

幹細胞のストレス応答機構が神経分化制御に果たす役割

同志社大学 高等研究教育機構

黒田 貴雄

1. はじめに 目的

脳の中の大脳皮質と呼ばれる場所は、記憶や認知・行動など脳の重要な役割を多く担っている。この多種多様な機能の獲得は、発生期に神経幹細胞と呼ばれる細胞が、必要な種類、必要な数の神経細胞を時間軸に沿って規則正しく生み出し、これを空間的に決まった場所に配置することで可能となっている。発生期の神経幹細胞は、大脳皮質内の脳室に面した脳室帯と呼ばれる限られた領域においてのみ存在しており、そこで増殖と分化を繰り返し、徐々に組織が肥厚し、結果的に整然と機能する大脳皮質が構築される。神経幹細胞の挙動を詳しく見ると、脳室帯内で細胞周期依存的に上下動を繰り返しながら、分裂期に脳室面に接し、ある時は再び細胞周期へ入り、幹細胞自身を生み出すことで未分化状態を維持し、またある時は細胞周期を離れて神経細胞へと分化する。この神経幹細胞の未分化維持と神経分化という運命決定が如何にして行われているか？は大きな問題となっており、これまでに多くの研究がなされているが、未だ不明な点が多く残っている。私の最終目標はこの分子機構を明らかにすることである。

この問題に対する切り口として、私は、神経幹細胞を取り巻く酸素環境に注目した。何故なら、神経幹細胞の増殖や分化が最も盛んに行われる胎児期の脳は、血管があまり通っておらず、低酸素状態であると考えられたからである。また、これまでに、幹細胞の性質と低酸素との関係が報告されており、例えば、増殖能や分化能の高い造血幹細胞は、骨髄中で低酸素領域に集まることが明らかになっている (Parmar et. al., *PNAS*, 2007)。そこで私は、胎児期の脳は低酸素状態であり、その環境が神経幹細胞の運命決定に寄与しているのではないかと仮説を立て、本研究でそれを検証することとした。

2. 方法

胎生期大脳皮質の組織内の酸素濃度の定量は、蛍光を発する金属錯体が酸素分子と結合すると消光するという原理を利用したニードル式のマイクロセンサーを用いて行った。大脳皮質内の低酸素領域の検出は、低酸素環境下において還元され、細胞内のタンパク質のチオール基と共有結合を形成するピモニダゾールという低酸素応答プローブを使用し、抗体を用いて免疫組織学的に検出することで、組織内の低酸素領域を同定した。細胞内ミトコンドリア ROS は、細胞に、ミトコンドリア ROS を選択的に検出できる蛍光試薬である Mito-SOX を反応させ、FACS を用いて検出した。細胞内のミトコンドリア ROS 量の人為的増加には、SOD 阻害剤である DETC を使用した。神経幹細胞の未分化性維持および増殖能の検討は、ニューロスフェアアッセイによって行った。この方法は、幹細胞としての性質が高い細胞程大きな細胞塊を作り、逆に幹細胞としての性質を失っている細胞は細胞塊を作れないことを利用した評価方法である。胎児大脳皮質への遺伝子導入には、in utero エレクトロポレーション法を用いた (Saito and Nakatsuji, *Dev Biol*, 2001)。

3. 結果 研究成果

まず始めに、胎生期大脳皮質の組織内の酸素濃度を、ニードル式のマイクロセンサーを用いて定量を試みた。その結果、神経分化が盛んな胎齢 12 日～15 日頃の大脳皮質では、1～2%程度の酸素濃度に組織が保たれていることが明らかとなり、この酸素濃度は一般的に知られている生理的な酸素濃度であることが確認された。この実験によって、大脳皮質組織内全体として酸素濃度が低いことは確かめられたが、組織内の何処が酸素濃度が低いのかについては確認できなかった。そこで次

に、大脳皮質組織中の低酸素領域を同定するため、低酸素応答プローブであるピモニダゾールを用いて、免疫組織学的手法を用いて低酸素領域の同定を試みた。その結果、神経幹細胞が存在する脳室帯の、特に、脳室に面した場所が低酸素に保たれていることが明らかとなった。

これまでの報告から、低酸素状態では活性酸素種（ROS）の量が増加することが報告されている（Ralph et. al., *Mol Aspects Med*, 2010）。そこで、ROS に注目し、神経幹細胞における低酸素と ROS の関係について解析した。胎児大脳皮質から神経幹細胞を分取し、20%または 2%酸素環境下で培養後、ミトコンドリア ROS 応答プローブである Mito-SOX を反応させ、FACS を用いてミトコンドリア ROS 量の定量を行った。その結果、低酸素環境に曝された神経幹細胞は、細胞内のミトコンドリア ROS 量が顕著に増加していることが明らかとなった。次に、胎児の発生に伴うミトコンドリア ROS 量の変化を解析した。発生段階を追って、大脳皮質から細胞を回収し、ミトコンドリア ROS 量を解析した結果、未分化な神経幹細胞が多く存在している胎生初期の大脳皮質では、ミトコンドリア ROS 量が多い細胞が多く、発生が進むにつれ、分化した神経が増えてくると、ミトコンドリア ROS 量が少ない細胞が増えてくることが明らかとなった。細胞内のミトコンドリア ROS 量と神経幹細胞の性質との関係性を解析するために、未分化な神経幹細胞のマーカーである CD133 とミトコンドリア ROS との発現を、FACS を用いて解析した結果、CD133 の量、つまり未分化性維持の強さと、ミトコンドリア ROS 量に正の相関があることが明らかとなった。さらに、大脳皮質から分取した神経幹細胞に SOD 阻害剤を反応させ、細胞内の ROS 量を増加させた結果、神経幹細胞の未分化性および増殖能の指標となるニューロスフェア形成能が顕著に亢進することが明らかとなった。

神経幹細胞において、ミトコンドリア ROS 量が多くなる分子機構を明らかにしたいと考え、ミトコンドリア ROS 量が異なる 2 つの細胞集団を FACS によって分取し、マイクロアレイで遺伝子発現解析を行った。ROS 産生に関わる因子群の発現量を比較した結果、Prdm16 という遺伝子の発現量がミトコンドリア ROS 量の多い細胞で顕著に高いことが明らかとなった。Prdm16 はこれまでに、oncogene であることが報告されていたが、その機能や発現場所についてはあまり調べられていなかった。そこで、Prdm16 に対する抗体を作製し、胎児大脳皮質での発現を解析した結果、脳室帯に存在している神経幹細胞でのみ Prdm16 が発現していることが明らかとなった。最後に、Prdm16 とミトコンドリア ROS との関係性を解析するため、in utero エレクトロポレーション法によって胎児大脳皮質内の神経幹細胞において、Prdm16 の発現を直接変化させた結果、Prdm16 を過剰発現させると、ミトコンドリア ROS 量の多い細胞が増加し、逆に、Prdm16 をノックダウンすると、ミトコンドリア ROS 量が少ない細胞が多くなることが明らかとなった。

4. 考察 まとめ

以上の結果から、神経幹細胞において、Prdm16 がミトコンドリア ROS 量の上昇に働き、このミトコンドリア ROS 量の上昇が神経幹細胞の未分化性を強めていることが明らかとなった。

5. 発表論文、参考文献

Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD, Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia, *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (2007) 5431-5436.

Saito T, Nakatsuji N, Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation, *Dev Biol*, 240 (2001) 237-246.

Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Neuzil J, Saavedra E, Moreno-Sánchez R, Down JD, The causes of cancer revisited: "mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy, *Mol Aspects Med*, 31 (2010) 145-170.