

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500437

研究課題名(和文) アストロサイトの新規分化促進因子の解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of novel factors that promote astrocyte differentiation of neural precursor cells

研究代表者

長尾 元史 (NAGAO, Motoshi)

国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・研究所 運動機能系障害研究部・研究室長

研究者番号：00359671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アストロサイトは、中枢神経系の様々な機能において重要な役割を果たす細胞である。アストロサイトは神経幹細胞から生み出される(分化する)が、どのように生み出されるか、その分子メカニズムについては不明な点も多い。本研究では、脳の発生過程において、クロマチン制御因子であるHMGNタンパク質が、アストロサイト分化を促進することを明らかにした。マウス神経幹細胞で、HMGNタンパク質を過剰発現させたところ、アストロサイト分化は促進された。逆に、ノックダウンすると、アストロサイト分化の抑制が観察された。以上より、HMGNタンパク質は、アストロサイト分化を促進する新規因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Astrocytes are the most abundant cell type in the mammalian brain and are important for the functions of the central nervous system. Although it is known that astrocytes arise from neural precursor cells (NPCs), the molecular mechanisms of astrocyte differentiation are still poorly understood. Here, I show that HMGN family proteins promote astrocyte differentiation of NPCs during brain development. HMGN proteins were expressed in NPCs, Sox9+ glial progenitors and GFAP+ astrocytes in perinatal and adult brains. Forced expression of HMGN family proteins in NPCs in cultures or in the late embryonic neocortex increased the generation of astrocytes. Conversely, knockdown of HMGN family proteins in NPCs suppressed astrocyte differentiation. These results suggest that HMGN family proteins are novel chromatin regulatory factors that promote astrocyte differentiation.

研究分野：神経発生 幹細胞

キーワード：神経幹細胞 アストロサイト クロマチン

1. 研究開始当初の背景

脳脊髄などの中枢神経系は、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトなどの細胞からなる。これら3種類の細胞は、発生時に、神経幹細胞(神経系前駆細胞)から生み出される(分化する)。これまで長い間、アストロサイトは非興奮性の細胞で、ニューロンなど他の神経系細胞の支持細胞と考えられてきた。しかし近年の研究により、中枢神経系におけるアストロサイトの機能がしだいに明らかにされ、特にシナプス形成やシナプス可塑性に積極的に関わりニューロンの機能を制御することが注目されはじめている。このことは、ニューロンの機能異常によって引き起こされていたと考えられていた多くの神経疾患に、アストロサイトが関与していることを示唆している。しかし、この重要な役割をもつアストロサイトがいつ、どこから、どのように生み出されるかという、その起源や発生の分子メカニズムに関しては、ニューロンやオリゴデンドロサイトの発生と比較して、その研究が遅れており、未だ不明な点も多い。これまで、JAK-STAT 経路、Notch-Hes/NFIA 経路、BMP-SMAD 経路などがアストロサイト分化を制御することが報告されている。しかし、哺乳類の脳において、アストロサイト分化の最初のステップである特異化に関わる因子(特異化因子または分化決定因子)は明らかにされていない。アストロサイトの特異化のみに関与する因子が存在するかどうかを明らかにすることは重要な課題である。また、アストロサイト分化を促進するクロマチン制御因子はこれまでに報告されていない。

様々な神経疾患により失われたニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを再生させるためには、これらの細胞が神経幹細胞(神経系前駆細胞)からどのように生み出されるかを明らかにし、そこで得られた知見を応用することが考えられる。再生医療に必要な細胞を作り出すための基礎的な研究としても重要である。

2. 研究の目的

アストロサイトは、ニューロンやオリゴデンドロサイトと同様に、神経幹細胞(神経系前駆細胞)から生み出される(分化する)が、どのように生み出されるか、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

(1) 新しいアストロサイト分化制御因子を探索し、その新規因子によるアストロサイト分化の制御メカニズムを提案する。

(2) 新規アストロサイト分化制御因子と既知のアストロサイト分化制御因子(STAT シグナル経路など)との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 発生期または成体マウス脳での、新規ア

ストロサイト分化促進因子(HMGN ファミリータンパク質: HMGN1、2、3)の発現パターンを免疫組織染色で解析した。神経幹細胞、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトのマーカーとの共染色を行い、HMGN ファミリータンパク質がどの細胞に発現しているか詳細な解析を行った。

(2) マウス神経系前駆細胞の培養系(neurosphere culture)とレトロウイルスを使った発現系を用いて、HMGN ファミリータンパク質を培養した神経系前駆細胞で過剰発現またはノックダウンし、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト分化に対する影響を検討した。

(3) エレクトロポレーションによるマウス個体への遺伝子導入系(In utero electroporation / Postnatal electroporation)を用いて、HMGN ファミリータンパク質を生体内の神経系前駆細胞で過剰発現またはノックダウンし、ニューロン、アストロサイト分化に対する影響を検討した。

(4) クロマチン免疫沈降アッセイ、ルシフェラーゼアッセイ、ウエスタンブロッティングを行い、HMGN ファミリータンパク質とアストロサイト分化を促進することが知られているSTATシグナル経路の関係を検討した。

