

「脳を知る」

平成7年度採択研究代表者

岡野 栄之

(大阪大学大学院医学系研究科 教授)

「脳神経系を構成する細胞の多様性の形成機構」

1. 研究実施の概要

研究のねらい：本研究は、脳・神経系の高次機能の基盤となる細胞の多様性の形成機構を、既存の技術をさらに高度に統合した形で駆使し、また独創的、新規的な技術をも開発しつつ、戦略的に解明することを目的とする。神経発生初期過程を制御する遺伝子産物が、無脊椎動物から脊椎動物まで広く保存されていることを利用し、ショウジョウバエの神経発生過程における細胞の運命決定を制御する遺伝子産物を同定・解析することをスタート・ポイントとし、ショウジョウバエで同定された遺伝子産物の哺乳類相同分子を単離しその機能解析を行い、哺乳類脳神経系を構成する細胞の多様性形成のメカニズムを明らかにする。また、このような神経発生研究から得られる基本的知見を、近い将来神経変性疾患の治療法開発へと応用する方向で研究を進める。

研究開始からこれまでの研究の概要：上記の研究目的を達成するために、大きくわけて1. 神経発生制御因子の機能解析プロジェクト；2. 神経幹細胞と神経再生プロジェクト；3. 神経細胞死の3項目にわたるプロジェクトを遂行している。これらのプロジェクトは、何れも神経発生過程における細胞運命決定や神経機能形成に関する遺伝子産物の機能解析を行うとともに、その知見を神経疾患の理解と治療法の開発へと応用しているものであり、独立に進んでいるプロジェクト間にも密接な関連性があることが明らかになってきている。また、これらprojectの内、神経幹細胞と神経再生project（特に哺乳類神経幹細胞に関する基礎的研究および脳再生・修復を目指した治療法の開発）は、CREST申請時の計画にはなかったが、CREST開始以降の研究projectの成果の中から生まれてきた新しい潮流であり、現在力を入れて取り組んでいる。

成果および今後の見通し：神経発生制御因子の機能解析プロジェクト：a) Notch情報伝達系、b) ショウジョウバエArgos 情報伝達系、c) 線虫、d) 神経系に強く発現するRNA結合蛋白質Musashi1とHuにつき解析を行ってきた。発生過程における細胞間相互作用に関わる普遍的な機構のひとつとして、Notch受容体を介したシグナル伝達系が知られているため、特にここではNotch情報伝達系に關与するDeltex

の哺乳類相同分子の機能解析の成果について述べてみる。哺乳類の発生におけるDeltexの機能を調べることを目的として、マウスにおけるdeltexホモログをクローン化した。3つのマウスdeltexホモログ(DTX1-3)遺伝子に対応するcDNAの構造解析の結果、ショウジョウバエDeltexにおいて同定されているすべてのドメインがDTXにおいても保存されていることを明らかにした。次に、神経幹細胞におけるNotchシグナル伝達系の生理作用を解析した。幹細胞由来の不活化細胞株MNS-70にNotch1受容体の細胞内ドメインをコードする活性化型変異体を発現させると、ニューロン、グリアの分化がともに顕著に阻害されることが明らかになった。また、ショウジョウバエのNotchシグナル伝達系に關与する遺伝子として同定されたdeltexの哺乳動物相同遺伝子Deltex-1を高発現させると、活性化型Notch1と同様に幹細胞の分化が強く阻害された。そこで、活性化型Notch1およびDeltex-1の作用機構を解析したところ、両者はMash-1の転写促進機能を特異的に阻害していた。さらに、Deltex-1はNotch1の細胞内領域のうちankyrinドメインに特異的に結合するとともに、核内でMash-1およびその転写のco-activatorであるp300とタンパク質レベルで相互作用する分子であることが明らかになった。以上の結果から、Notch受容体の下流では、これまで知られているRBP-Jを介した経路とは独立に、Deltex-1を介する新規のシグナル伝達経路が存在するものと考えられた。

