

「生物の発生・分化・再生」
平成12年度採択研究代表者

岡野 栄之

(慶應義塾大学医学部 教授)

「幹細胞システムに基づく中枢神経系の発生・再生研究」

1. 研究実施の概要

哺乳類の中枢神経系は、以下のような素過程を経てstep-wiseに進行していく

- A) 神経幹細胞から多様な種類のニューロンとグリアの誕生
- B) これらの細胞の然るべき場所への移動
- C) ニューロン同士の特異的なシナプス結合によるネットワークの形成

これらの現象を中心とした中枢神経系の発生の制御機構の解明は、古くからの神経発生学の中心命題である。一方、事故や変性疾患などにより損傷した中枢神経系を蘇らせ、再生させることは、現代医学の最も重要な研究課題のひとつである。この2つの学問領域の進展により、両者が極めて近い関係にあることが明白になってきている。

我々の研究は、長年にわたりモデル生物系を用いた神経発生過程における細胞運命決定機構の解析が中心であったが、最近になり神経系の再生医学的な応用への接点が大きくなってきている。我々は10年ほど前に、ショウジョウバエの神経前駆細胞の非対称性分裂の制御因子であるRNA結合蛋白質Musashiを同定し、解析を行ってきた。このMusashiの哺乳動物相同因子(Musashi1)は、神経幹細胞に選択性高く発現する分子である。このMusashi1を指標に、成人脳にも神経幹細胞が存在することを示すことができた。この発見を経緯に、幹細胞が存在しながらも成人中枢神経系の再生能力が低いのは何故か？ 神経系の機能再生を起こすためには何をすべきか？といった中枢神経系の再生医学的な方向の研究を始めるに至った。

神経再生とは、ニューロンの新生を含む神経機能の再生を指すものである。申請者は、再生とは正常発生の過程を少なくとも一部を再現することであり、神経再生の一つの光明となり得る研究戦略は、脳と神経系の発生研究の中から生まれてくるものと確信し、神経発生制御機能の基礎研究を深めることにより、神経再生のための新しいtacticsを確立したいと考えている。

では、幹細胞が存在しながらも再生能力の極めて低い哺乳類中枢神経系において、神経再生を有効におこさせるためにはどうしたらよいか？ 神経発生の原点にもどり神経幹細胞の未分化状態とそこからの分化系譜がどのように制御されているかを

研究することにより、中枢神経系の発生と再生を“crosslink”する研究戦略を確立できると考え、以下の項目の研究を開始した。

- (1) 神経幹細胞の未分化状態・多分化能の維持と分化の制御機構
- (2) 神経幹細胞、中間前駆細胞、特定タイプのニューロンの選択的分離法の確立
- (3) 胚性幹細胞からの特定ニューロンのin vitro 分化誘導と選択的分離
- (4) 神経疾患モデル動物への細胞移植による細胞補充とニューロンネットワーク再建による機能修復の試み

2. 研究実施内容

- (1) 神経幹細胞の未分化状態・多分化能の維持と分化の制御機構（岡野・小川）：
＜狙いと実験計画＞ 成体哺乳類中枢神経系において、神経幹細胞が存在しながらも再生能力が低い理由を解明し、将来的には内在性神経幹細胞の活性化による神経再生の誘導につなげることを目標に、幹細胞が未分化状態で維持されるメカニズム、特定の細胞への分化制御メカニズムを解明する。我々は、Nestin-EGFPレポーターを用いた神経幹細胞のprospectiveな同定と神経幹細胞活性の可視化技術の確立に成功している。また、哺乳類の脳皮質から分離した神経上皮細胞の単一細胞の培養法を開発した。この培養を用い、Nestin-EGFPトランスジェニックマウス由来の神経上皮から、クラス異なる錐体ニューロンならびにグリア細胞を発生させることにも成功している。さらに、このシステムと各種遺伝子のノックアウトマウスの解析を通じ、Musashi1およびNotchシグナルが神経幹細胞の自己複製能を正に制御し、神経幹細胞からニューロン系列へのcommitmentを抑制していることを明らかにした。また、この神経上皮細胞から分離した核を、脱核した受精卵に核移植したところ、ES細胞から分離した核よりもより高率に、健全なクローン動物が作製できることを最近明らかにした（小川ら投稿中）。このことは、神経上皮細胞が全能性の核を保有した細胞であることを示している。

