

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590321

研究課題名(和文) ストレス関連疾患での神経幹細胞および脳内ニッチの機能異常の分子メカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidation of abnormalities of neurogenesis and brain niche in stress-related disorders

研究代表者

渡辺 康裕 (Watanabe, Yasuhiro)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・教授)

研究者番号：90127324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：マウス人工多能性幹細胞(iPS細胞)や神経前駆細胞でのGPR56の発現を認め、GPR56 siRNAの導入はマウスiPS細胞の神経分化を抑制した。一方、GPR56 siRNA導入はフィブロネクチンに対する神経前駆細胞の結合活性に有意な影響を与えなかった。beta-アドレナリン受容体あるいはセロトニン受容体の刺激は、マウスiPS細胞からの神経分化を促進したが、フィブロネクチンに対する神経前駆細胞の結合活性に影響を与えなかった。GPR56、beta-アドレナリン受容体およびセロトニン受容体が、神経分化促進に関与する一方、神経前駆細胞の細胞外マトリックスとの結合活性には影響しないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Transfection of GPR56 siRNA significantly inhibited neural differentiation of mouse induced pluripotent stem cells (iPS cells). However, the transfection of GPR56 siRNA did not affect fibronectin-binding activity in mouse neural progenitor cells. Stimulation with either beta-adrenoceptor or serotonin receptor significantly enhanced neural differentiation of mouse iPS cells, but the stimulation did not affect fibronectin-binding activity in mouse neural progenitor cells. These findings suggest the involvement of GPR56, beta-adrenoceptor, and serotonin receptor on neural differentiation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：神経新生 GPR56 神経前駆細胞 細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

(1) 従来の研究で、うつ病を含むストレス関連疾患では、海馬や側脳室周囲の神経新生が低下していることが指摘されている。一方、我々は、成体ラットの海馬歯状回や側脳室周囲の未分化細胞に G 蛋白共役型受容体の 1 種である GPR56 が発現しており、ストレス関連疾患での GPR56 の発現低下が神経新生障害をもたらしている可能性を明らかにした。

(2) 我々は、 α_1 -アドレナリン受容体刺激が神経前駆細胞の増殖および遊走を促進することを明らかにした。一方、脳内ノルアドレナリンがうつ病や PTSD の病態と関連があることが報告されているが、神経前駆細胞での GPR56 の発現調節機構と神経伝達物質との関連性は、解明されていない。さらに、神経前駆細胞の機能を調節する脳内ニッシェの存在が指摘され、ニッシェに多く発現する細胞外マトリックスと神経前駆細胞の相互作用に対する GPR56 の関連も不明であった。

2. 研究の目的

(1) そこで、まず、人工多能性幹細胞(iPS 細胞)や神経前駆細胞における GPR56 の発現とうつ病や PTSD の病態との関連性が深いノルアドレナリンやセロトニンとの関連性を検討した。まず、iPS 細胞や神経前駆細胞での GPR56 の発現を確認した後、ノルアドレナリンやセロトニン刺激による GPR56 の発現変化とその変化をもたらすメカニズムに関して薬理学的手法を用いて検討した。さらに、siRNA により GPR56 をノックダウンした時の iPS 細胞や神経前駆細胞の増殖や分化に対する影響を検討した。

(2) 次に、iPS 細胞や神経前駆細胞におけるインテグリン発現や細胞外マトリックスとの結合活性に対する GPR56、ノルアドレナリン、セロトニンの関与を検討した。

3. 研究の方法

(1) マウス iPS 細胞や iPS 細胞から分化誘導した神経前駆細胞を用いて、GPR56 抗体による蛍光抗体染色を行い、蛍光顕微鏡にて GPR56 の発現を確認した。次に、その培養系にノルアドレナリンやセロトニンによる刺激を行い、GPR56 の発現変化を、蛍光抗体染色、ウェスタン・プロット法により解析した。この時、アドレナリンやセロトニン受容体拮抗薬を前投与し、その影響により、それらの受容体の関与を検討した。次に、マウス iPS 細胞や神経前駆細胞に GPR56 siRNA を導入して GPR56 をノックダウンした後、細胞増殖能は、MTT アッセイ法で、神経前駆細胞あるいは神経細胞への分化誘導後の神経分化能は、細胞特異的なマーカーである Nestin および β III-tubulin の発現を、Real Time RT-PCR 法、ウェスタン・プロット法で解析し、GPR56 の影響を検討した。

