

「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生理学教室)

「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

[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

- (A) 神経幹細胞に強く発現するRNA結合蛋白質Musashiファミリーの機能解析
- (B) 神経幹細胞の長期維持機構に関する研究
- (C) Huタンパク質による神経幹細胞の分化制御機構の解明
- (D) ショウジョウバエ成虫型神経幹細胞をモデルとした幹細胞生物学
- (E) modifierによるNotch signalingの微細な調節
- (F) 大脳壁における神経幹細胞の分裂様式とニューロン産生ならびにその移動について
- (G) 大脳皮質神経細胞の層特異的運命決定の機構

[2] ES細胞より分化誘導した神経細胞のFACSによる分離・培養・移植

[3] 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

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

(A) 神経幹細胞に強く発現するRNA結合蛋白質Musashiファミリーの機能解析

musashi1, *musashi2*の二重ノックアウトマウスを作成したところ、胎生期の神経系組織の構築において細胞数の減少、皮質層構造の乱れが生じていることが明らかになった。また、小腸においては、HES1陽性であるcryptの幹細胞にMusashi1が強く発現していることが明らかとなった。現在、上皮性の幹細胞におけるMusashi1の役割について、上流のシグナルによる発現制御と蛋白質の機能の両側面から解析を行っている。さらにショウジョウバエ感覚母細胞 (Sensory Mother Cell) の非対称性分裂に必須である *Drosophila* Musashiは、非対称性分裂時の細胞極性に従って、非対称な蛋白質修飾がなされている可能性を示す知見を得た。

(B) 神経幹細胞の長期維持機構に関する研究

gp130、そして神経幹細胞のmitogenであるEGFのレセプターの下流で働くシグナル伝達分子であり、MAP kinase経路の活性化に関与しているGab1の欠失変異体マウスにおける神

神経幹細胞の動態を含めた中枢神経系発生の異常を解析した。Gab1のホモ欠失変異体 (gab^{-/-}) 胎生12日目の脊髄におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞の数をolig2の発現によって野生型と比較したところ、有意に低下していた。また、脊髄における細胞増殖をBrdUの取り込みにより測定したところ、gab^{-/-}胎仔では有意な低下が観察された。また、線条体と同様にEGF依存的なneurosphereの形成はほとんど見られなかった。しかしながら、TUNEL法によって検出されるアポトーシスには変化が見られなかった。一方、胎生14日目の脊髄をCNTF存在下で単層培養し、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトの分化を観察したところ、gab^{-/-}細胞は野生型に比べてアストロサイトの分化マーカーであるS100とGFAPの発現、オリゴデンドロサイトの分化マーカーであるPLPの発現が亢進していた。以上の結果から、Gab1がオリゴデンドロサイト前駆細胞を含めた神経系前駆細胞の増殖に必要であり、その一方でアストロサイトおよびオリゴデンドロサイトの分化あるいは成熟を抑制することが明らかになった。

(C) Huタンパク質による神経幹細胞の分化制御機構の解明

神経幹細胞の増殖から神経分化へのスイッチングとそのタイミングを転写後調節によって制御していると考えられている神経特異的RNA結合タンパク質Huの生化学的および遺伝学的機能解析を行った。組み換えアデノウイルスによるHu強制発現系を使って培養細胞(293T細胞、Saos-2細胞および培養神経幹細胞)からHuとcomplexを形成する因子の精製・同定を試みた結果、RNA結合タンパク質であるhnRNPK、NF45、Musashi1、methyltransferaseの1つであるSKB-1など6つの蛋白質がHuと複合体を形成することが明らかとなった。今後これらの蛋白質複合体がどのように転写後調節に関わるのか、その分子メカニズムを明らかにしていく。一方、Huファミリーのうち、HuDおよびHuBを欠損するマウスを作製し解析した。HuD欠損マウスは正常に出生するが、運動失調、下肢の反射異常、体重増加不良を示す。発生過程の器官構築に大きな異常は認めないが、胎生10日目においては、第5、第8、第9脳神経の発生が野生型よりも遅延することが明らかになった。早期の神経前駆細胞に強く発現すると考えられるHuBの欠損マウスは、出生直後に死亡し、組織学的解析によって大脳皮質の発達が悪い上、ニューロンへの最終分化に障害があることを示唆する知見を得た。現在neurosphere assayにより、HuB欠損マウス由来神経幹細胞のin vitroにおける神経分化能を解析している。