神経幹細胞と神経再生プロジェクト：哺乳類における神経幹細胞とは、発生中の脳原基において自己の複製（self-renewal）と、ニューロンおよびグリア細胞のどちらをもつることができる（multipotent）細胞である。神経幹細胞が神経系を構成する細胞の多様性の形成機構を解析する上で、最も重要な研究対象の一つとなっていることは言うまでもない。また、神経幹細胞は、その特有の性質から、虚血や変性疾患によって脳のニューロンの大量喪失（structural brain damageと総称する）に対する再生療法への切り札として注目を集めている。我々は、神経幹細胞の分化や非対称性分裂の制御などの基礎的研究を行なうと共に、独自の手法により哺乳類神経幹細胞の同定と大量調整法を確立しつつあり、近い将来に脳再生・修復を目指した治療法の開発を行ないたい（詳しくは、2．研究実施内容の項で述べる）。

神経細胞死プロジェクト：特に脱髄を始めとする神経疾患の発症におけるカスパーゼファミリーの役割につき個体レベルでの検討を行った。また、ショウジョウバエを用いて、細胞死に至るcaspaseの活性化に關与する細胞質因子の解析を行った（詳しくは、2．研究実施内容の項で述べる）。

2．研究実施内容（平成11年度の具体的内容）

[神経発生制御因子の機能解析プロジェクト]：

（目的）脳神経系の高次機能を担うと考えられる、脳神経系を構成する細胞の多

様性の形成機構の研究を行っている。以下の系を中心に解析を進めてきている。
a) Notch情報伝達系, b) ショウジョウバエArgos 情報伝達系、c) 線虫, d) 神経系に強く発現するRNA結合蛋白質Musashi1とHuにつき解析を行ってきた。ここでは特に、我々が長年研究を行っているMusashi1の解析結果につき述べてみる。

(背景) Musashi1 (Msi1) は哺乳類初期発生において脳室周辺部の中枢神経系未分化幹細胞において強く発現しているRNA結合蛋白質である。Msi1は生後から成体に至るまで、未分化幹細胞やグリア前駆細胞考えられる細胞、および上衣細胞を含むアストロサイトで発現が持続する。

(方法) Msi1遺伝子の標的破壊によりノックアウトマウスを作成し、その解析を中心に同遺伝子の機能解析を行った。

(結果・結論) *msi1* 欠損マウスは中脳水道上衣細胞の異常な増殖、多層化による中脳水道の狭窄による水頭症を発症する。さらに*msi1* 遺伝子に高い相同性と発現パターンを有する*msi2* 遺伝子を新規に同定して、初代培養において機能阻害実験を行った結果、*msi* 遺伝子ファミリー (*msi1*、*msi2*) が中枢神経系幹細胞の維持や分化にも必須の機能を持つことが示された。

[神経幹細胞と神経再生プロジェクト]:

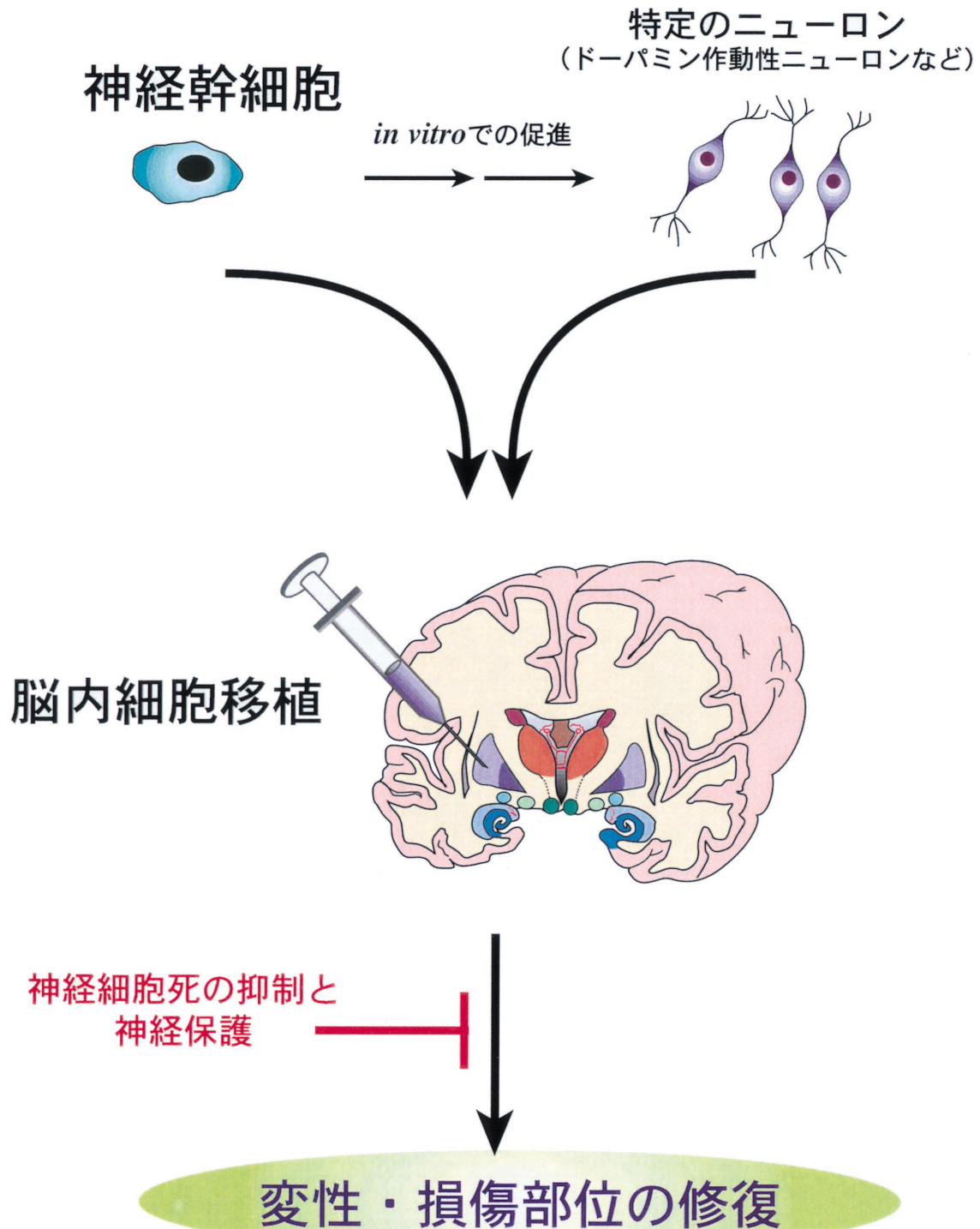
(目的) 神経幹細胞は、脳神経系を構成する細胞集団の多様性のもとになる細胞であり、神経発生の基礎的な研究対象として同細胞の分子細胞生物学的なcharacterizationを行うとともに、神経再生を視点とした将来的な移植医療の確立を目指す研究をおこなってきた。

(背景) 神経幹細胞は、最近再生医学的な側面から注目される存在になってきているが、brain scienceの領域においてはほんの10年ほど前までは幹細胞生物学という概念がないに等しい状況であった。我々は、神経系における幹細胞生物学を進展させるためにも、神経幹細胞の分離法の開発に取り組むとともに、分離した細胞の神経疾患モデルへの移植実験を開始した(図1)。

(方法) 1. 神経幹細胞を生きた状態で同定し、これを分離することができるように、神経幹細胞で選択性高く発現しているnestin遺伝子のエンハンサー制御下で蛍光物質であるGreen Fluorescence Protein (GFP) をコードする遺伝子をおいたレポーターコンストラクト (nestin-EGFP) を作成し、これを神経組織へと導入した。
2. 神経疾患モデルの一つとして脊髄損傷モデルratを作成し、損傷部位ヘラット胎仔由来の神経幹細胞を移植し、機能回復を試みた。

神経幹細胞の遺伝子操作と脳内移植

— 神経疾患への応用 —



(結果・結論)

- 1 . nestin-EGFPレポーター遺伝子を有するトランスジェニックマウスにおいては、神経幹細胞を含む未分化な細胞が密集している脳室周囲部(Ventricular Zone, VZ) に強い蛍光が観察された。EGFP陽性の細胞をセル・ソーター法により分離したところ、マーカーの発現、多分化能、自己複製能などの指標を満たす神経幹細胞活性が濃縮できることが認められた。また、同レポーター遺伝子は、成人脳内に存在する神経幹細胞/神経前駆細胞を同定・分離する上でも有効であることを見出した。
- 2 . 脊髄C4, C5レベルで背側の椎弓を外し、contusion モデルによる脊髄損傷モデルRatを作製した。同動物においては、脊髄は空洞変性を起こすとともに行動学的(pellet retrieval test)に後索症状に起因すると考えられる異常を示した。損傷後、9日目にラット胎仔由来の神経幹細胞を移植し、移植後4~5週目に組織学的、行動学的な検討を行った。移植した外来性の神経幹細胞からは、ホストの神経組織内において、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトが新生していることが確認できた。また、神経幹細胞移植群においては、対照群(培地のみを移植した群) に比べpellet retrieval testの成績が向上していることが確認された。以上の結果は、神経幹細胞移植が、脊髄損傷を含む神経疾患の治療法として有効である可能性を示唆しているものと考えられる。