そこで、(1)単一神経上皮細胞の培養法をもちいて、哺乳類における神経幹細胞の自己複製・非対称性分裂・ニューロン発生に関わる内因性ならびに外因性の因子を解析し、神経発生の機構を明らかにしていく。(2)全能性を保有する神経上皮細胞をin vitroで増やす操作を開発する。このようにして得られた細胞が神経組織の修復と再生に応用できないか検討する。

- ＜実施内容＞ 我々は、神経幹細胞の自己複製能と分化を制御する因子として、Musashi1とNotchシグナルの役割の解析を行った。神経幹細胞に強く発現しているRNA結合性タンパク質であるMusashi1(Msi1)が、神経幹細胞の自己複製能を正に制御していることが以下の実験結果から明らかになった。Msi1の神経系幹細胞における役割を推定するために、我々RNA結合蛋白質と

してのMsi1蛋白質に着目し、Msi1蛋白質が結合し制御していると考えられる下流標的RNAの同定を試みた。

Msi1組み換え蛋白質が結合するRNAのコンセンサス配列をin vitroのSELEX法により明らかとし、その結合特性をゲルシフト法等により検討したところ、Msi1は特定のRNA配列(G/A)UnAGU, n=2 or 3に強く結合することが明らかとなった(Kd = $\sim 10^{-9}$ M)。興味深いことに、このコンセンサス配列はMsi1と同様に神経系の前駆細胞に発現し細胞系譜の形成に関与しているとされるm-Numb mRNAの3'-UTRに存在することが明かとなった。さらにin vitroの系であるfilter binding assay等により、これらのmRNAの3'-UTRはMsi1蛋白質と相互作用することが確認された。

さらにNIH-3T3細胞にMsi1遺伝子を導入し、免疫沈降後、沈降産物中にm-Numb mRNAが存在するかどうかを検討した結果、Msi1蛋白質とm-Numb mRNAはin vivo(細胞内)で複合体を形成していることが明かとなった。

また、luciferase活性をレポーターとして用いたassayでは、Msi1蛋白質は、m-Numbの発現を翻訳レベルで抑制していることが明かとなった。

m-Numbは細胞内Notchアンタゴニストであるため、Msi1はm-Numbの翻訳抑制を介してNotchシグナルを活性化しているものと予想された。そこでHes1-luciferase活性を指標に、活性化型NotchとともにNIH3T3に導入した外来性Msi1によるNotchシグナルへの影響を検討したところ、外来性Msi1はNotchシグナルを活性化させることが明かとなった。Notchシグナルは、神経幹細胞の生存と自己複製能に必須の役割をしているため、Msi1,2の機能的double ノックアウトによりneurosphereの形成効率の低下、すなわち神経幹細胞の生存と自己複製能が低下することは、これでよく説明できる。

(2) 神経幹細胞、中間前駆細胞、特定タイプのニューロンの選択的分離法の確立(岡野):

<狙いと実験計画> 中枢神経系では、神経幹細胞 - 神経前駆細胞 - 幼弱ニューロン - 特定ニューロンという系譜を経て分化が進行するが、これまでは脳組織よりこれらの細胞を直接分離する方法がないため、特定の個性を持ったニューロンへの分化誘導機構に関しては、十分な研究ができなかった。そこで本研究では、神経幹細胞、中間の前駆細胞、特定タイプのニューロンの選択的な分離法を確立する。

<実施内容>

A) GFPレポーター遺伝子を用いた分離技術: ニューロンは、多能性の神経幹細胞からニューロンのみを産み出す中間的前駆細胞(ニューロン前駆細胞)を経て特定のニューロンへ分化すると考えられている。ニューロン前駆細胞

