加により、神経幹細胞の遊走活性を著明に亢進可能であることを示した（下図参照）。またこの活性には蛋白質の細胞膜透過部分とリン酸化酵素の触媒部分が必要で、細胞内骨格蛋白質のリン酸化によることも示唆した。以上の結果は、膜透過型蛋白質による神経幹細胞の直接的機能向上をもたらした特筆すべき成果であることに加え、膜透過型蛋白質の臨床応用に対する有用性を示した意義深い成果である。



(2) Tat-p38 蛋白質の添加によって、大脳に内在する神経幹細胞の損傷部位への集積が誘導可能であることを示した。この結果は、再性能に乏しい脳神経系の再生治療が、ウイ

ルスと比較して低毒性である膜透過型蛋白質の投与によって可能であることを示唆した重要な結果である。

(3) 現在、①膜透過型 Tat-p38 蛋白質が細胞内のどの蛋白質をリン酸化して遊走能を亢進させているかという詳細なシグナル伝達経路の解析と、②大脳皮質運動野の凍結損傷モデルマウスへの膜透過型 Tat-p38 蛋白質の連続投与によって、喪失した運動機能が回復するかどうかについての詳細な解析を続けている。

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)

著者名、論文標題、雑誌名 (大学の研究紀要等を含む。)、査読の有無、巻、発行年 (西暦) 及びページ

① Kobayashi M, Hamanoue M, Masaki T, Furuta Y, Takamatsu K: Hippocalcin mediates calcium-dependent translocation of brain-type creatine kinase (BB-CK) in hippocampal neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 有, 429, 3-4, 142-147 (2012).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.10.125>

② Hamanoue M, Okano H: Cell surface N-glycans mediated isolation of mouse neural stem cells. *J Cell Physiology*, 有, 226, 6, 1433-1438 (2011). DOI:10.1002/jcp.22436

③ Nagoshi N, Shibata S, Hamanoue M, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Toyama Y, Nakamura M, Okano H: Schwann Cell Plasticity After Spinal Cord Injury Shown by Neural Crest Lineage Tracing. *Glia*, 有, 59, 771-784 (2011). DOI 10.1002/glia.211502012.11

[学会発表] (計 20 件)

① 浜之上 誠, 池田 義孝, 高松 研: 神経幹細胞に特異的に発現する糖転移酵素, 第 90 回日本生理学会大会, 東京, 2013.03.27

② 浜之上 誠, 森岡 和仁, 緒方 徹, 中嶋 一行, 高松 研: 慢性脊髄損傷に対する内在性ミクログリア活性化療法の基礎的研究. 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012.12.11

③ Okazaki R, Hayakawa K, Morioka K, Imamura O, Takishima K, Hamanoue M, Endo S, Tanaka S, Ogata T: Erk2 regulates proinflammatory gene

