

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 4 月 24 日現在

機関番号：87207

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640013

研究課題名（和文）神経幹細胞ニッチ可視化システムの開発

研究課題名（英文）Development of Visualization System for Neural Stem Cell Niche

研究代表者

神吉 浩明（KANKI, Hiroaki）

地方独立行政法人佐賀県医療センター好生館（ライフサイエンス研究所）・ライフサイエンス研究所・研究員

研究者番号：80321751

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：「成体哺乳類内の神経（あるいはその他の細胞種の）幹細胞ニッチの正確な同定」のためのパイロットツールとして、蛍光蛋白を利用して『神経幹細胞を取り囲む細胞』を標識するシステムの開発に挑戦した。簡単には、蛍光ペプチドを神経幹細胞から放出させ、それを速やかに周囲の細胞に取り込ませることにより、「神経幹細胞を取り巻く、すなわち、神経幹細胞ニッチを構成する細胞群に相当する細胞を蛍光によってラベルする」というアプローチである。その結果、神経幹細胞を取り巻く細胞が想定通りに蛍光でラベルされ、同定可能であることを確認できた。しかしながら、その蛍光の強度は予想よりも低く、今後更なる改良を要することも判明した。

研究成果の概要（英文）：As a pilot system for precise identification of neural (or other cell types of) stem cell niches in adult mammals, I tried in this study to develop a visualization system for “neural stem cell (NSC)-surrounding cells,” utilizing fluorescent proteins. Briefly, a fluorescent peptide is to be secreted from NSCs and then immediately taken up by the surrounding cells, which are a counterpart for NSC niche-constituting cells. Through a set of evaluation processes, I confirmed that NSC-surrounding cells were indeed fluorescently-labeled, as planned. The intensity of the fluorescence, however was much lower than expected, suggesting that the system needs additional modifications.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：神経幹細胞 ニッチ

1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞は、それを取り巻く微小環境・ニッチの中に存在していると考えられている。しかしながら、その言葉自体は広く使われているものの、ニッチの正確な実体はいまだ十分には把握されていない。その最大の理由の1つは、「神経幹細胞周囲のどの領域がニッチなのか?」が明確でないことである。それは、「ニッチ構成細胞を同定するためには特異的なマーカーが不可欠であるが、そのためには当該細胞の同定が必要である」という「ニワトリが先か、卵が先か」的ジレンマによるところが大きい。

神経幹細胞に関しては、特異的なマーカーがこれまでにいくつか報告されているため、その同定は比較的容易である。申請者も、そのような蛋白の1つである nestin の遺伝子のエンハンサー+プロモーター断片とオレンジ色蛍光蛋白・Kusabira-Orange (KOr) の組み合わせを用いて、神経幹細胞可視化のための (nestin/KOr) トランスジェニックマウスを作製した (Kanki et al. 2010)。そのマウスでは、成体脳においても神経新生が継続する海馬の歯状回や側脳室下帯にオレンジ色の蛍光を発する神経幹細胞が点在していることが示された。それら神経幹細胞の周囲がすなわちニッチであると考えられる。そのようなニッチを構成する細胞を同定するためのシステムを構築できないだろうか?

2. 研究の目的

神経系を含む各種の固形組織の幹細胞は、『ニッチ』と呼ばれる微細環境の中に存在していると考えられている。ニッチは決して静的なゆりかごではなく、幹細胞との間で分子シグナルをやり取りすることで、それらの維持や分裂、分化の制御に能動的に関与していることが示唆されている。したがって、それらのシグナルを解析し、人為的に制御することで、例えば分裂を促進して多くの神経幹細胞を一気に調製することや、あるいは、がん幹細胞の維持を停止してがんの再発や転移を抑制することが可能になるかも知れない。上記の通り、幹細胞ニッチの実体を正確に把握することは現時点では容易ではなく、それが、幹細胞-ニッチ間のシグナル解析を難しくしている。幹細胞ニッチの領域を正確に決めることが困難であるならば、最初の一步として大まかな近似を使い、その後徐々に精度を上げていくことが次善の策であると思われる。本研究ではまず、神経幹細胞ニッチを「神経幹細胞を取り囲んでいる細胞群」とゆるやかに定義する。その上で、「神経幹細胞を基点として、そこから周囲の細胞にラベリングのためのレポーター蛍光蛋白を送り込む」という新規アプローチで、神経幹細胞に接している、あるいは、極めて近距離にある細胞群を可視化するシステムの開発を試みる。それらのニッチ構成細胞群 (少なくともその一部) を、それらが発する蛍光を指標と

して分離し、その遺伝子発現を解析することで、神経幹細胞ニッチ特異的なマーカー候補の同定が可能になるものと期待する。最終的なゴールは神経幹細胞とそのニッチの間との分子シグナルの全容解明であるが、それは本研究以降の目標となる。

3. 研究の方法

(1) レポーター (『RelCat』) コンストラクトの作製及び評価
汎用プロモーター (ヒト EF) の下流に2色 (緑及び赤) の融合蛍光ペプチド (下図) のコーディングシーケンス (CDS) をつないだコンストラクトを作製する。このコンストラクトをヒト胎児由来肝細胞株 HEK293T に導入し、蛍光強度、及び、それぞれの蛍光の分離を検証する。

Igk LS FP1 TAT IRES FP2 3×NLS

(2) 遺伝子発現制御領域の選択

いくつかの神経幹細胞特異的な遺伝子発現制御領域候補の断片を入手し、それぞれに適切なレポーター遺伝子を結合する。それらをヒト神経幹細胞株に導入し、その後細胞塊 (ニューロスフェア) を作り、活性を三次元で評価する。