は多能性神経幹細胞よりも効率よくニューロンへ分化するため、神経疾患の細胞移植療法への応用が期待される細胞と言える。しかしながら、このニューロン前駆細胞に特異的に発現する細胞表面マーカーがないため、従来この細胞を生きたまま同定・分離することは不可能であった。我々はニューロン前駆細胞を可視化し生きたまま分離することを目的として、蛍光波長の異なる2つのGFP変異体EGFPとEYFPを、ニューロン分化初期過程の互いに重複した異なる時期に発現する2つの遺伝子NestinとT α 1の制御下で発現するトランスジェニックマウスを作出した。Nestin-EGFPは、多能性神経幹細胞で最も強く発現し、ニューロンまたはグリアへの分化と共にその発現が低下した。一方、T α 1-EYFPは増殖性のニューロン前駆細胞と幼弱なニューロンのみに発現し、多能性神経幹細胞とグリア細胞には発現しないことが明らかになった。Nestin-EGFPとT α 1-EYFPの両方を有するトランスジェニックマウスの胎仔神経系組織より、EGFP/EYFP二重陽性細胞をFACSによって分離し解析したところ、効率よく分裂してニューロンのみに分化することが明らかになった。こうしたニューロン前駆細胞の分離法はニューロン分化制御機構の研究や新たな神経疾患治療法の開発に役立つものと考えられる。

(3) 胚性幹細胞からの特定ニューロンのin vitro 分化誘導と選択的分離 (岡野)

<狙いと実験計画> 多くの神経変性疾患では、特定タイプのニューロンが変性・脱落するため、本研究ではこれらを試験管内で分化誘導し、大量調整する技術を開発する。しかし、神経幹細胞の核は全能性を有しているものの、筋萎縮性側索硬化症(ALS)において変性が起きる運動ニューロンや、小脳変性症において変性しているプルキンエ細胞等、発生の初期段階でのみで生産されるニューロンを神経幹細胞から試験管内で誘導することは、実際的には困難であることが経験的に判ってきた。そこで、ES細胞からの分化誘導法を確立し上記項目(2)で確立した分離技術を駆使し、選択的な分離を行う。単に分化誘導するのみならず、自ら樹立してきた選択的細胞分離法と組み合わせた技術開発を行い、疾患モデルへ移植するための細胞を調整することができる点が本研究の特色である。

<実施内容> ES細胞から運動ニューロン等を誘導する系を確立できた。詳細は論文未発表のため、省略。

(4) 神経疾患モデル動物への細胞移植による細胞補充とニューロンネットワーク再建による機能修復の試み (岡野)

<狙いと実験計画>

上記の実験により分離した神経幹細胞、神経前駆細胞、特定のニューロンを下記のような各種神経変性疾患のモデル動物の損傷部位へ移植し、機能修復の

ためのtacticsを検討する。

- 1．パーキンソン病 / 6-OH ドーパミン投与ラット
- 2．脊髄損傷 / 頸髄損傷ラット
- 3．網膜変性症 / retinal degenerationマウス
- 4．筋萎縮性側索硬化症モデルマウス
- 5．小脳変性症 / pcdマウス / L7-EGFP陽性細胞

<実施内容>

A) 中脳ドーパミンニューロンの分離・濃縮法の確立とするパーキンソン病モデル動物への移植：中脳腹側部に分布するドーパミンニューロンは、運動調節を初めとする様々な機能を有している。このニューロンの変性脱落を主な原因とするパーキンソン病の治療にはドーパミンニューロンの移植療法が有効であるが、ドナーとして用いるヒト胎児中脳組織の入手が困難であるために広く普及することは望めない。ドーパミンニューロンの発生機構・機能の研究、さらにはパーキンソン病の治療法の開発のためには、ドーパミンニューロンそのものを生きたまま同定・分離することが必要であるが、それは従来の技術では不可能であった。我々は、tyrosine hydroxylase(TH)遺伝子のプロモーターの制御下でEGFPを発現するトランスジェニックマウスからドーパミンニューロンをEGFP陽性細胞として生きたままセルソーターを用いて分離した。分離した細胞を6-OHDAによるパーキンソン病モデルラットに移植したところ、ホスト線条体内に生着し、アンフェタミン投与によって誘発される回転運動を改善させた。こうして、パーキンソン病様の症状を回復させる能力を持った機能的なドーパミンニューロンをEGFPを用いて標識し分離することに成功した。このようにして得られた細胞集団は、ドーパミンニューロンの分子細胞生物学的な研究において貴重な材料を提供するものと考えられる。また、この技術は様々な細胞を含む培養細胞集団からパーキンソン病治療に必要なドーパミンニューロンを選択的に分離する際にも役立つものと思われる。