(2) マウス iPS 細胞や神経前駆細胞を用いて、蛍光抗体染色によるインテグリンの発現を確認した。次に、その培養系にノルアドレナリンやセロトニンによる刺激を行い、インテグリンの発現変化を、蛍光抗体染色、ウェスタン・プロット法、フローサイトメトリー法により解析した。この時、アドレナリンやセロトニン受容体拮抗薬を前投与し、同受容体の関与を検討した。次に、マウス iPS 細胞や神経前駆細胞に GPR56 siRNA を導入して GPR56 をノックダウンした後、インテグリン発現および細胞外マトリックスとの結合活性を、フローサイトメトリー法および binding assay 法にて検討した。

4. 研究成果

(1) マウス iPS 細胞および神経前駆細胞での GPR56 の発現を蛍光抗体染色およびウェスタン・プロット法で確認した。しかし、神経伝達物質であるノルアドレナリンあるいはセロトニンで刺激しても、マウス iPS 細胞および神経前駆細胞での GPR56 の発現に影響はみられなかった。一方、ノルアドレナリンあるいはセロトニンの刺激は、レチノイン酸によるマウス iPS 細胞から Nestin 陽性の神経前駆細胞への分化誘導を促進させた。これらの分化促進作用は、 β -アドレナリン受容体アンタゴニストであるイソプロテレノールあるいは 5-HT₄ 受容体アンタゴニストである GR113808 の前添加で抑制されたことから、 β -アドレナリン受容体あるいは 5-HT₄ 受容体を介した作用であることが示唆された。

(2) マウス iPS 細胞由来胚様体に GPR56 siRNA を導入した後、レチノイン酸で刺激し神経分化を誘導したところ、negative control siRNA 導入の胚様体に比べ、Nestin 陽性の神経前駆細胞および神経細胞への分化が有意に抑制された。また、マウス iPS 細胞および神経前駆細胞に GPR56 siRNA を導入し、細胞増殖および導入前後のインテグリン発現変化を検討したところ、明らかな影響はみられなかった。

(3) マウス iPS 細胞由来胚様体をフィブロネクチンあるいはラミニンでコートした培養ディッシュに接着させ、3 日後に接着する神経前駆細胞の数を検討したところ、無刺激に比しレチノイン酸刺激で有意な増加がみられた。一方、 β -アドレナリン受容体アゴニストであるプロプラノロールあるいはセロトニンの刺激は、接着する神経前駆細胞の数に有意な影響を与えなかった。さらに、胚様体に GPR56 siRNA を導入し、negative control siRNA 導入の胚様体と比較したが、接着する神経前駆細胞の数に有意差はみられなかった。

(4) 今回検討した結果より、GPR56、 β -アドレナリン受容体あるいは 5-HT₄ 受容体の刺激が、レチノイン酸による神経前駆細胞および神経細胞への分化誘導を促進していることが示唆された。一方、ノルアドレナリンやセロトニンは、GPR56 の発現調節には影響しないことが示された。さらに、GPR56、 β -アドレナリン受容体あるいは 5-HT₄ 受容体の刺激は、神経前駆細胞のインテグリン発現や細胞外マトリックスとの結合活性には影響しないことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

T. Ishizuka, H. Goshima, A. Ozawa, Y. Watanabe. Stimulation of 5-hydroxytryptamine 4 receptor enhances differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into neural progenitor cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 査読有 in press.

石塚 俊晶、渡辺 康裕、多能性幹細胞の機能調節に関わる細胞膜受容体。日本薬理学雑誌 査読有 印刷中

T. Ishizuka, H. Goshima, A. Ozawa, Y. Watanabe. Stimulation with α 1-adrenoceptor or angiotensin type 1 receptor enhances DNA synthesis in human induced pluripotent stem cells via Gq-coupled receptor-dependent signaling pathways. *European Journal of Pharmacology* 査読有 714, 2013, 202-209.

N. Hayakawa, Y. Shiozaki, Y. Shibata, Y. Koike, Y. Uchiyama, N. Matsuura, T. Goto. Resveratrol affects undifferentiated and differentiated PC12 cells differently, particularly with respect to possible differences in mitochondrial and autophagic functions. *European Journal of Cellular Biology* 査読有 92, 2013, 30-43.