(D) ショウジョウバエ成虫型神経幹細胞をモデルとした幹細胞生物学

Notch signalingは、その細胞内signalingのいくつかの段階において作用するmodifier因子によってコンテキスト依存的に調節されていると考えられている。ショウジョウバエでは、modifierの一つNumbはニューロブラスト(神経幹細胞)が非対称分裂する際にGMC(神経母細胞)側に受け継がれ、そこでNotchの細胞内domainと結合すると同時にendocytosisへ導くアダプターadaptinとも結合し負に調節していることがわかってきた。我々の研究で、成虫型神経幹細胞の分化過程においてNotchは成虫型神経幹細胞で発現し未分化状態を維持しているのに対し、NumbはGMC及びneuronで発現していることが明らかになったので、NumbがNotchをdownregulateすることが成虫型神経幹細胞に分化する

ために必要であると考えた。しかしNumbの発現だけではNotchをdownregulate するのに十分ではなく、Numbと共同して働くadaptinの発現が分化過程でよりtightに制御されており、adaptinとNumbの共発現が成虫型神経幹細胞の分化の場所とタイミングと対応していた。実際Numbと結合するもののendocytosis complexに導けないadaptinのdominant negative mutantでは成虫型神経幹細胞からneuronへの分化が著しく阻害されていた。現在、分化のkey factorであることがわかったadaptinの発現を制御する機構を解析中である。

(E) modifierによるNotch signalingの微細な調節

昨年Musashi1, Musashi2-ノックアウトマウスの解析からmusashiがngn+の内分前駆細胞からの α 細胞/ β 細胞の分化に関与する事を示したが、本年度はMusashi-1のpotentialなtargetであるmNumbの関与をあきらかにする第一段階として、少なくとも4つのisoformsが知られているmNumbの局在を調べた。mNumbのshort formは内分泌細胞の分化に伴ってupregulateされるのに対して、long formはdownregulateされることからmNumbはsplicing form 特異的な機能を果たしている可能性が考えられる。(F) 大脳壁における神経幹細胞の分裂様式とニューロン産生ならびにその移動について：<狙いと実験計画および実施内容>大脳壁でのニューロン産生とその初期移動については、従来、radial glial guidance説で説明されてきた。しかし、この概念が矛盾することが近年明かにされ、新たな正しい概念が待ち望まれている。大脳壁における神経上皮細胞(P)からニューロン(N)が発生する細胞分裂とこれに引き続いておこるニューロンの初期移動の細胞機構を、大脳皮質のスライス培養系を用いて調べた。(なを、今日ではradial glial cellsが神経上皮細胞そのものであることが実証されている)。培養条件を改良することによって、より長期にまた、P \rightarrow N+P分裂をより確実に記録することが可能になった。その結果、初期の皮質では、新生ニューロンは親のbasal processを引き継いで誕生し、このprocessの中を核が移動するtranslocationのモードで移動することを確認した。新生したPは新たなbasal processを軟膜側へと急速に伸長し、軟膜面に接着した後に再度細胞分裂相に入り新たな姉妹細胞を誕生させた。また多くの例で、親のbasal processと子のbasal processが遊離して存在した。このことは、ニューロンの移動が他細胞のradial glial fiber (今日では、basal process) に依存しないことを示している。これらの結果は、basal processを持つ神経幹細胞(P)からそのprocessを受け継いだNと、そうでないPが誕生すること(自己再生的である、細胞形態から非対称分裂)。Nは親のbasal processの方向に規定されてtranslocationのモードで移動すること。誕生したPは、新たなbasal processを再生し、その再生位置に規定されて、次世代のニューロンの移動が規定されることを示している。今回の研究から、従来のradial glial guidance説と全く異なった移動の概念を提出した。

