

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500392

研究課題名(和文)細胞外ヌクレオチドによる興奮性、抑制性神経細胞タイプ選択機構の解明

研究課題名(英文)Nucleotide-induced glutamatergic subtype selection of newborn neurons

研究代表者

武井 義則 (Takei, Yoshinori)

京都大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30502455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：グルタミン酸は神経細胞間の情報伝達を担う神経伝達物質の一つで、その変調は、てんかんやアルツハイマー病との関連が指摘されている。ヌクレオチドはグリア細胞などから細胞外に分泌され、脳内神経幹細胞の増殖を促進する事が報告されている。

本課題では、幹細胞を神経細胞に分化誘導する過程でヌクレオチドを処理するとグルタミン酸作動性神経細胞が産生される事を明らかにし、そのサブタイプ選択に関与する受容体と情報伝達系を示した。今回得られた結果は、未だ不明な点の多い神経細胞サブタイプ選択機構に新たなメカニズムを示しただけでなく、脳内グルタミン酸濃度の制御による精神、神経疾患の治療法開発のための基盤となりうる。

研究成果の概要(英文)：Glutamatergic neurons are produced through life in the hippocampus. However, mechanism determining subtype selection of newborn neurons has not been elucidated. Here, we showed that extracellular nucleotides induced glutamatergic subtype markers in the newborn neurons. Pharmacological study indicated the receptor corresponding to the nucleotide-induced glutamatergic differentiation. Expression of the corresponding receptor was transiently augmented in the course of neuronal differentiation of mouse ES cells in vitro. The augmentation was coincident with the period when nucleotide can induce glutamatergic subtype markers. These results indicate that extracellular nucleotides can contribute to the glutamatergic subtype selection of newborn neurons.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経科学一般

キーワード：シグナル伝達 発生、分化 脳、神経 神経科学

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経細胞は、神経伝達物質と呼ばれる低分子物質をシナプスに放出して、他の神経細胞に情報を伝達する。グルタミン酸、GABA (ガンマ-アミノ酪酸)、セロトニンなど多くの低分子物質が神経伝達物質として働き、それぞれの神経伝達物質が異なる機能を持つ。それぞれの神経伝達物質は、別々の神経細胞から分泌され、グルタミン酸を分泌する神経細胞はグルタミン酸作動性神経細胞と、GABAを分泌する神経細胞はGABA作動性神経細胞と呼ばれる。哺乳動物の脳では70%近くの神経細胞はグルタミン酸作動性で、次いでGABA作動性神経細胞が多く含まれており、両方で脳の神経細胞のほとんどを占めている。

(2) 幹細胞による神経細胞の産生は脳の発生段階で見られるだけでなく、成熟した脳でも海馬の一部と脳室下帯で一生を通じて観察される。成熟脳の神経細胞新生は、ストレスや加齢による抑制を受け、運動などの刺激によって活発化する事が知られているが、詳細な制御メカニズムは明らかにされていない。海馬では、グルタミン酸作動性神経細胞の産生が主に行われるのに対し、脳室下帯ではGABA作動性神経細胞の産生が見られるが、新たに産生された神経細胞のサブタイプを決定するメカニズムは知られていない。

(3) 脳内グルタミン酸濃度の変調は、てんかん発作を惹起するだけでなく、アルツハイマー病における神経細胞死との関連が指摘されている。また、グルタミン酸の神経伝達物質としての作用を抑制するGABAあるいはGABA受容体を活性化する低分子物質を投与する事で、うつ病や統合失調症の症状が緩和される事も報告されている。これらの知見は、脳内の局所的なグルタミン酸とGABAとのバランスが、多くの精神・神経疾患の発症と深く関連している事を示しており、そのバランスを調整する事でそれらの疾患症状を緩和できる可能性が考えられる。