(3) RelCat コンストラクトの作製と評価

上記(2)で選ばれたベストな遺伝子発現制御領域の下流に、(1)で選択されたベストな融合蛍光ペプチドコンビネーション CDS をつなぎ、神経幹細胞用の RelCat レポーター発現コンストラクトを作製する。そのコンストラクトを(2)で使用した神経幹細胞株ニューロスフェアを用いて評価する。

4. 研究成果

(1) レポーター (『RelCat』) コンストラクトの作製及び評価

赤-オレンジ色蛍光蛋白: mCherry (UCSD Tsien 研究室)、FusionRed (Evrogen 社)、及び mK01 (理化学研究所脳総研宮脇研究室)

緑色蛍光蛋白: EGFP (Clontech 社)、mAG1 (Amalgam 社)、TagGFP (Evrogen 社)

から、赤 (FP1)-緑 (FP2)、緑-赤 (同) それぞれ3種類ずつ、計6種類の融合蛍光ペプチド CDS を準備した。それらを哺乳類細胞用のプラスミド発現ベクター pEF/myc/nuc (Invitrogen 社) に挿入し、ヒト胎児由来肝細胞株 HEK293T に導入して、それぞれの蛍光強度及び2色の蛍光の分離を検定した。その結果、赤-緑では mCherry-EGFP、緑-赤では mAG1-mCherry コンストラクトが、蛍光強度、蛍光色の分離共にベストであることが判明した。

(2) 遺伝子発現制御領域の選択

検定した遺伝子発現制御領域は次の4種類:

ラット nestin 遺伝子プロモーター+エンハンサー (東京大学森研究室) マウス Sox2 プロモーター (University of Milano-Bicocca Nicolis 研究室) ヒト CD133 プロモーター『P5』 (北海道大学山中研究室) 及び、ヒト CD44

プロモーター（MIT Weinberg研究室。Addgene 経由）。それぞれの下流にレポーター遺伝子 EGFP の CDS をつなぎ、レンチウイルスベクター発現システム（理化学研究所バイオリソースセンター三好博士）を用いてヒト胎児神経幹細胞株 oh-NSC-7-fb（独立行政法人国立病院機構大阪医療センター金村博士）のニューロスフェアに導入、評価した。その結果、EGFP 蛍光の強度は以下の順番であることが判明した。

CD133 > CD44 > Sox2 > nestin

CD133： 比較的強いシグナルが検出された。

CD44： シグナルは非常に弱く、実用レベルではない。

Sox2： かるうじて検出できる程度。

Nestin： 事実上シグナルは検出できなかった。

Sox2 及び nestin は神経幹細胞のラベリングにこれまで広く使用されてきた、実績のある遺伝子発現制御領域なので、この結果は予想とは大きく異なるものである。それが遺伝子発現制御領域の種特異性によるものなのか、レンチウイルス発現システムとの互換性に難があるためか、それとも、全く別の理由によるものなのかは現時点では不明であり、将来的な解明が待たれる。

(3) RelCat コンストラクトの作製、評価

(1) でベストな結果を示した mCherry-EGFP 及び mAG1-mCherry の 2 つの CDS を、(2) で最も活性の高かったヒト CD133 プロモーターの下流につなぎ、上記レンチウイルス発現システムを使って同様に評価した。その結果

・ mCherry-EGFP

神経幹細胞が強い緑、その周囲の細胞が赤色の蛍光でラベルされていることが確認できた。しかしながら、その蛍光強度には大きな違いがある。両者の強度を同等にするには、後者の露光時間を少なくとも 1 オーダー長くする必要がある。

・ mAG1-mCherry

神経幹細胞は強い赤色でラベルされていたものの、その周囲の細胞はほとんど蛍光を発していないことが判明した。この結果は の結果とは大きく異なる。それが細胞株の違いに起因するものなのか、あるいは、プラスミドとレンチウイルスという発現システムの差異によるものか、それとも、全く違う原因が存在するのかは、現時点では不明である。これらの結果より、ヒト神経幹細胞とレンチウイルス発現システムの組み合わせを使う場合、mCherry-EGFP コンビネーションが事実上唯一の選択肢となる。しかしながら、現状ベストであるそのコンビネーションにおいてさえ、神経幹細胞を取り巻く、すなわち、神経幹細胞ニッチ構成細胞に相当する細胞群をラベルする mCherry の蛍光強度は、それが内包する神経幹細胞の EGFP 由来蛍光のそれよりも少なくとも 1 オーダーは弱い。そのため、残念ながらこのシステムのパフォーマンスは、現時点ではセルソーティングによる細胞分取に十分なレベルとは言えない。

今後は 最新の蛍光蛋白リストから、本研究で用いた 6 種類よりも更に蛍光強度が高い可能性があるものを選び検証する、 蛍光ペプチドのタンデム化や変異導入により蛍光強度を上げる、 蛍光蛋白に結合している各種の機能ペプチドを変更あるいは改変し、幹細胞からの放出や周囲の細胞への取り込みの効率を上げる、更には、 より活性の高い神経幹細胞特異的な遺伝子発現制御領域を探索する、等の改良により、このシステムのパフォーマンスをセルソーティングに使えるレベルまで上げることに注力する。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

神吉 浩明 (KANKI, Hiroaki)

地方独立行政法人佐賀県医療センター
生館(ライフサイエンス研究所)・ライフ
サイエンス研究所・研究員

研究者番号：

80321751

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()