[神経細胞死プロジェクト]:

- (目的) プログラム細胞死を人為的に個体レベルで制御することが出来れば、神経系の細胞が変性する疾患の治療法開発に有用なモデルを提供することが出来る。
- (方法) 我々は、細胞死の共通メディエーターであるカスパーゼを阻害する遺伝子p35をCreリコンビナーゼ依存的に発現するトランスジェニックマウスを作製した。
- (背景) 多発性硬化症(MS) は中枢神経系のオリゴデンドロサイトが変性する疾患である。本疾患の治療法開発のために、上記トランスジェニック動物を用いた解析を行った。
- (結果・結論) p35遺伝子産物をオリゴデンドロサイトで発現させMSのマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE) の発症に関する影響を解析した。その結果、p35の発現によってEAEにおけるオリゴデンドロサイト細胞死が抑制されたのみならず、病態の改善もみられ変性部位に特異的なカスパーゼ阻害が疾患の治療に有効であることが示された。

3 . 主な研究成果の発表（論文発表）

- Kanuka, H., Hisahara, S., Sawamoto, K., Shoji, S., Okano, H. and Miura, M.: Execution of programmed cell death in *Drosophila* by *C. elegans* Cell death gene *ced-4*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 145-150 (1999)
- Yoshihara, Y., Mizuno, T., Nakahira, M., Kawasaki, M., Watanabe, Y., Kagamiyama, H., Jishage, K., Ueda, O., Suzuki, H., Tabuchi, K., Sawamoto, K., Okano, H., Noda, T. and Mori, K.: Multi-synaptic neural pathways visualized with plant lectin transgenes. Neuron, 22, 33-41 (1999)
- Umemori, H., Kadowaki, Y., Hirose, K., Okano, H. and Yamamoto, T.: Stimulation of myelin basic protein gene transcription by Fyn tyrosine kinase for myelination. J. Neurosci., 19, 1393-1397 (1999)
- Nagata, T., Kanno, R., Kurihara, Y., Uesugi, S., Imai, T., Sakakibara, S., Okano, H. and Katahira, M. : Structure, backbone dynamics and interaction with RNA of RNA-binding domain of a mouse neural RNA-binding protein, Musashi-1. J. Mol. Biol., 287, 314-330 (1999)
- Sawamoto, K., Yamada, C., Kisida, S., Hirota, Y., Kikuchi, Y. and Okano, H.: Ectopic expression of mutationally-activated Ral GTPase inhibits cell shape changes during *Drosophila* eye development. Oncogene, 18, 1967-1974 (1999)
- Araki, T., Saruta, T., Okano, H. and Miura, M.: Caspase activity is required for nephrogenesis in the developing mouse metanephros. Exp. Cell Res., 248, 423-429 (1999)
- Rocheleau, C., Yasuda, J., Shin, T.H., Lin, R., Sawa, H., Okano, H., Preiss, J.R., Davis, R. and Mello, C.C.: WRM-1 activates the LIT-1 protein kinase to transduce anterior/posterior polarity signals in *C. elegans*. Cell, 97, 717-726 (1999)
- Sawamoto, K., Winge, P., Koyama, S., Hirota, Y., Yamada, C., Miyao, S., Yoshikawa, S., Jin, M.H., Kikuchi, A. and Okano, H.: The *Drosophila* Ral GTPase regulates developmental cell shape change through the Jun NH2-terminal Kinase pathway. J. Cell Biol., 146, 361-372 (1999)
- Akamatsu, W., Okano, H.J., Osumi, N., Inoue, T., Nakamura, S., Sakakibara, S., Miura, M., Matsuo, N., Darnell, R.B. and Okano, H.: Mammalian ELAV-like neuronal RNA binding proteins HuB and HuC are involved in the neuronal differentiation of both central and peripheral nervous systems. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 96, 9885-9890 (1999)
- Hirota, Y., Okabe, M., Imai, T., Kurusu, M., Yamamoto, A., Miyao, S., Nakamura, M., Sawamoto, K. and Okano, H.: Musashi and Seven in absentia downregulate Tramtrack