[2] ES細胞より分化誘導した神経細胞のFACSによる分離・培養・移植

ES細胞より、ドーパミンニューロンを従来より効率的に産生できる神経幹細胞を含む神経前駆細胞を分化誘導するシステムを開発した。この分化誘導法によって得られるドーパミンニューロンは、神経幹細胞を含む神経前駆細胞を分化させた細胞の70%に達した。

次に、FACSによって分離したドーパミンニューロンを産生する能力のあるES細胞由来神経前駆細胞を6-OHドーパミンを用いて作製したパーキンソンモデルラットの線条体へ移植し、治療効果を行動学的に解析した。しかしながら、期待された十分な治療効果は得られなかった。そして、その原因を調べるために、移植細胞のホスト脳内における増殖・分化等について組織学的に解析を行ったところ、移植した前駆細胞の分化が不十分で、治療に必要な量のドーパミンニューロンが得られていなかったことが分かった。一方、運動ニューロンを従来より効率的に産生できる神経幹細胞を含む神経前駆細胞を分化誘導するシステムも開発した。具体的には、ES細胞を浮遊培養に移し、低濃度のレチノイン酸存在下でEmbryoid Body (EB)を形成させ、そこから神経幹細胞に選択的な培養条件を使って神経幹細胞を含む神経前駆細胞を増殖させた。これらの細胞をin vitroで分化させると、全細胞の約30%が運動ニューロンのマーカーであるHB9陽性であった。

[3] 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

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成熟型ニューロンへ分化するため、神経疾患を対象とした移植療法への応用が期待される。Nestinエンハンサー/プロモーター制御下でEGFPを発現するトランスジェニックマウスを作製し、EGFP陽性細胞をFACSによって分離したところ、効率よく分裂してニューロンに分化することが明らかになった。

また、変異型YFP (d4-Venus) を用い、新たなトランスジェニックマウスを作製したところ、脳質周囲層に強い発現が見られ、分化型ニューロンが存在する中間層で陰性であった。このことから、Nestin-d4-VenusはNestin-EGFPと比較し、より生理的なマーカーとなりうると期待される。

またHoechst33342というDNA結合色素による幹細胞分離法を試みたところ、SP細胞は神経幹細胞を含むnestin-EGFP強陽性細胞および弱陽性細胞にまたがって存在していること、成体神経幹細胞分画 (CD24^{low}/PNA^{low}) に含まれること、Notch1が約60%の細胞で発現されていることが明らかとなった。

さらに当研究室では大脳皮質形成時における神経幹細胞の性状解析を行うため、マウス胎児期の神経組織を認識する抗体を作製し発現クローニングを行ったところ、radial gliaを染色する抗体の一つが既知の膜タンパク質を特異的に認識していることを確認した。

[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

ヒト神経幹細胞Neural Stem Cells (NSC) は、長期間培養することによって増殖させることができるため、慢性期脳梗塞患者の神経学的機能の改善のための応用が期待されている。脳梗塞の治療への応用の可能性を検討するために、我々はヒト神経幹細胞・前駆細胞Neural Stem /Precursor Cells (NSPC) が濃縮されたニューロスフェアを70週以上の長期間に渡って培養した後に、虚血4日後のスナネズミ脳の障害部位に移植し、感覚運動と認知機能を4週に渡って評価した。NSPCを移植された動物では、培地のみを注入した動物と比較して、神経学的機能の改善が明瞭に認められた。NSCPを移植した動物の障害部位

の体積は、培地のみを注入した動物に比べ、著しく小さいことを明らかにした。移植されたNSPCの約8%が主として梗塞部位の周辺に生着し、MAP2, GFAPまたはNG2を発現していることを確認した。以上の結果から、長期培養後のNSPCは、虚血後のスナネズミ脳内で移動し、ニューロンおよびアストロサイトに分化し、神経学的機能を改善させる能力を保持しているものと考えられた。

3. 研究実施体制

- ①岡野栄之 研究グループ (慶応義塾大学医学部/生理学教室)
- ②研究題目：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
- ①小川正晴 研究グループ (理化学研究所 脳科学総合研究センター)
- ②研究題目：核移植による胎仔大脳皮質神経幹細胞の全能性