(4) ヌクレオチドは、細胞内でポリヌクレオチドの材料として使われるだけでなく、細胞内情報伝達の制御に関与している。またヌクレオチドは、神経細胞、グリア細胞、免疫細胞などの多くの細胞種から細胞外に分泌され細胞外ヌクレオチドとなり、P1、P2受容体を活性化する。これまでに、細胞外ヌクレオチドが組織内の神経幹細胞に働きかけ、増殖を促進する事が報告されている。また、ヒト胎児中脳由来の神経幹細胞にヌクレオチドを加えながら試験管内分化を誘導すると、ドーパミン作動性神経細胞に分化する事が知られている。これらの報告から、ヌクレオチドは、組織内で神経幹細胞に働きかける事ができ、新たに分化した神経細胞のサブタイプ選択に関与する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、未だ不明な点が多い新生神経細胞のサブタイプ選択メカニズムと細胞外ヌクレオチドとの関連を明らかにし、精神・神経疾患の治療法や神経組織の再生医療へ応用するための基盤を確立する事である。

3. 研究の方法

(1) マウス ES 細胞の培養と分化誘導
本研究では、マウス ES 細胞株 CGR8 を ESGRO Complete Plus 培地を用いて単層培養した。分化誘導には、2003 年に Ying らが報告した N2B27 培地を用いた。

(2) 神経幹細胞の分離、培養、分化誘導
生後 5 日目の Balb/c マウスや成体ラットから、脊髄、大脳皮質、海馬、脳室下帯部を、分離し、各組織から神経細胞分離キット (住友ベークライト) を用いて細胞を分離した。マウス神経幹細胞を効率よく分離するために、コラーゲンゲル内で細胞塊を作らせ、クローン選択が簡便に行えるようにした。分離された神経幹細胞は、N2B27 培地に、EGF と FGF2 を加えた培地で単層培養した。分化誘導は、EGF と FGF2 を含まない N2B27 培地で行った。

(3) マウス海馬凍結切片の調製
生後 5 日目の Balb/c マウスから脳を分離し、厚さ 30 μm の凍結切片を調製した。それらは、免疫染色を行う前に 4%PFA で固定後、クエン酸緩衝液に浸し電子レンジで処理する事で抗原賦活化を行った。

(4) マウス海馬切片の培養
生後 5 日目の Balb/c マウスから脳を分離し、厚さ 500 μm の海馬を含む切片を調製した。切片は多孔膜上で培養された。分裂中の細胞を同定するために EdU を培地中に添加し、2 日間培養した。その後 EdU を含まない培地で培養し、EdU でラベルされた神経前駆細胞、神経幹細胞が神経細胞に分化するまで培養した。4%PFA で固定後、クエン酸緩衝液に浸し電子レンジで処理する事で抗原賦活化を行い、免疫染色に用いた。

4. 研究成果

(1) マウス ES 細胞の神経細胞への分化に対する細胞外ヌクレオチドの影響
マウス ES 細胞株を N2B27 培地で分化誘導して得られた神経細胞のほとんどは GABA 作動性サブタイプになる事が報告されていた。本課題では、単層培養したマウス ES 細胞株 CGR8 を N2B27 培地で 14 日間培養し、神経細胞への分化を誘導した。その結果、先の報告と同様に GABA 作動性神経細胞が得られたが、分化誘導中にヌクレオチドを添加したところ GABA 作動性神経細胞マーカーの発現が減少し、グルタミン酸作動性サブタイプを示すマーカータンパク質の発現が確認された。