B) 胎仔中脳腹側部より直接分離した神経系前駆細胞の成体脳内におけるドーパミンニューロン産生能の解析：海外でパーキンソン病患者への移植に用いられているヒト胎児中脳腹側部組織には、神経系前駆細胞と未熟なドーパミンニューロンが含まれている。試験管内で増幅させた神経系前駆細胞の移植実験後のドーパミンニューロンへの分化効率が非常に低いことから、従来、胎児組織移植による機能回復は主として移植前から既に存在していたドーパミンニューロンが生着したことによるものであると考えられていた。我々は、Nestin-EGFPマウスおよびラットの胎仔中脳腹側部より神経系前駆細胞

を直接分離して、その機能を解析した。セルソーターによって分離したEGFP強陽性の細胞は、神経系前駆細胞のマーカー分子を発現し、一方ドーパミンニューロンのマーカーは発現していないことを確認した。これらの細胞は試験管内で増殖した後にドーパミンニューロンに分化した。分離したEGFP強陽性細胞を直接6-OHDAによるパーキンソン病モデルラットの線条体へ移植し、BrdUを一定期間投与した後に解析を行ったところ、宿主組織中で増殖した後でTH陽性のドーパミンニューロンに分化したことが確認された。移植を行った全ての個体においてアンフェタミン投与によって誘発される回転運動の改善が認められた。これらの結果より本来胎仔中脳腹側部の神経前駆細胞には成体脳線条体中でドーパミンニューロンへ分化する能力が備わっていることが証明された。前駆細胞の移植では宿主組織内での自己複製が期待でき、軸索伸長の能力も成熟したニューロンより優れていることが予想される。従って、ドーパミンニューロンへの分化能を低下させずに試験管内で増殖させる方法、あるいは移植後のドーパミンニューロンへの分化を促進する方法が改善されれば、神経系前駆細胞はパーキンソン病治療のための優れた材料となるものと考えられる。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Okano, H., Hirano, T. and Balaban, E. : Learning and memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 97, 12403-12404 (2000)

Okano, H. and Goldman, S.A. : Identification and selection of neural progenitor cells. *NeuroScience News* 3, 27-31 (2000)

Nguyen, T.Q., Sawa, H., Okano, H. and White, J.G. : The *C. elegans* septin genes, *unc-59* and *unc-61*, are required for normal postembryonic cytokineses and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis. *J. Cell Sci.* 113, 3825-3837 (2000)

Yoda, A., Sawa, H. and Okano, H. : MSI-1, a neural RNA-binding protein, is involved in the male mating behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Genes to Cells* 5, 885-895 (2000)

Kawaguchi, A., Miyata, T., Sawamoto, K., Takashita, N., Murayama, A., Akamatsu, W., Ogawa, M., Okabe, M., Tano, Y., Goldman, S.A. and Okano, H. : Nestin-EGFP transgenic mice : visualization of self-renewal and multipotency of the CNS stem cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 259-273 (2001)

Oishi, I., Iwai, K., Kagohashi, Y., Fujimoto, H., Kariya, K., Kataoka, T., Sawa, H., Okano, H., Otani, H., Yamamura, H. and Minami, Y. : Critical role of a *C.elegans* CDS1-related kinase in meiotic recombination. *Mol. Cell Biol.* 21, 1329-1335

(2001)

Hisahara, S., Yuan, J., Momoi, T., Okano, H. and Miura, M. : Caspase-11 mediates oligodendrocyte cell death and pathogenesis of auto-immune mediated demyelination. *J. Exp. Med.* 193, 111-122 (2001)

Kishi, N., Tang, J., Maeda, Y., Ito, M., Suzuki, S., Kinoshita, T., Kadesch, T., Hui, C-C., Atravanis-Tsakonas, S., Okano, H. and Matsuno, K. : Murine homologs of *deltex* define a novel gene family which is involved in vertebrate Notch signaling and neurogenesis. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19, 21-35 (2001) *H. Okano is the corresponding author in this paper)

Toda, M., Iizuka, Y., Yu, W-J., Ikeda, E., Yoshida, K., Imai, T., Kawase, T., Kawakami, Y., Okano, H. and Uyemura, K. : Expression of the neural RNA-binding protein Musashi 1 in human gliomas. *Glia* 34 ,1-7 (2001)

Mori, H., Sakakibara, S., Imai, T., Nakamura, Y., Iijima, T., Suzuki, A., Yuasa, Y., Takeda, M. and Okano, H. : Expression of mouse *igf2* mRNA-binding protein 3 and its implication in the developing central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 64, 132-143 (2001)