4. 研究成果

哺乳類の中枢神経系において、アストロサイトは最も数の多い細胞である。アストロサイトは、ニューロンへの栄養供給、ニューロンが放出した神経伝達物質の回収、シナプス周辺のイオン環境の維持、血液脳関門の制御、シナプス形成など、中枢神経系の様々な機能において重要な役割を果たす。アストロサイトはニューロン、オリゴデンドロサイトと同様に神経幹細胞から生み出される(分化する)。近年の研究により、STAT シグナル経路がアストロサイト分化を促進することはよく知られているが、アストロサイト分化の分子メカニズムについては未だ不明な点も多い。本研究では、脳の発生過程において、クロマチン制御因子である HMGN ファミリータンパク質(HMGN1、2、3)が、アストロサイト分化を促進することを明らかにした。HMGN ファミリータンパク質は、出生前後、あるいは成体のマウス脳において、神経幹細胞(神経系前駆細胞)、グリア前駆細胞、アストロサイトで発現していた。HMGN ファミリータンパク質は、アストロサイト系譜の細胞だけでなく、ニューロン、オリゴデンドロサイト系譜の細胞にも発現している。しかし、アストロサイト系譜の細胞と違い、ニューロン、オリゴデンドロサイト系譜の細胞では、成熟するにつれて HMGN ファミリータンパク質の発現が低くなることが明らかとなった。このこ

とから、神経幹細胞の各系譜への分化において、HMGN ファミリータンパク質の発現量が重要であることが示唆された。すなわち、アストロサイト分化において、HMGN ファミリータンパク質の発現量は高く維持される必要があると考えられる。培養したマウス神経系前駆細胞で、HMGN1、2、3 を過剰発現させたところ、アストロサイト分化は促進され、ニューロン分化は抑制された。逆に、ノックダウンすると、アストロサイト分化の抑制とニューロン分化の促進が観察された。オリゴデンドロサイト分化には大きな影響はなかった。さらに、マウス個体内の神経系前駆細胞で HMGN1、2、3 を過剰発現またはノックダウンしても、同様の結果が得られた。これらの結果は、HMGN ファミリータンパク質が神経幹細胞のアストロサイトへの分化を促進することを示している。重要なことに、HMGN ファミリータンパク質の過剰発現は STAT を活性化しなかった(STAT の活性化の指標であるリン酸化の亢進と STAT 依存的なレポーター遺伝子の活性化は観察されなかった)。一方、HMGN ファミリータンパク質のノックダウンは、STAT シグナル経路を活性化する毛様体神経栄養因子 (Ciliary neurotrophic factor: CNTF) によるアストロサイト分化促進を顕著に抑制した。以上より、HMGN ファミリータンパク質は、STAT シグナル経路と並列またはその下流ではたらし、アストロサイト分化を促進する新規のクロマチン制御因子であることが示唆された(図1)。この成果により、アストロサイトの分化制御メカニズムの理解がさらに進んだと考えられる。HMGN ファミリータンパク質はクロマチン制御タンパク質であり、ヌクレオソームに結合してクロマチン状態を活性型(オープン)にすることが知られている。このことから、HMGN ファミリータンパク質がアストロサイト分化に必要な遺伝子群のクロマチン状態を活性型にすることで分化促進していると考えられる。アストロサイトの分化制御メカニズムをさらに明らかにしていくには、今後、HMGN ファミリータンパク質の標的遺伝子群の同定が必要である。また、HMGN ファミリータンパク質がどのように制御され、アストロサイト分化を促進するのか、現在のところ不明である。HMGN ファミリータンパク質はN末端にあるセリン残基のリン酸化でその細胞内局在が制御されていることが知られている。リン酸化された HMGN ファミリータンパク質は、ヌクレオソームと結合できず、核外に移行する。アストロサイト分化においても、HMGN ファミリータンパク質のリン酸化による制御が重要かもしれない。

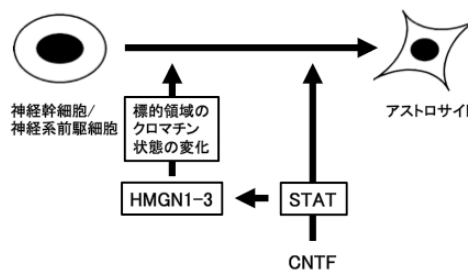


図1 HMGNファミリータンパク質によるアストロサイト分化制御

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1件)

Nagao M, Lanjakornsiripan D, Itoh Y, Kishi Y, Ogata T, Gotoh Y.

High mobility group nucleosome-binding family proteins promote astrocyte differentiation of neural precursor cells.

Stem Cells 32, 2983-2997, 2014, 査読有
DOI: 10.1002/stem.1787.

〔学会発表〕(計1件)

Nagao M, Lanjakornsiripan D, Itoh Y, Kishi Y, Gotoh Y, Ogata T.

HMGN family proteins promote astrocyte differentiation of neural precursor cells.

北米神経科学会 (Neuroscience2014)

2014年11月11-15日

ワシントン DC、アメリカ合衆国

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

国立障害者リハビリテーションセンター
<http://www.rehab.go.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長尾 元史 (NAGAO, Motoshi)

国立障害者リハビリテーションセンター
(研究所)・研究所 運動機能系障害研究
部・研究室長

研究者番号：00359671

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：