

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 12 年度博士課程進学

氏 名 吉田 真子

指導教官名 上野川 修一

論文題目 発生期における中枢神経幹細胞の細胞生物学的研究

成熟した中枢神経系は、多数のニューロンおよびグリア細胞によって構成されているが、これらの細胞の大半は脳発生期に神経幹細胞から分化することによって生じたものである。これまで神経幹細胞の分化に関する研究は、*in vitro* の培養実験による分化誘導因子の探求によって行われて来た。この方法によってグリア細胞への分化に関与する多くの液性因子が同定されたものの、ニューロンへの分化に関しては有力な因子の発見に至らず、現在も神経幹細胞からニューロンへの分化機構解明が神経科学分野における中心課題となっている。ニューロンは、神経幹細胞の自己複製が停止した後、分裂周期から離脱することによって分化誘導されることが明らかとなっている。このことから、本研究では神経幹細胞の増殖とニューロンへの分化の間には極めて密接な関係があると考えた。すなわち、神経幹細胞に対する増殖シグナルが喪失した時にニューロンへ分化するのではないかと考えた。液性因子以外で細胞増殖に関与する分子の一つとして接着分子が知られている。接着分子は細胞表面に発現して各種のシグナル伝達を仲介する作用をもち、中でもインテグリンシグナルの研究は免疫系細胞において非常に進んでいる。そこで、本研究では神経幹細胞におけるインテグリンの発現と増殖およびニューロンへの分化の関係解明を目的とした。特にインテグリンに注目した別の理由として、免疫系では一般的な実験手法でありながら神経系ではあまり用いられて来なかったフローサイトメトリーによる定量的な解析が可能であった点があげられる。

第1章 インテグリン $\alpha_5\beta_1$ による神経幹細胞の増殖調節

本研究では神経幹細胞を選択的に培養するための基質としてフィブロネクチンを用いていたことから、その主要なレセプターであるインテグリン β_1 の発現について解析を試みた。胎生14.5日目のマウス終脳より調製した初代培養神経幹細胞を用いてフローサイトメトリーによる解析を行った結果、インテグリン β_1 の発現量の異なる2つの細胞群 (β_1^{high} および β_1^{low}) が認められた。このことから、 β_1^{low} 細胞群ではインテグリン β_1 の発現量が量的に少ないことがフィブロネクチンとの細胞-基質間相互作用に影響を与え、 β_1^{high} 細胞群よりも増殖能が低いことが予期された。そこで、セルソーターを用いてインテグリン β_1 の発現量の差による神経幹細胞の分離培養実験を行い、各細胞群の増殖能の違いについて解析を試みた。細胞の分離後、1週間培養を行い、各細胞群における生細胞数を計測した。その結果、 β_1^{high} 細胞群では細胞数があまり変化しなかったのに対し、 β_1^{low} 細胞群では培養翌日から細胞数が急激に減少した。これにより、神経幹細胞においてインテグリン β_1 の発現量が細胞の増殖に影響を与えることが明らかとなり、フィブロネクチンとインテグリン β_1 が接着することによって引き起こされる細胞-基質間相互作用が神経幹細胞の増殖において重要な役割を担うことが示唆された。続いて、インテグリン β_1 がヘテロダイマーを形成する α サブユニットの同定を試みた。本実験では、初代培養細胞よりも均一な細胞集団である株化神経幹細胞 (MSP-1 および MHP-2 細胞) を用いて発現解析を行った。フィブロネクチンをリガンドとするインテグリンとして複数のものが報告されているが、本研究では $\alpha_5\beta_1$ および $\alpha_v\beta_1$ について解析を行った。その結果、インテグリン β_1 とともに α_5 および α_v の共発現が認められた。また、MSP-1 細胞を用いて最も主要なフィブロネクチンレセプターとして知られるインテグリン $\alpha_5\beta_1$ の染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った結果、複数のインテグリンがクラスター化した接着斑と思われる構造が数多く認められた。インテグリンは接着斑を形成することによって細胞内外のシグナル伝達を仲介する作用をもつことから、インテグリン $\alpha_5\beta_1$ が神経幹細胞の増殖のためのシグナルを仲介している可能性が示唆された。

第2章 グルタミン酸による神経幹細胞の増殖調節

第1章において接着分子であるインテグリンの発現が神経幹細胞の増殖に影響を与えることが明らかとなったことから、本章ではインテグリンの発現を調節する外的因子の同定を試