- expressions in demyelinating disorders. Neuroscience 2012, the 42th Annual SfN Meeting Neuroscience, New Orleans, 2012.10.17
- ④ Hamanoue M, Morioka K, Ogata T, Nakajima K, Takamatsu K: Secretion of growth factors from spinal cord microglia are enhanced by p38 MAP kinase. Neuroscience 2012, the 42th Annual SfN Meeting Neuroscience, New Orleans, USA, 2012.10.15
- ⑤ Kobayashi M, Hamanoue M, Takamatsu K: Binding profile and intracellular colocalization between hippocampin and creatine kinase B subunit. The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry, The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, The 34th Annual Meeting of Japanese Society of Biological Psychiatry, Kobe International Conference Center, 2012.10.01
- ⑥ Hamanoue M, Morioka K, Ogata T, Nakajima K, Takamatsu K: p38 MAP kinase enhances secretion of GDNF and VEGF from rat spinal cord microglia. The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry, The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, The 34th Annual Meeting of Japanese Society of Biological Psychiatry, Kobe International Conference Center, 2012.09.30
- ⑦ 浜之上 誠, 中嶋 一行, 高松 研: 細胞外キナーゼによるミクログリア活性化機構の解析. 第 89 回日本生理学会大会, 松本, 2012.03.30
- ⑧ 浜之上 誠, 原科 純一: 内在性神経幹細胞遊走能活性化分子の機能解析. 第 139 回東邦医学会例会, 東京, 2012.02.10
- ⑨ Hamanoue M, Ikeda Y, Takamatsu K: The roles of n-acetylglucosaminyltransferase in adult mouse neural stem cells. Neuroscience 2011, the 41th Annual SfN Meeting Neuroscience, Washington DC, USA, 2011.11.15
- ⑩ 浜之上 誠, 池田 義孝, 高松 研: 神経幹細胞における糖転移酵素の発現と機能解析. Neuroscience2011, 第 34 回日本神経科学大会, 横浜, 2011.09.16
- ⑪ 浜之上 誠, 水野 隆明, 岡野 ジェイムス洋尚, 芝田 晋介, 岡野 栄之, 高松 研: 神経幹細胞内在性遊走能活性化分子の機能解析. 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, 横浜, 2011.03.30
- ⑫ 小林 正明, 浜之上 誠, 高松 研: ヒポカルシンと脳型クレアチンキナーゼ (CKB) の結合特性. 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, 横浜, 2011.03.30
- ⑬ 浜之上 誠, 佐藤 健一郎: HIV-Tat-p38MAPキナーゼ蛋白質による神経幹細胞増殖誘導機構の解析. 第 137 回東邦医学会例会, 東京, 2011.02.18
- ⑭ Hamanoue M, Okano HJ, Mizuno T, Shibata S, Okano H, Takamatsu K: Protein transduction of Tat-p38 MAP kinase enhances adult neural progenitor cell migration. Neuroscience 2010, the 40th Annual SfN Meeting Neuroscience, San Diego, USA, 2010.11.14
- ⑮ Mizuiril S, Hamanoue M, Hemmi H, Arita M, Aoki T, Ohashi Y, Sakai K, Shinozaki M, Shibuya K, Aikawa A: ACE/ACE2-Angiotensin (1-7)-MAS Receptor Expression in Diabetic Nephropathy. ASN's 43rd Annual Meeting and Scientific Exposition, Denver, USA, 2010.11.20
- ⑯ 浜之上 誠, 水野 隆明, 岡野 ジェイムス洋尚, 岡野 栄之, 高松 研: p38MAPキナーゼ直接導入による神経幹細胞遊走能活性化の解析. Neuro2010, 第 33 回日本神経科学大会、第 53 回日本神経化学学会大会、第 20 回日本神経回路学会大会, 神戸, 2010.09.03
- ⑰ 小林 正明, 浜之上 誠, 高松 研: 脳型クレアチンキナーゼのカルシウム/ヒポカルシン依存性トランスロケーション. Neuro2010, 第 33 回日本神経科学大会、第 53 回日本神経化学学会大会、第 20 回日本神経回路学会大会, 神戸, 2010.09.03
- ⑱ 水入 苑生, 浜之上 誠, 篠崎 稔, 酒井 謙, 大橋 靖, 青木 敏行, 河村 毅, 渋谷 和俊, 相川 厚: 糖尿病性腎症における腎ACE/ACE2, Ang1-7, Mas receptor. 第 53 回日本腎臓学会総会, 神戸, 2010.06.17
- ⑲ 浜之上 誠, 水野 隆明, 高松 研: TAT-p38 MAPKタンパク質導入による神経幹細胞遊走能亢進作用. 第 87 回日本生理学大会, 盛岡, 2010.05.21
- ⑳ 小林 正明, 浜之上 誠, 高松 研: ヒポカルシンを介した脳型クレアチンキナーゼのカルシウム依存性トランスロケーション. 第 87 回日本生理学大会, 盛岡, 2010.05.21

[その他]

ホームページ等

教育・研究業績データベース

http://www.toho-u.ac.jp/kenkyu_db/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜之上 誠 (HAMANOUE MAKOTO)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：00312025

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし