

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870618

研究課題名(和文) 終脳NG2細胞のアストロサイト分化能におけるNkx2.1の役割の解析

研究課題名(英文) The role of Nkx2.1 in differentiation of NG2 cell-derived astrocyte

研究代表者

後藤 仁志 (Gotoh, Hitoshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20462202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：NG2細胞は、オリゴデンドロサイトの前駆細胞であるが、発生期においてアストロサイトに分化することが知られていた。NG2細胞由来のアストロサイト内側基底核原基(MGE)の近傍に位置することから、MGEの神経幹細胞が発現するNkx2.1転写因子がその分化能を制御している可能性が考えられた。そこで、Nkx2.1ノックアウトマウスのNG2分化能を解析したところ、NG2由来アストロサイトの分化には影響が認められなかった。そこで、スライス交換培養を用いて、MGEより背側の外側基底核原基(LGE)のNG2細胞がアストロサイトへの分化能が高いことを見出した。

研究成果の概要(英文)：NG2 cells are oligodendrocyte progenitor cells in the adult brain, but they differentiate into astrocytes(AS) as well in the embryonic ventral telencephalon. In order to analyze the molecular mechanism of NG2 cells differentiation into AS, we analyzed NG2 cell differentiation in Nkx2.1 KO mice that is an essential transcription factor for ventral telencephalic development. We found that differentiation of NG2 cells into AS was not changed in Nkx2.1 KO mice. Moreover, we performed slice transplant assay to identify the AS generating NG2 cells. We found that cells in lateral ganglionic eminence (LGE) that is located dorsal to Nkx2.1-expressing area are the source of NG2-derived AS. We are now analyzing the molecular mechanisms that regulate AS generation from LGE-derived NG2 cells.

研究分野：神経発生学

キーワード：発生 大脳皮質 NG2細胞 グリア細胞 アストロサイト オリゴデンドロサイト 分化 転写因子

1. 研究開始当初の背景

NG2 細胞は、オリゴデンドロサイトに分化する前駆細胞である。一方で、特定の脳領域においては神経細胞や、アストロサイトに分化する能力を持った特殊な細胞であることが報告されているが、その可塑性を制御するメカニズムについては全く知られていない。発生期の終脳の腹側に存在する NG2 細胞は、アストロサイトにも分化することが報告されていたが、その分化を制御する分子メカニズムは不明であった。

発生期の腹側終脳には、内側基底核原基(MGE)と外側基底核原基(LGE)という異なる領域から、違ったタイプの神経細胞が生まれ出される。研究代表者と米国コネチカット大学の Nishiyama 博士の共同研究により、NG2 細胞由来のアストロサイトは、MGE の近傍に多く認められたことから、MGE の神経幹細胞に特異的に発現する転写因子である Nkx2.1 が NG2 細胞由来のアストロサイト分化に影響するのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、NG2 細胞の分化可塑性を決定するメカニズムを解析するために、MGE に存在する神経幹細胞に発現する Nkx2.1 に着目して、Nkx2.1 の過剰発現や遺伝子欠損によって NG2 細胞の分化能がどのように変化するかを *in vivo* において解析する。

これらの解析をもとに、NG2 細胞の分化可塑性を制御する分子メカニズムを明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究では研究リソースの導入など、米国コネチカット大学の Nishiyama 博士の共同研究により遂行した。具体的な方法を以下に示す。

1) 遺伝子改変マウスを用いた NG2 細胞分化における Nkx2.1 転写因子の役割

NG2-Cre トランスジェニックマウスと Cre 依存的に GFP 遺伝子を発現する Z/EG マウス、更に Nkx2.1 の欠損マウスを交配して遺伝子改変マウスを作出した。これを交配し、それぞれの時期における NG2 細胞の分化に与える表現型を解析した。

2) スライス培養系を用いた NG2 細胞のアストロサイト分化能の解析

胎生 14.5 日齢の NG2-Cre:Z/EG マウスよりスライスを作製し、MGE および LGE 領域を切り出す。これを、同じ発生段階の野生型マウスより作製した脳スライスの MGE および LGE に

移植し、GFP で標識される NG2 細胞がどの細胞に分化するかを解析する。

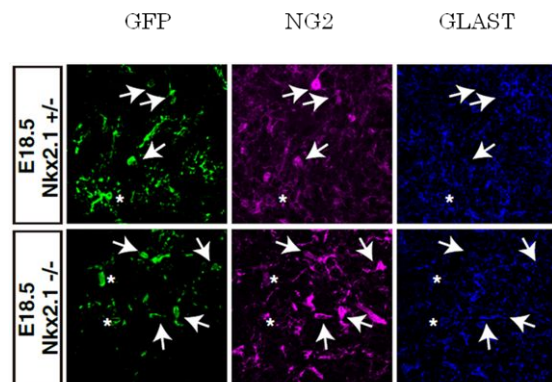
3) Nkx2.1-cre / Z/EG マウスを用いた MGE 由来 NG2 細胞の細胞系譜解析