みた。その中でも最も主要な神経伝達物質であるグルタミン酸に注目した。まず、株化神経幹細胞である MSP-1 および MHP-2 細胞を用いて、カルシウムイメージング法によりグルタミン酸受容体の解析を行った。その結果、グルタミン酸刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が認められ、両細胞においてグルタミン酸受容体が機能していることが確認された。次に、培地中に高濃度のグルタミン酸が含まれるため、常に細胞がグルタミン酸によって刺激された状態であったことから、両細胞のグルタミン酸を含まない培地への適応化を試みた。その結果、MHP-2 細胞からはグルタミン酸非存在下においても増殖可能な亜株の樹立に成功した一方、MSP-1 細胞は増殖することができず早期に死滅した。この原因として、MSP-1 細胞と MHP-2 細胞の性質的な違いが考えられた。第 1 章におけるインテグリンの発現解析から、特にインテグリン $\alpha_5\beta_1$ の発現パターンが 2 つの細胞株では異なることを見出した。すなわち、MSP-1 細胞がインテグリン $\alpha_5\beta_1$ を高発現する細胞でのみ構成されていたのに対し、MHP-2 細胞はインテグリン $\alpha_5\beta_1$ の発現量の多い細胞と少ない細胞の両方によって構成されていた。このことから、MHP-2 細胞においてのみ認められたインテグリン $\alpha_5\beta_1$ の発現量の少ない細胞が、グルタミン酸非存在下においても増殖し、最終的に亜株として樹立された可能性が示唆された。その一方で、インテグリン $\alpha_5\beta_1$ を高発現する MSP-1 細胞の増殖にはグルタミン酸の存在が必要不可欠であった。加えて、初代培養神経幹細胞を用いて上記と同様のグルタミン酸非存在下における培養を試みたところ、細胞の増殖にはグルタミン酸が必要であった。これらのことから、神経幹細胞の増殖がグルタミン酸によって調節されていることが示唆された。

第 3 章 神経幹細胞からニューロンへの分化に伴うインテグリン $\alpha_5\beta_1$ の発現低下

第 1 章および第 2 章では、初代培養細胞や株化細胞といった *in vitro* における培養を経た神経幹細胞を用いて解析を行ったため、その影響を完全には否定できなかった。そこで、本章では中枢神経幹細胞に特異的に発現する中間径フィラメントである nestin のプロモーター下に GFP を組み込んだ pNestin-GFP トランスジェニックマウスを用いて、より *in vivo* に近い状態の神経幹細胞における解析を試みた。そのほとんどが未分化な神経幹細胞によって構成される胎生 10.5 日目の終脳細胞を用いた発現解析の結果、細胞株の場合と異なりインテグリン α_v に関しては非常に低い発現しか認められなかった。そこで、本章では特にインテグリン $\alpha_5\beta_1$ に注目して以下の解析を行った。胎生 10.5 日目から 18.5 日目までの nestin-GFP⁺細胞におけるインテグリン α_5 および β_1 の発現解析を行った結果、胎生 10.5 日目ではそのほと

んどがインテグリン α_5 および β_1 の発現量の多い細胞であったが、発生が進むにつれて発現量の多い細胞に加えて発現量の少ない細胞の増加が認められた。発生とともにニューロンが増加することから、これらの発現量の少ない細胞はニューロン前駆細胞である可能性が示唆された。そこで、nestin-GFP⁺細胞においてインテグリン $\alpha_5\beta_1$ の発現量の異なる 2 つの細胞群 ($\alpha_5\beta_1^{\text{high}}$ および $\alpha_5\beta_1^{\text{low}}$) の存在が認められた胎生 14.5 日目の終脳細胞を用いて、第 1 章と同様の分離培養実験を行った。細胞の分離後、分化抑制剤である bFGF 存在下において 2 日間培養を行った後、 $\alpha_5\beta_1^{\text{high}}$ および $\alpha_5\beta_1^{\text{low}}$ 細胞群における nestin-GFP⁺細胞および MAP2ab⁺ニューロンの数を計測した。その結果、 $\alpha_5\beta_1^{\text{low}}$ 細胞群では bFGF 存在下であったにも拘わらず非常に多くのニューロンの存在が確認され、nestin-GFP⁺ $\alpha_5\beta_1^{\text{low}}$ 細胞については分化の系譜がニューロンへ移行した細胞である可能性が示唆された。一方、 $\alpha_5\beta_1^{\text{high}}$ 細胞群については nestin-GFP⁺ 細胞が多く存在し、それらが神経幹細胞としての性質を維持している可能性が示唆された。そこで、 $\alpha_5\beta_1^{\text{high}}$ 細胞群の神経幹細胞特性を調べる実験を行ったところ、自己複製能および多分化能を有する細胞であることが確認された。また、胎生 14.5 日目の大脳皮質切片を用いて組織染色を行った結果、神経幹細胞が多く存在する脳室周辺域において nestin-GFP とともにインテグリン $\alpha_5\beta_1$ の強い発現が認められ、それらの細胞において第 1 章の MSP-1 細胞と同様の接着斑と思われる構造も観察された。その一方で、分化途中のニューロンが多く存在する中間帯ではその発現が低下していた。これらのことから、神経幹細胞がニューロンへと分化する過程でインテグリン $\alpha_5\beta_1$ の発現が低下することが示唆された。

以上のことから、本研究によって神経幹細胞ではインテグリン $\alpha_5\beta_1$ が高発現しており、神経幹細胞の増殖および形態維持に機能していることが明らかとなった。そして、インテグリン $\alpha_5\beta_1$ の発現量の低下に伴い、単に神経幹細胞の増殖能が低下するだけでなく、ニューロンへの分化にも寄与していることが明らかとなった。本研究によって解明されたこれらの事象は、神経幹細胞からニューロンへの分化機構解明という学問的側面に対してはもちろんのこと、神経幹細胞を利用した中枢神経機能再生という応用的側面に対しても有意義な知見であると言える。