- through distinct mechanisms in *Drosophila* eye development. *Mech. Dev.*, 87, 93-101 (1999)
- Fujimoto, J., Sawamoto, K., Okabe, M., Takagi, Y., Tezuka, T., Yoshikawa, S., Ryo, H., Okano, H. and Yamamoto, T.: Cloning and characterization of Dfak56, a homolog of focal adhesion kinase, in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, 74, 29196-29201 (1999)
 - Kanuka, H., Sawamoto, K., Inohara, N., Igaki, T., Matsuno, K., Okano, H., and Miura, M.: dapaf-1, that encodes a homologue of both Apaf-1 and CED-4, is required for cell death in *Drosophila*. *Molecular Cell*, 4, 757-769 (1999)
 - Kaneko, Y., Sakakibara, S., Imai, T., Suzuki, A., Nakamura, Y., Sawamoto, K., Ogawa, Y., Toyama, Y., Miyata, T. and Okano, H.: Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev. Neurosci.*, 22, 139-153 (2000)
 - Tabuchi, K., Sawamoto, K., Suzuki, E., Sone, M., Hama, C., Yoshihara, Y., Nose, A. and Okano, H. : GAL4/ UAS-WGA system as a powerful tool for tracing *Drosophila* multi-synaptic neural pathways. *J. Neurosci.Res.*, 59, 94-99 (2000)
 - Nakamura, Y., Sakakibara, S., Miyata, T., Ogawa, M., Shimazaki, T., Weiss, S., Kageyama, R. and Okano, H.: The bHLH gene Hes1 as a repressor of neuronal commitment of the CNS stem cells. *J. Neurosci.*, 20, 283-293 (2000)
 - Roy, N.S., Benraiss, A., Wang, S., Fraser, R.A.R., Goodman, R., Couldwell, W.T., Nedergaard, M., Kawaguchi, A., Okano, H. and Goldman, S.A.: Promoter-targeted selection and isolation of neural progenitor cells from the adult human ventricular zone. *J. Neurosci.Res.*, 59, 321-331 (2000)
 - Roy, N.S., Wang, S., Jiang, L., Kang J., Restelli, C., Fraser, R.A.R., Couldwell, W.T., Kawaguchi, A., Okano, H. Nedergaard, M. and Goldman, S.A.: In vitro neurogenesis by neural progenitor cells isolated from the adult human hippocampus . *Nature Medicine*, 6, 271-278 (2000)
 - Igaki, T., Kanuka, H., Inohara, N., Sawamoto, K., Nunez, G., Okano, H. and Miura, M.: Drob-1, a *Drosophila* member of the CED-9/Bcl-2 family that promotes cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97, 662-667 (2000)
 - Taguchi, A., Sawamoto, K., and Okano, H.: Mutations modulating Argos-regulated signaling pathway during *Drosophila* eye development. *Genetics*, 154, 1639-1648 (2000)
 - Hisahara, S., Araki, T., Sugiyama, F., Yagami, K., Suzuki, M., Abe, K., Yamamura, K., Miyazaki, J., Momoi, T., Bernard, C.A., Okano, H. and Miura, M.: Targetted expression

- of baculovirus p35 inhibitor in oligodendrocytes protects mice against autoimmune-mediated demyelination. *EMBO J.*, 19, 341-348 (2000)
- Ohtani, T., Ishihara, K., Atsumi, T., Nishida, K., Keneko, Y., Miyata, T., Itoh, S., Narimatsu, M., Maeda, H., Fukada, T., Itoh, M., Okano, H., Hibi, T. and Hirano, T.: Dissection of signaling cascade through gp130 in vivo: Reciprocal roles for STAT3-and SHP2-mediated signals in cytokine and immunoglobulin production. *Immunity*, 12, 95-105 (2000)
 - Jin, M., Ito, M., Sawamoto, K. and Okano, H. : The interaction between Drosophila secreted protein Argos and EGF receptor inhibits dimerization of the receptor and binding of secreted Spitz to the receptor. *Mol. Cell. Biol.*, 20, 2098-2107 (2000)