

平成 31 年 5 月 3 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 129

氏 名 市瀬(鈴木) 菜里

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: アデレード (国名: オーストラリア)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

Gremlin1 陽性間葉系幹細胞の発達段階脳保護効果

3. 派遣期間: 平成 29 年 4 月 3 日 ~ 平成 31 年 4 月 2 日

4. 受入機関名及び部局名

アデレード大学 南オーストラリア医学研究所

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 書式任意(A4判相当3ページ以上、英語で記入可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

【背景】

脳傷害に対する骨髄間葉系幹細胞移植については先行研究で有用性が示唆されており、そのメカニズムとしては、移植した骨髄間葉系幹細胞自身が直接神経細胞に分化できるという報告と、神経保護因子分泌促進や血管新生促進などを通して微小環境改善効果により脳保護効果を発揮するという報告がある。これまでの報告より移植骨髄間葉系幹細胞の定着率は低いとされ、また骨髄間葉系幹細胞にもsubpopulationが存在するが、各subpopulationにおける機能解析はほとんどされていないのが現状である。派遣先研究機関Dr. Daniel L Worthleyは、成人骨髄間葉系幹細胞のわずか0.1%を占めるに過ぎないにもかかわらず、Gremlin1間葉系幹細胞は骨折モデルで骨修復に関わるほとんど全ての細胞を供給していることを報告した(Worthley., et al, Cell 2015)。Gremlin1は、神経幹細胞からneuronへの分化を抑制しastrocyteへの分化を促すbone morphologic protein (BMP) 2,4のantagonistであることが知られている。Gremlin1はglioblastomaに発現することが報告されているが、発達段階の脳での発現や役割については明らかになっていない。

【研究目的】

発達段階脳におけるGremlin1陽性細胞の役割を明らかにする。

【研究成果】

1. マウス胎児脳におけるGremlin1陽性細胞の細胞系譜追跡実験

Greml1-CreERT;R26-LSL-TdTomatoマウスは、タモキシフェン投与時にGremlin1を発現している細胞を赤色蛍光色素でマークし、それから派生する細胞を追跡することができる。このマウスに対し、胎生13.5日に母マウスにタモキシフェンを経口投与し、胎生14.5日、17.5日、20.5日に胎児を回収し、免疫組織学的染色を行った。胎生14.5日にはGremlin1 lineage細胞はtelencephalonのouter subventricular zoneに帯状に分布し、postmitotic neuronal markerの β III tubulinやNeuNは陰性、神経幹細胞マーカーNestinは細胞突起のみ一部共在を確認した。胎生17.5、20.5日にはより多くの細胞がtelencephalonの広域に分布し、NeuN陽性となっている細胞もあった。Gremlin1は、神経幹細胞からneuronへの分化を抑制しastrocyteへの分化を促すbone morphologic protein (BMP) 2,4のantagonistであることが知られている。本実験によりGremlin1を発現した細胞がニューロンへと分化することが証明された。また、細胞増殖マーカーKi67の発現はventricular zoneに発現するNestin陽性neural stem cellsに比して弱かった。

Greml1-CreERT;R26-LSL-TdTomatoマウスに対し、胎生13.5日に母マウスにタモキシフェンを経口投与し、胎生14.5日に脳組織を回収し、RNA scopeによりGremlin1 RNAの検出を行った。Tdtomatoで標識される紡錘形細胞に細胞突起まで含めてGremlin1 RNAが分布し、24時間のlineage traceではGremlin1 RNAを多く発現している細胞を標識できることが確認できた。一方、胎生20.5日に回収した脳組織では、Gremlin1 RNAを発現していないTdtomato陽性細胞も存在していたことから、胎生13.5日にGremlin1を発現していた細胞は比較的弱いながらも分裂能を有し、子孫細胞を産生することが示唆された。

2. マウス新生仔脳におけるGremlin1陽性細胞の細胞系譜追跡実験

Greml1-CreERT;R26-LSL-TdTomatoマウスに対し生後4日にタモキシフェンを皮下注射し、生後5日と4週齢に脳を回収し、免疫組織学的染色を行った。生後5日時点ではGremlin1 lineage細胞は大脳皮質にまばらに存在し、NeuN陰性であった。生後4週時点では大脳皮質により広く存在し、多くがNeuN陽性、一部はoligodendrocyte marker PLP陽性、astrocyte marker GFAP陰性であった。この結果は1.で示したGremlin1陽性neural progenitorのある群の細胞が、胎児期と比して少ないものの、生後にも存在し、大脳皮質の発達に関与している可能性を示唆した。

3. マウス胎児脳におけるGremlin1陽性細胞のmRNA sequenceによる機能解析

胎生13.5日に母マウスにタモキシフェンを経口投与し、胎生14.5日胎児脳を回収し、Tdtomatoによりflow cytometry sortingを行い、Gremlin1 lineage細胞とそれ以外の細胞からRNAを抽出し、mRNA sequenceによる解析を行った。Gremlin1 mRNAの発現は、Tdtomato陽性細胞で陰性細胞に比して有意に高かった。Pathway解析の結果、Tdtomato陽性細胞には、グルタミン酸産生産生ニューロンに関する遺伝子群や樹状突起やシナプスの形成に関する遺伝子群が有意に多く発現することが明らかになった。Tdtomato陰性細胞に、細胞増殖や分裂に関する遺伝子群が多かった。さらにネットワーク解析を行い、Tdtomato陽性細胞で有意に上昇している遺伝子の多くは、ニューロン分化に関連する遺伝子群に存在し、お互いに発現を増強していることが示唆された。ニューロン分化に関連する遺伝子群の中で、Id1はTdtomato陽性細胞で有意に減少していた。Gremlin1はBMP 2,4のantagonistであり、BMP2,4は smad1/5リン酸化を介して、Id1,2の転写を促し、neuronやoligodendrocyteよりもastrocyteへの分化を誘導することが知られている。胎児脳におけるGremlin1はId1の発現抑制を介して、ニューロン分化に寄与していることが

示唆された。

4. マウス胎児脳由来神経幹細胞培養、Gremlin1 overexpressed /knocked out

Gremlin1の神経幹細胞/神経前駆細胞における役割を理解するため、胎生14.5日マウス telencephalonから、胎児脳由来神経幹細胞/神経前駆細胞(NSCs)を採取し培養を行い、in vitro でneuron/oligodendrocyte/astrocyteに分化できることを確認した。

Greml1-CreERT;R26-LSL-TdTomatoマウスから胎生14.5日にtelencephalonからNSCsを採取し培養を行った。培養液中に4OHtamoxifenを添加することでGremlin1を発現する細胞を赤く標識することができた。しかし、in vitroではこれらの細胞はほとんどがastrocyteへ分化し、in vivoで認める現象と異なる結果であった。

EF1a Greml1 clover Green lentivirus及びlenti Creを作成し、Greml1 flox/flox mouseより採取した神経幹細胞/神経前駆細胞にトランスフェクションし、puromycinによりselectionを行い、Gremlin1 overexpression及びknock out NSCsを作成した。Id1 luciferase assayにより、recombinant BMP2を添加するとId1の転写活性が増加するが、Gremlin1 overexpressed NSCsではそれが抑制され、knock out NSCsではempty vector transfected NSCsに比してId1転写活性が上昇した。これはmRNA sequenceの結果と一致するものであった。Gremlin1 overexpressed NSCsはneuron及びoligodendrocyteへより多く分化することが確認された。また、recombinant Gremlin1 proteinをNSCsの分化誘導mediumに添加し、外からのGremlin1補充がNSCs分化に与える影響についても検討を行った。Recombinant Gremlin1を添加するとneuron及びoligodendrocyteへの分化方向性が強くなり、astrocyteへの分化が減少することが確認された。Gremlin1は分泌蛋白であることから、paracrine効果により周囲の細胞分化にも影響を与えていることが考えられた。

5. Gremlin1 conditional knock out mouseの作成

Gremlin1 knock out mouseは腎形成不全のため、胎生致死であることが過去に報告されている。Gremlin1の脳発達への影響を検討するため、胎生期から成獣まで大脳皮質特異的に発現するEmx1のプロモーター下にCreを発現するEmx1Creマウスと、Gremlin1 flox/floxマウスを交配し、Emx1cre Gremlin1 flox/floxマウスを作成した。RNAscopeにより、Gremlin1の発現が大脳皮質特異的にknock outされていることを確認した。Emx1cre Gremlin1 flox/floxマウスは成獣まで生存可能であり、その組織学的特徴を免疫染色により検討している。

6. マウス骨髄間葉系幹細胞培養、Gremlin1 overexpressed /knocked out

幹細胞移植は脳性麻痺患者に対して臨床試験が行われている。骨髄間葉系幹細胞は脳性麻痺モデル動物において有用性が示唆されている。派遣先研究室のPI Dr. Daniel WorthleyはGremlin1陽性骨髄間葉系幹細胞を従来のLeptin receptor陽性骨髄間葉系幹細胞と異なる新たな種類の間葉系幹細胞として報告し、マウス骨折モデルにおいて損傷修復に貢献することを明らかにした。

まず、骨髄間葉系幹細胞が発現するGremlin1が、神経幹細胞/神経前駆細胞(NSCs)に与える影響についてin vitroで検討することとした。Greml1 flox/flox mouseの四肢長管骨よりbone marrow stromal cellsを採取した。EF1a Greml1 clover Green lentivirus及びlentiCreを作成し、Greml1 flox/flox mouseのbone marrow stromal cellsにトランスフェクションし、puromycinによりselectionを行い、Gremlin1 overexpression及びknock out bone marrow stromal cells

を作成した。それぞれの細胞のcell lysateを用いてwestern blotを行い、Gremlin1の発現が上昇あるいは低下していることを確認した。また、colony forming unit (CFU) assayを施行したところ、Gremlin1 overexpressed bone marrow stromal cellsはempty vector lentivirusをトランスフェクションしたものに比してcolony数が有意に多く、Gremlin1 knock out bone marrow stromal cellsはcolony数が有意に少なかった。Bone marrow stromal cellsのGremlin1がNSCsに与える影響を検討するため、Gremlin1 overexpressed/empty vector transfected/knock out bone marrow stromal cellsをtranswellの上段に培養し、下段にwild typeマウスから採取したneurosphereを培養した。Bone marrow stromal cellsと共培養することで、Neurosphereからのmigrationは増加したが、Gremlin1 overexpressedあるいはknock out bone marrow stromal cellsとempty vector bone marrow stromal cellsでは有意な差を認めなかった。

7. Ibotenic acid 脳内注射を用いたマウス脳性麻痺モデルの確立

Glutamate agonistであるibotenic acidは、生後5日新生仔マウス脳に局注することで、神経損傷と白質傷害を来し、脳性麻痺マウスモデルとして報告されている。脳性麻痺の主な原因は低酸素虚血及び感染・炎症であるとされているが、この両者の病態にglutamateが関与していること、マウスでも施行しやすいことから、本モデルを脳性麻痺モデルとして選択した。このモデルの第一人者であるKing's College LondonのProf. Pierre Gressensに連絡し共同研究の承諾を得た。また、派遣先研究室の属するSouth Australia Health and Medical Research Instituteの動物実験倫理委員会から承認を得て、実験を開始した。

生後5日新生仔マウスをイソフルラン吸入により麻酔し、保温マット上で糸状縫合とラムダ縫合の交点から前方に3mm、糸状縫合から右に2mmの右大脳半球に、頭蓋骨及び皮膚上から深さ2mmの位置にibotenic acid 10 μ gを注入した。保温し麻酔からの回復を待ち、母マウスの元へ戻した。Toluidine Blueにより穿刺点が正しいことを確認した。生後13日目にマウス脳を回収し、連続切片を作成し、H.E染色及びcresyl violet染色により、大脳皮質及び白質に病変を認めることを確認した。Greml1-CreERT;R26-LSL-TdTomatoマウスに生後4日にタモキシフェンを皮下投与し、生後5日に上記脳傷害を加え、Gremlin1陽性細胞が脳傷害時に果たす役割について検討を行っている。

【成果の発表・関係学会への参加状況】

上記研究成果は現在追加検討中である成果をまとめ次第、学術誌に投稿予定である。派遣開始前より継続して取り組んできた発達段階脳傷害及び胎児発生異常に関する研究については、別記の通り学術誌に発表し、派遣先研究室で共著者として携わった研究成果は別紙の通り学術誌に掲載された。