胎生 13.5 日齢の Nkx2.1-Cre:Z/EG マウスに NG2 プロモーター制御下に flippase(flp)を発現するプラスミドと、flp 依存的に赤色蛍光タンパク質である DsRed を発現するプラスミドを子宮内電気穿孔法で終脳腹側に導入し、GFP/DsRed で標識される細胞の分化を解析し、実際に Nkx2.1 系譜の NG2 細胞がアストロサイトに分化するかを *in vivo* で解析する。

4. 研究成果

1) 遺伝子改変マウスを用いた NG2 細胞分化における Nkx2.1 転写因子の役割

NG2-Cre:Z/EG および Nkx2.1 欠損 NG2-Cre:Z/EG マウスにおいて、NG2 細胞の分化を胎生 18.5 日齢で解析した。その結果、野生型、Nkx2.1 ノックアウトマウスにおいても NG2 細胞(下図、矢印)および GLAST 陽性のアストロサイト(下図、アスタリスク)が一定の割合で存在することが分かった。



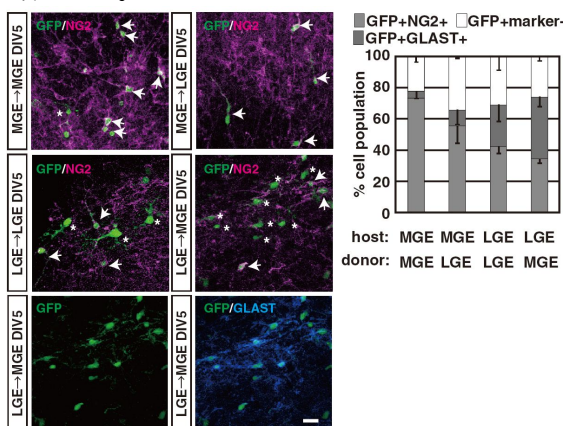
このことは、NG2 細胞の分化可塑性を決定する主なファクターが Nkx2.1 転写因子ではないことを示している。

2) スライス培養系を用いた NG2 細胞のアストロサイト分化能の解析

次に、MGE および LGE 由来の GFP を発現する NG2 細胞を野生型のスライスの MGE もしくは LGE に移植し、NG2 細胞の分化能を決定した。下図のグラフのように、LGE 由来の NG2 細胞を MGE もしくは LGE に移植した場合、アストロサイトに分化する細胞の割合が多いことを見出した。一方、MGE 由来の NG2 細胞を MGE もしくは LGE に移植してもアストロサイトに分化する割合が少ないことを見出した。

これらの結果から、NG2 細胞由来のアストロサイトの主な発生源は LGE である可能性が示

唆された。



3) Nkx2.1-cre / Z/EG マウスを用いた MGE 由来 NG2 細胞の細胞系譜解析

既に他のグループから報告されている NG2 細胞特異的プロモーター制御下に Flp を発現するプラスミドを構築し、子宮内穿孔法を用いて in vivo に導入したところ、標識されるはずのない神経細胞が標識された。更に解析を行ったところ、NG2 プロモーターは NG2 細胞特異的でないことを見出した。そのため、NG2 細胞特異的に遺伝子発現を可能とする目的で、NG2 遺伝子座において様々な生物種間で保存された領域をスクリーニングし、NG2 エンハンサー領域を同定した。現在この領域の制御下に flp を発現するプラスミドを構築している。また、この NG2 エンハンサーのクローニングを投稿論文としてまとめている。

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 1 件)

中枢神経系の発生における細胞の分化と系譜解析

後藤仁志、小野勝彦

京府医大誌 (査読無し)122 (6), 361 ~ 370, 2013

[学会発表](計 2 件)

1) Hitoshi Gotoh, Tadashi Nomura, Katsuhiko Ono, and Akiko Nishiyama
NG2 細胞を規定するエンハンサー領域の同定とその調節因子の解析
神経科学学会大会(横浜、9/6/2014)

2) Hitoshi Gotoh, Tadashi Nomura, Katsuhiko Ono, and Akiko Nishiyama

Identification and characterization of novel intronic enhancer elements of the mouse Cspg4 gene in oligodendrocyte lineage cells
Annual meeting of society for neuroscience (Washington DC, USA 11/18/2014)

[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:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤 仁志 (Gotoh Hitoshi)

京都府立医科大学大学院医学研究科神経発生生物学・助教

研究者番号: 20462202

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

小野 勝彦 (Ono Katsuhiko)

京都府立医科大学大学院医学研究科神経発生生物学・教授

研究者番号: 30152523

野村 真 (Nomura Tadashi)

京都府立医科大学大学院医学研究科神経

発生生物学・准教授

研究者番号：10323007