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文 (原著論文) 発表

I. 原著論文 (岡野チーム)

- Shibata M, Yamawaki T, Sasaki T, Hattori H, Hamada J, Fukuuchi Y, Okano H, Miura M.: Upregulation of Akt phosphorylation at the early stage of middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res.* 2002 28;942(1-2):1-10.
- Shu H-J, Saito T, Watanabe H, Ito J-I, Takeda H, Okano H and Kawata S: Expression of the Musashi1 gene encoding the RNA-binding protein in human hepatoma cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2002 26;293(1):150-4.
- Takasawa K, Kitagawa K, Yagita Y, Sasaki T, Tanaka S, Matsushita K, Ohstuki T, Miyata T, Okano H, Hori M, Matsumoto M.: Increased proliferation of neural progenitor cells but reduced survival of newborn cells in the contralateral hippocampus after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002 22(3):299-307.
- Cuadrado, A., Garcia-Fernandez, L.F., Imai, T., Okano, H. and Munoz, A.: Regulation of tau RNA maturation by thyroid hormone is mediated by the neural RNA-binding protein musashi-1. *Mol. Cell. Neurosci.* 2002 ;20(2):198-210
- Shamloula, H.K., Mbogho, M.P., Pimentel, A.C., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M.A., Hyatt, V., Okano, H. and Venkatesh, T.R.: *rugose (rg)*, a *Drosophila* A kinase anchor protein, is required for retinal pattern formation and interacts genetically with multiple signaling pathways. *Genetics* 2002 ;161(2):693-710
- Yagita, Y., Kitagawa, K., Sasaki, T., Miyata, T., Okano, H., Hori, T. and Matsumoto, M.: Differential expression of Musashi1 and nestin in the adult

- rat hippocampus after ischemia. *J. Neurosci. Res.* 2002 15;69(6):750-6.
- Ogawa, Y., Sawamoto, K., Miyata, T., Miyao, S., Watanabe, M., Toyama, Y., Nakamura, M., Bregman, B.S., Koike, M., Uchiyama, Y., Okano, H.: Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats.. *J. Neurosci. Res.* 2002 15;69(6):925-33
 - Murayama A, Matsuzaki Y, Kawaguti A, Shimazaki T, Okano H.: Flow cytometric analysis of neural stem cells in the developing and adult mouse brain.. *J. Neurosci. Res* 2002 15;69(6):837-47
 - Johansson CB, Lothian C, Molin M, Okano H, Lendahl U. : Nestin enhancer requirements for expression in normal and injured adult CNS. *J. Neurosci. Res.* 2002 15;69(6):784-94.
 - Kanemura, Y., Mori, H., Kobayashi, S., Islam, O., Kodama E., Yamamoto, A., Nakanishi Y., Arita, N., Yamasaki, M., Okano, H., Miyake, J. and Hara, M.: Evaluation of in vitro proliferative activity of human fetal neural stem/progenitor cells using indirect measurements of viable cells based on cellular metabolic activity.. *J. Neurosci. Res.* 2002 15;69(6):869-79.
 - Kuranaga, E., Kanuka, H., Igaki, T., Sawamoto, K., Ichijo, H., Okano, H. and Miura, M.: Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in Drosophila.. *Nature Cell Biol* 2002 ;4(9):705-10
 - Sakakibara S, Nakamura Y, Yoshida T, Shibata S, Koike M, Takano H, Ueda S, Uchiyama Y, Noda T, Okano H.: RNA-binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002 12;99(23):15194-9.
 - Potten, C.S., Booth C., Tudor, G.L., Booth, D., Brady, G., Hurley, P., Ashton, G., Clarke, G., Sakakibara, S. and Okano, H.: Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1. *Differentiation* 2003 ;71(1):28-41
 - Hirota Y., Sawamoto, K. and Okano, H.: *tinca* encodes a novel transmembrane protein expressed in the Tinman-expressing cardioblasts of *Drosophila*. *Mech. Dev.* 2002 ;2(3-4):323-7.
 - Kayahara, T., Sawada, M., Takaishi, S., Fukui, H., Seno, H., Fukuzawa, H., Suzuki, K., Hiai, H., Kageyama, R., Okano, H., and Chiba, T. : Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Letter*