T. Ishizuka, H. Goshima, A. Ozawa, Y. Watanabe. Effect of nicotine on the proliferation and differentiation of mouse induced pluripotent stem cells. *Current Medicinal Chemistry* 査読有 19, 2012, 5164-5169.

T. Ishizuka, H. Goshima, A. Ozawa, Y. Watanabe. β 1-adrenoceptor stimulation enhances the differentiation of mouse-induced pluripotent stem cells into neural progenitor cells. *Neuroscience Letters* 査読有 525, 2012, 60-65.

T. Ishizuka, A. Ozawa, H. Goshima,

Y. Watanabe. Involvement of nicotinic acetylcholine receptor in the proliferation of mouse induced pluripotent stem cells. *Life Sciences* 査読有 90, 2012, 637-648. H. Tanaka, Y. Nishioka, Y. Yokoyama, S. Higashiyama, N. Matsuura, S. Matsuura, N. Hieda. Nuclear envelope-localized EGF family protein amphiregulin activates breast cancer cell migration in an EGF-like domain independent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有 420, 2012, 721-726.

T. Ishizuka, H. Goshima, A. Ozawa, Y. Watanabe. Effect of angiotensin II on proliferation and differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into mesodermal progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有 420, 2012, 148-155.

T. Ishizuka, Y. Watanabe. α 1-adrenoceptor stimulation enhances leukemia inhibitory factor-induced proliferation of mouse-induced pluripotent stem cells. *European Journal of Pharmacology* 査読有 668, 2011, 42-56.

T. Ishizuka, T. Hinata, Y. Watanabe. Superoxide induced by a high-glucose concentration attenuates production of angiogenic growth factors in hypoxic mouse mesenchymal stem cells. *Journal of Endocrinology* 査読有 208, 2011, 147-159.

〔学会発表〕(計 24 件)

石塚 俊晶、小澤 亜也子、新田 宗光、渡辺 康裕、 β -アドレナリン受容体および 5-HT₄ 受容体刺激は、cyclic AMP/PKA シグナル伝達系の活性化を介してマウス人工多能性幹細胞の神経分化を促進させる、第 87 回日本薬理学会年会、2014.3.21、仙台

Y. Watanabe, T. Ishizuka, A. Ozawa, H. Goshima, Involvement of cannabinoid receptors on proliferation and differentiation into neural progenitor cells in mouse induced pluripotent stem cells. 43th Annual Meeting of Society for Neuroscience 2013. 11.12. San Diego, U.S.A

石塚 俊晶、小澤 亜也子、渡辺 康裕、ヒト人工多能性幹細胞の心血管前駆細胞への分化に対するリゾフォスファチジルコリンの影響、第129回日本薬理学会関東部会、2013.10.19、東京

石塚 俊晶、小澤 亜也子、五嶋 葉月、渡辺 康裕、マウス人工多能性幹細胞の増殖および神経前駆細胞への分化に対するセロトニン受容体刺激の影響、第 56 回日本神経化学学会大会、2013.6.20、京都
T. Ishizuka, A. Ozawa, H. Goshima, Y. Watanabe. Effect of lysophosphatidylcholine on differentiation of human induced pluripotent stem cells into cardiovascular progenitor cells. 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. 2013.6.12. Boston, U.S.A
石塚 俊晶、五嶋 葉月、小澤 亜也子、渡辺 康裕、多能性幹細胞におけるG蛋白共役型受容体の役割と再生医療への応用、第86回日本薬理学会年会シンポジウム、2013.3.21、福岡
小澤 亜也子、石塚 俊晶、五嶋 葉月、渡辺 康裕、マウス人工多能性幹細胞の神経前駆細胞への分化に対する 5-HT₄ 受容体刺激の影響、第 86 回日本薬理学会年会、2013.3.21、福岡
T. Ishizuka, H. Goshima, A. Ozawa, Y. Watanabe. Involvement of Gq-coupled receptor-dependent signaling pathway on the DNA synthesis of human induced pluripotent stem cells. American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics 2013. 2013.3.8. Indianapolis, USA.
五嶋 葉月、石塚 俊晶、小澤 亜也子、渡辺 康裕、ヒト人工多能性幹細胞の DNA 合成に対する Gq 蛋白質共役型受容体の関与、第 127 回日本薬理学会関東部会、2012.10.20、東京
小澤 亜也子、石塚 俊晶、五嶋 葉月、渡辺 康裕、セロトニン受容体刺激がマウス人工多能性幹細胞の増殖および神経前駆細胞への分化に与える影響、第 127 回日本薬理学会関東部会、2012.10.20、東京
石塚 俊晶、五嶋 葉月、小澤 亜也子、渡辺 康裕、多能性幹細胞における膜結合型受容体の役割、第 127 回日本薬理学会関東部会、2012.10.20、東京
T. Ishizuka, A. Ozawa, H. Goshima, Y. Watanabe. Effects of serotonin on proliferation and differentiation into neural progenitor cells of mouse induced pluripotent stem cells. 第55回日本神経化学学会、2012.9.30、神戸
石塚 俊晶、小澤 亜也子、五嶋 葉月、渡辺 康裕、マウス人工多能性幹細胞の増殖および神経前駆細胞への分化に与える serotonin の影響、第 63 回日本薬理学会北部会、2012.9.14、新潟
Y. Watanabe, T. Ishizuka, A. Ozawa, H.

