

平成17年度採択分

平成20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： 成体脳にも神経幹細胞が存在し、神経細胞を活発に産生していることが明らかになったが、その分子メカニズムはいまだ十分に解明されていない。本研究では、我々が独自に同定し解析を行っている、神経幹細胞の活性化に関連している2つの分子、Musashi-1とGalectin-1の神経幹細胞の維持及び分化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前駆細胞そして神経細胞への分化状態をモニターできる蛍光レポーターマウスシステムを開発し、それを用いて可視化される細胞の遺伝子発現プロファイル及び生理機能を解析する。更に、ニホンザルの虚血モデルを用いて、霊長類脳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

かつては再生しない臓器の代表例としてとらえられてきた成体脳にも、神経系を構成する細胞に分化する能力を持つ幹細胞（神経幹細胞）が存在することが明らかになった。しかしながら、成体脳における神経幹細胞の維持、休眠状態からの活性化、神経細胞への分化等の各プロセスの分子メカニズムや、その後新生神経細胞がシナプス形成や機能回復を含む再生機転にどのような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

我々が世界に先駆けて示したように、成体脳においても内在性の神経幹細胞が存在する。その発見を大きな契機の一つとして、長い間「再生」しないと信じられていた中枢神経系の再生を標的とした研究へのパラダイムシフトが起こりつつある。しかし、成体脳における神経幹細胞の維持と活性化の機構や、新生した神経細胞の機能については、いままってほとんど不明のままである。申請者

らは、成体脳内の神経幹細胞の制御因子として同定した2つの分子、RNA結合性蛋白質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、活性化、神経細胞への分化等の分子メカニズムの解析を行うとともに、神経分化の可視化技術をも開発しつつ、新生神経細胞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疾患の革新的な治療法の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し、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Galectin-1について、その神経幹細胞内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、及びそれが分化してできる新生神経細胞を生きのまま可視化する蛍光レポーターマウスシステムを開発し、それを用いて、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 の結合ターゲットとして、新たに *let-7 microRNA (miRNA)* を同定した。この結合の解析により、神経新生以外の生理的プロセスにおいて **Musashi1** が果たす役割も明らかになる可能性がある。また、*musashi1* 遺伝子の制御機構を調べるために、*musashi1* コーディングシーケンスをレポーター遺伝子と置換した **bacterial artificial chromosome (BAC)** を使って安定発現株を作製した。

糖鎖結合蛋白質 **Galectin-1** の海馬歯状回での発現を確認し、この部位における神経幹細胞を含む神経前駆細胞の増殖を **Galectin-1** が抑制することを明らかにした。

「ある特定の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『**Color Timer**』マウスシステムを構築中である。以前準備した *nestin/Kusabira-Orange* トランスジェニック (Tg) マウスに加え、今回新たに *doublecortin/mPlum*、*NKCC1/mPlum*、*KCC2/Cerulean*、*HuB/mPlum* 等の BAC Tg マウスを作製した。

脳スライス標本を用いて、蛍光蛋白質 (**Venus** や **YFP**) によって可視化された神経細胞をパッチクランプ法により機能解析し、Tg マウスやウイルスベクターを用いて蛍光蛋白質を発現させた神経細胞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。

脳の発達や機能維持のために重要な役割を果たしているとされる多価不飽和脂肪酸受容体の一つ **G-protein coupled receptor-40 (GPR40)** の遺伝子のニホンザル脳内での発現を確認した。

5. 今後の計画

musashi-1 遺伝子の転写制御機構及び蛋白の生理的機能の解析を進め、神経幹細胞の維持や分化制御におけるその機能の更なる解明を目指す。海馬における **Galectin-1** の還元型と酸化型の生理的機能の違いを明らかにする。『**Color Timer**』プロジェクトに関しては、各蛍光レポーターマウスラインの発現パターンを詳細に解析し、また、ライン間の交配を行ってダブル、トリプル Tg を作製する。その後特定色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プロファイルの変化を解析する。また、この新しい蛍光レポーターで可視化される細胞の移動動態をタイムラプス法により記録、解析する。急性脳スライス標本を作製

し、パッチクランプ法を用いて神経細胞の成熟に伴う興奮性応答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。また、研究分担者の柚崎らが発見した新規シナプス形成・維持因子 **Cbln1** を成体脳に投与することにより、新生ニューロンの機能・形態的シナプス形成過程の制御も試みる。更に、ニホンザルを用いて **GPR40** の神経新生における機能を解析する。

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. Kawahara H, Imai T, Imataka H, **Okano H**. Neural RNA-binding protein **Musashi1** Inhibits Translation Initiation by Competing with eIF4G for PABP. *J. Cell Biol.* 2008 May 10.
2. Hirota Y, Ohshima T, Kaneko N, Ikeda M, Iwasato T, Kulkarni AB, Mikoshiba K, **Okano H**, Sawamoto K. Cyclin-dependent kinase 5 is required for control of neuroblast migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci.* 2007 Nov 21;27(47):12829-38.
3. Matsuda S, Miura E, Matsuda K, Kakegawa W, Kohda K, Watanabe M, Yuzaki M. Accumulation of AMPA receptors in autophagosomes in neuronal axons lacking adaptor protein AP-4. *Neuron.* 2008 Mar 13;57(5):730-45.
4. Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, Kashiwagi S, Fukami K, Miyata T, Miyoshi H, Imamura T, Ogawa M, Masai H, Miyawaki A. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell.* 2008 Feb 8;132(3):487-98.
5. Ma D, Lu L, Boneva NB, Warashina S, Kaplamadzhiev DB, Mori Y, Nakaya MA, Kikuchi M, Tonchev AB, Okano H, Yamashima T. Expression of free fatty acid receptor **GPR40** in the neurogenic niche of adult monkey hippocampus. *Hippocampus.* 2008;18(3):326-33.

【受賞】

- 1) 平成 19 年 (2007) **Stem Cells** 誌より **Lead Reviewer Award** 受賞
- 2) 平成 20 年 (2008) 井上科学振興財団より井上学術賞受賞

ホームページ等：

<http://www.okano-lab.com/>