

平成17年度採択分

平成19年 3月31日現在

研究課題名(和文) 成体脳神経幹細胞の活性化とニューロン新生：
その制御機構の解明と可視化技術の開発

研究課題名(英文) Activation of stem cells and neurogenesis
in adult brains: their regulatory mechanism and visualization

研究代表者

岡野 栄之 (OKANO HIDEYUKI)
慶應義塾大学・医学部・教授



推薦の観点：創造的・革新的・学際的学問領域を創成する研究

研究の概要：成体脳にも幹細胞が存在し、活発な神経細胞の産生を行っていることが明らかになったが、そのメカニズムは十分に解析されていない。Musashi-1 と Galectin-1 は、我々が独自に同定・解析を行っている神経幹細胞の活性化に関連した分子である。本研究では、これら二つの分子にフォーカスしてその神経幹細胞制御における機能を分子・細胞・個体レベルで解析する。神経幹細胞から神経細胞への分化状態をモニターできる新規蛍光レポーターを開発し、これを用いて可視化される細胞の遺伝子発現と生理機能を解析する。さらに、ニホンザル虚血モデルを用いて、霊長類における神経細胞新生を解析する。

研究分野/科研費の分科・細目/キーワード：神経科学/神経科学一般/発生・発達・再生神経科学

1. 研究開始当初の背景

再生しない臓器の代表例として考えられてきた成体脳にも幹細胞が存在することが明らかになった。しかしながら成体脳における幹細胞が、休眠状態から、どのようなメカニズムにより活性化され、シナプス形成や機能回復を含む再生機転につながっていくのかについての知見と解析技術があまりに乏しいことが、当該研究分野の重大な問題点である。

2. 研究の目的

成体ほ乳類脳においても内在性の神経幹細胞が存在することが示され、「再生」しないとされた中枢神経系を標的とした研究にパラダイムシフトがおきつつある。しかしながら、成体脳における神経幹細胞の維持と活性化機構や新生したニューロンの機能については、ほとんど不明のままである。申請者らは、成体脳の神経幹細胞の制御因子として同定した RNA 結合性蛋白質である Musashi-1 と糖鎖結合性分泌蛋白質 Galectin-1 の機能と発現調節機構の解析を中心に、成体脳における神経幹細胞の維持と活

性化機構の解明を行うとともに、新生ニューロンの可視化技術をも開発しつつ、新生ニューロンによる後成的なシナプスの維持・形成過程の解明を行い、成体脳の動的な恒常性の維持機構の解明と中枢神経系の疾患の革新的な治療法を開発の基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

研究代表者らが独自に同定・解析を進めてきた RNA 結合蛋白質 Musashi-1 および糖鎖結合蛋白質 Galectin1 について、その神経幹細胞における機能を分子・細胞・個体レベルで詳細に解析する。神経幹細胞およびそこから生まれる新生神経細胞を生きのまま可視化する新しい蛍光レポーターを開発し、これを用いて標識された細胞の機能を電気生理学的に解析する。

4. これまでの成果

Musashi-1 結合タンパク質として PABP (poly (A) binding protein)を同定した。PABP は、翻訳開始因子 eIF4G との相互作用により Cap 構造依存的な翻訳を促進する重要な基本開始因子の一つである。Musashi-1 蛋白質は eIF4G に対して競合的に PABP に

結合し、eIF4G-PABP 間の結合を打ち消す作用を有することが明らかとなった。さらに、糖鎖結合蛋白質 Galectin-1 が、脳室下帯と海馬歯状回の両方における神経細胞の産生に関与することを明らかにした。

「ある神経系細胞がどの分化ステージにあるのか」を可視化するためのツール、『Color Timer』システムを構築中である。これまでに、*Nestin* 遺伝子プロモーター/エンハンサー領域を用いて、オレンジ色蛍光蛋白 Kusabira-Orange (KO) 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (*Nestin/KO*) 神経細胞特異的に活性化すると期待される SCG10 プロモーターを用いて黄色蛍光蛋白 Venus 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (*SCG10/Venus*) などを作成した。

脳スライス標本を用いて蛍光蛋白質により可視化されたニューロンから、パッチクランプ法により機能解析を行った。トランスジェニックマウスやウイルスベクターを用いて蛍光蛋白質 (Venus や YFP) を発現させたニューロンにおいても、細胞膜の性質や膜電位は正常であり、またシナプス刺激に対する応答やシナプス可塑性も影響を受けないことを確認した。

differential display 法により、虚血負荷後 (d15) のサル海馬歯状回においては、神経幹細胞がダウン症候群・細胞接着因子 (Down syndrome cell adhesion molecule : DSCAM) の mRNA を増幅発現していることを発見した。

5 . 今後の計画

Musashi-1 の転写制御機構を明らかにし、神経幹細胞における遺伝子発現のメカニズムの理解に貢献する。Galectin1 の海馬における機能に着目して、還元型と酸化型の作用の違いを明らかにする。Color Timer プロジェクトに関しては、現在作成中の複数の蛍光レポーターの発現パターンを確認して、交配を行う。その後特定の蛍光を発する細胞をセルソーターで分離して、細胞分化過程における遺伝子発現変化を解析する。また、この新しい蛍光レポーターで可視化される細胞の異動動態をタイムラプス法により記録・解析する。また、急性脳スライス標本を作成し、パッチクランプ法を用いて神経細胞の成熟に応じた興奮性の変化や機能的シナプスの形成過程を経時的に機能解析する。さらに、ニホンザルの虚血モデルにおける遺伝子発現変化をプロテオミクス法によって解析する。

6 . これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)
【論文】

- 1) Sakaguchi M, Shingo T, Shimazaki T, Okano HJ, Shiwa M, Ishibashi S, Oguro H, Ninomiya M, Kadoya T, Horie H, Shibuya A, Mizusawa H, Poirier F, Nakauchi H, Sawamoto K, **Okano H**: A carbohydrate binding protein, Galectin-1, promotes proliferation of adult neural stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 103: 7112-7117, 2006.
- 2) Sawamoto, K., Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Martin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, **Okano H**, Alvarez-Buylla, A: New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311: 629-631, 2006.
- 3) Okada S, Ishii K, Miyao T, Shimzakai T, Katoh H, Yamane J, Yoshimura A, Iwamoto Y, Nakamura M, Toyama Y, **Okano H**: Conditional ablation of STAT3/SOCS3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat. Med.* 12: 829-834, 2006.
- 4) Kohyama J, Tokunaga A, Fujita Y, Miyoshi H, Nagai T, Miyawaki A, Nakao K, Mastuzaki Y and **Okano H**: Visualization of spatio-temporal activation of Notch signaling: live monitoring and significance in neural development. *Dev. Biol.* 286: 311-325, 2005.
- 5) Iijima T, Imai T, Kimura Y, Bernstein A, Okano HJ, Yuzaki M, **Okano H** : RNA-binding protein HZf specifically binds to 3'-untranslated region of type1 *inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor* mRNA and is involved in its dendritic localization. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 102: 17190-17195, 2005.

【受賞】

- 1) 平成 18 年(2006) 文部科学省より、文部科学大臣表彰 (科学技術賞) 受賞
- 2) 平成 19 年(2007) STEM CELLS 誌 (AlphaMed Press) より、STEM CELLS Lead Reviewer Award 受賞

ホームページ等

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/physiol/okano/>