Goshima. Effects of nicotine on proliferation and differentiation into cardiovascular progenitor cells in human induced pluripotent stem cells. 6th European Congress of Pharmacology. 2012.7.17. Granada, Spain.

五嶋 葉月、石塚 俊晶、小澤 亜也子、渡辺 康裕、ヒト人工多能性幹細胞の増殖および心血管前駆細胞への分化に対する α 1および β アドレナリン受容体刺激の影響、第 126 回日本薬理学会関東部会、2012.7.14、東京

T. Ishizuka, A. Ozawa, H. Goshima, Y. Watanabe. Involvement of adrenergic receptors on proliferation and differentiation of mouse induced pluripotent stem cells. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. 2012.6.15
Yokohama, Japan

石塚 俊晶、小澤 亜也子、五嶋 葉月、渡辺 康裕、マウス人工多能性幹細胞の神経前駆細胞への分化に対する β アドレナリン受容体刺激の影響、第 85 回日本薬理学会年会、2012.3.16、京都

小澤 亜也子、石塚 俊晶、五嶋 葉月、渡辺 康裕、アンジオテンシン II タイプ 1 受容体刺激によるヒト人工多能性幹細胞の増殖促進作用に対する PI3K/Akt および MEK/ERK の関与、第 85 回日本薬理学会年会、2012.3.14、京都

五嶋 葉月、石塚 俊晶、小澤 亜也子、渡辺 康裕、マウス人工多能性幹細胞の心血管前駆細胞への分化に及ぼすアンジオテンシン II の影響、第 85 回日本薬理学会年会、2012.3.14、京都

Y. Watanabe, T. Ishizuka, A. Ozawa, H. Goshima, Effects of nicotine on proliferation and differentiation into neural progenitor cells in mouse induced pluripotent stem cells. 4th International Conference on Drug Discovery and Therapy 2012.2 Dubai, UAE

21 T. Ishizuka, A. Ozawa, H. Goshima, Y. Watanabe. Effects of angiotensin II on proliferation and differentiation into neural progenitor cells in mouse induced pluripotent stem cells. 41th Annual Meeting of Society for Neuroscience 2011.11.16 Washington D.C., U.S.A

22 五嶋 葉月、小澤 亜也子、石塚 俊晶、渡辺 康裕、マウス人工多能性幹細胞の DNA 合成に関与する細胞内シグナル伝達分子への α 1 アドレナリン受容体刺激の影響、第 125 回日本薬理学会関東部会、2011.11.15、船橋

23 石塚 俊晶、渡辺 康裕、マウス人工多

能性幹細胞の増殖および神経前駆細胞への分化に対する神経伝達物質受容体の役割、第 54 回日本神経化学会、2011.9.28、加賀市

- ²⁴ 石塚 俊晶、小澤 亜也子、五嶋 葉月、渡辺 康裕、マウス人工多能性幹細胞の増殖・分化に対するニコチン刺激の影響、第 124 回日本薬理学会関東部会、2011.6.4、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 康裕 (WATANABE YASUHIRO)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授

研究者番号：90127324

(2) 研究分担者

石塚 俊晶 (ISHIZUKA TOSHIAKI)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授

研究者番号：30399117

松浦 成昭 (MATSUURA NARIAKI)
大阪大学大学院医学研究科・教授

研究者番号：70190402