この事は、細胞外ヌクレオチドが、ES 細胞由来神経細胞のサブタイプ選択を制御できる事を示した。

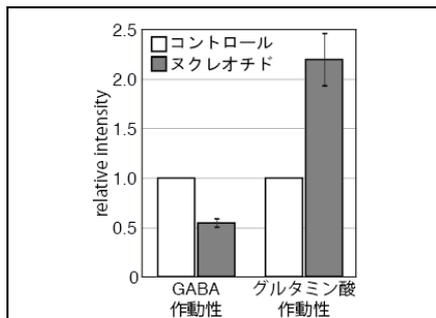


図1 CGR8 細胞を N2B27 培地で 14 日間培養して分化誘導後、細胞抽出液を調製し電気泳動後、GABA 作動性神経細胞マーカーとグルタミン酸作動性神経細胞マーカーの発現量を western blotting で検討し、それぞれのシグナルを定量した。グラフは、ヌクレオチドを添加しないで分化誘導した時の発現量を 1 として相対量を示した。ヌクレオチドの添加によって GABA 作動性神経細胞マーカーの発現量が減少し、グルタミン酸作動性神経細胞マーカーの発現量が増加した事が示された。

背景で述べたように、細胞外ヌクレオチドは様々な受容体を介して細胞内に情報を伝達する可能性が考えられる。ヌクレオチドの種類によって、活性化できる P1、P2 受容体が決定されるため、異なるヌクレオチドを添加した時の新生神経細胞サブタイプを検討する事で、ヌクレオチド依存的なサブタイプ選択誘導を行う受容体を薬理的に同定した。

さらに、ES 細胞の分化誘導の過程で細胞抽出液を調製し、ヌクレオチド依存的なサブタイプ選択誘導を行う受容体の発現を検討したところ、ES 細胞の分化誘導後 4 日目をピークとする一過性の上昇を示す事が示された。この発現の変動は、ヌクレオチドの添加によってサブタイプ選択誘導を行える期間と一致していた。

(2) 成体神経幹細胞の分離方法の確立

ヌクレオチド依存的なサブタイプ選択誘導が ES 細胞の神経細胞分化だけでなく、成体中の神経幹細胞の神経細胞分化にも有効である事を示すために、マウス中枢神経組織から成体神経幹細胞を分離した。

組織から細胞を分離し、それらを限界希釈して 96 ウェウプレートに播種して、ニューロスフェアを形成させて、神経幹細胞クローンを得る事が以前から行われていたが、この方法では多大な労力が必要であった。

そこで、分離した細胞を低濃度で、培地を含むコラーゲンゲルを用いて 6 ウェルプレートに播種し、ゲル内でニューロスフェアを形成させ、良く分離しているニューロスフェアをゲルから切り出し培養する方法を用いる事で、培養に費やす時間と労力の減少に成功した。マウス大脳皮質、海馬、脳室下帯、脊

髄、ラット脊髄から、この方法を用いて神経幹細胞を分離する事に成功しており、この方法は、成体神経幹細胞を分離する方法として、簡便で、また部位を問わずに利用できる汎用性の高い方法である事が示された。

(3) 神経幹細胞の神経細胞への分化に対する細胞外ヌクレオチドの影響

生後 5 日目の Balb/c マウスから海馬を分離し、(2)で述べた方法を用いて神経幹細胞株を分離した。(1)でヌクレオチド依存的なサブタイプ選択誘導を行う受容体として同定された受容体の発現を RT-PCR で確認したところ、五つの細胞株のうちの一つで特に強い発現が見られた。その細胞株とその他の細胞株とを比較するために免疫染色を行った。海馬の神経幹細胞は、GFAP と Sox2 を発現しているタイプ I、Sox2 を発現している一方 GFAP を発現していないタイプ II、GFAP も Sox2 も発現していないがダブルコーチンなど神経前駆細胞のマーカーを発現しており増殖を示すタイプ III に分類される。様々なマーカータンパク質の免疫染色から、ヌクレオチド依存的なサブタイプ選択誘導を行う受容体が発現するのは、タイプ II 神経幹細胞である可能性が示された。