2003 30;535(1-3):131-5

- Yuasa, Y., Okabe, M., Yoshikawa, S., Tabuchi, K., Xiong W-C., Hiromi, Y. and Okano, H.: *Drosophila* homeodomain protein REPO controls glial differentiation by cooperating with ETS and BTB transcription factors. *Development* 2003 1;130(11):2419-2428.
- Nakamura Y, Yamamoto M, Oda E, Yamamoto A, Kanemura Y, Hara M, Suzuki A, Yamasaki M, Okano H.: Related Articles, Links Expression of tubulin beta II in neural stem/progenitor cells and radial fibers during human fetal brain development. *Lab Invest.* 2003;83(4):479-89.
- Tonchev, A.B., Zhao, L., Yamashita, T. and Okano, H.: Differential proliferative response in the postischemic hippocampus, temporal cortex and olfactory bulb of adult primates. *Glia* 2003 ,42(3):209-24.
- (小川チーム)
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kuramochi, H. and Ogawa, M.: Visualization of cell cycling by an improvement in slice culture methods. *J. Neurosci. Res.* 69: 861-868, 2002
- Shinozaki, K., Miyagi, T., Yoshida, M., Miyata, T., Ogawa, M., Aizawa, S. and Suda, Y.: Absence of Cajal-Retzius cells and subplate neurons associated with defects of tangential cell migration from ganglionic eminence in *Emx1/2* double mutant cerebral cortex. *Development* 129: 3479-3492, 2002
- Ohshima, T., Ogawa, M., Takeuchi, K., Takahashi, S., Kulkarni, A.B., and Mikoshiba, K.: Cyclin-dependent kinase 5/p35 contributes synergistically with Reelin/Dab1 to the positioning of facial brachiomotor and inferior olive neurons in the developing mouse hindbrain. *J. Neurosci.*, 22; 4036-4044, 2002
- Sugitanai, Y., Nakai, S., Minowa, O., Nishi, M., Jishage, K., Kawano, H., Mori, K., Ogawa, M. and Noda, T.: *Brn-1* and *Brn-2* share crucial roles in the production and positioning of mouse neocortical neurons. *Genes & Dev.* 16: 1760-1765, 2002
- Inoue, K., Ozaki, S., Shiga, T., Ito, K., Masuda, T., Okado, N., Iseda, T., Kawaguchi, S., Ogawa, M., Bae, S., Yamashita, N., Itihara, S., Kudo, N. and Ito, Y.: *Runx3* controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons. *Nature Neurosci.* 5: 946-954, 2002
- Nakahara J., Takemura M., Gomi H., Tsunematsu K., Itohara S., Asou H., Ogawa M., Aiso S. and Tan-Takeuchi K.: Role of radial fibers in controlling the onset of myelination. *J. Neurosci. Res.* 72, 279-289, 2003
- Saito K., Kawaguchi A., Kashiwagi S., Yasugi S., Ogawa M. and Miyata T.: Morphological asymmetry in dividing retinal progenitor cells. *Dev. Growth &*

Differentiation, in press

- Nakahara, J., Tan-Takeuchi, K., Seiwa, C., Kaifu, T., Ujike, A., Inui, M., Yagi, T., Ogawa, M., Aiso, S., Takai, T. and Asou, H.: The γ chain of immunoglobulin Fc receptors triggers myelinogenesis of oligodendroglia. *Mol. Cell*, in press
- Kikkawa, S., Ikeda, Y., Okado, H., Ogawa, M., Woodhmas, P. L. and Terashima, T.: Missplicing due to a short deletion in the reelin gene causes reeler-like neuronal disorders in the mutant shaking rat Kawasaki. *J. Comp. Neurol.*, in press

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：2件（研究期間累積件数：14件（脳を知る含む））