海馬由来神経幹細胞を、ヌクレオチドを加えながら分化を誘導したところ、ヌクレオチド依存的なサブタイプ選択が見られた。ES 細胞の検討で示されたヌクレオチド依存的なサブタイプ選択誘導を行う受容体の発現を、siRNA を海馬由来神経幹細胞にトランスフェクトして抑制すると、ヌクレオチド依存的なサブタイプ選択が見られなくなった。この事は、海馬由来神経幹細胞から分化した神経細胞が、ES 細胞から分化した神経細胞と同様のメカニズムでサブタイプ選択を行う事示している。

また、ヒト ES 細胞由来の神経幹細胞を用いて同様の検討を行ったところ、ヌクレオチドによるサブタイプ選択はマウスだけでなく、ヒトでも保存されたメカニズムである事が示された。

(4) マウス海馬組織を用いた検討

生後 5 日目の Balb/c マウスの脳から凍結切片を作成し、ヌクレオチド依存的なサブタイプ選択誘導を行う受容体の発現を検討した。その結果 in vitro の結果と同様に、タイプ II 神経幹細胞のマーカータンパク質とその受容体との共発現が確認できた。

ヌクレオチド依存的なサブタイプ選択が、組織から分離した神経幹細胞だけでなく組織内の神経幹細胞にも影響する事を示すために、海馬の切片培養を行った。はじめに 2 日間 EdU 入りの培地で培養する事で、この二日間の間に DNA 複製を行った細胞をラベルした。その後 EdU でラベルされた増殖可能な細胞が分化するのを期待して、15 日間 EdU を添加しないで培養し続けた。組織を固定して免

疫染色を行い、EdU を含む神経細胞のサブタイプを同定した。その結果、細胞外ヌクレオチドが、海馬組織中で見られる神経細胞神聖におけるサブタイプ選択に影響する事を示した。さらに、ヌクレオチドの海馬への微量注入を行う事で、海馬で産生される神経細胞のサブタイプが変化する事を示す結果を得ている。

(5) まとめ

以上の結果から、細胞外ヌクレオチドが新生神経細胞のサブタイプ選択メカニズムを制御出来る事が示され、そのメカニズムを精神・神経疾患の治療法や神経組織の再生医療へ応用するための基盤が確立できた。

細胞外ヌクレオチドは、神経細胞やグリア細胞などから分泌される事から、新しい細胞間クロストークの役割が示される事が期待できる。また、成熟した脳内の海馬と脳室下帯では異なる神経細胞サブタイプが産生されるが、そのサブタイプ制御のメカニズムが解明されると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Kenji Suehiro, Yuka Nakamura, Shuai Xu, Yohichi Uda, Takafumi Matsumura, Yoshiaki Yamaguchi, Hitoshi Okamura, Toshihide Yamashita and Yoshinori Takei, Ecto-domain phosphorylation promotes neurogenesis and regeneration of the central nervous system from traumatic injury, *Sci. Rep.* Vol. 4, 4972; DOI 10.1038/srep04972 (2014)

[学会発表] (計 1 件)

Yoshinori Takei, Extracellular signalling directing glutamatergic neuronal differentiation of adult neural stem cells, *Neurogenesis 2013 in Matsushima, Matsushima, Japan (17/Oct/2013)*

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: Induction of neurogenesis

発明者: 武井義則

権利者: 京都大学、Medical Research Council Technology (英国)

種類:

番号: 1406559.3

出願年月日: 2014年4月11日

国内外の別: 国外

[その他]

新聞報道

朝日新聞 (5月22日22面)、京都新聞 (5月16日30面)、産経新聞 (5月16日28面)、中日新聞 (5月16日3面)、日刊工業新聞

(5月16日21面)、日本経済新聞 (5月16日42面)、毎日新聞 (5月16日27面) および読売新聞 (5月16日1面・33面)

ホームページ等

京都大学>ホーム>研究>お知らせ

成熟した脊髄内での神経細胞新生に成功 - 神経組織再生の高効率化に期待-

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2014/140516_1.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武井 義則 (Yoshinori Takei)

京都大学・大学院薬学研究科・特定助教

研究者番号: 30502455