

学位論文題名

不死化神経幹細胞株の樹立と塩基性線維芽細胞増殖因子による
遺伝子発現変化の解析

学位論文内容の要旨

【序論】

脳神経系は多種多様な細胞によって構成され、複雑な神経回路網を形成している。脳細胞の多様性は、神経幹細胞において内在的にプログラムされた遺伝子発現とともに、環境に由来する分化因子の作用によって生じると考えられている。従来、分化因子の神経幹細胞に対する作用は、主に初代培養系を用いて解析されてきた。しかし初代培養系は構成細胞の不均一性や、得られる細胞の量が限られるといった点で問題があった。このような問題点を克服する一つのアプローチとして、脳の特定の領域由来の神経幹細胞に発癌遺伝子等を導入し、*in vivo* の遺伝子発現を保持したまま増殖能を獲得した不死化細胞株を樹立することが有用である。

一方、脳神経系の発達、生存および神経機能の維持には、神経栄養因子と総称される一群の物質が、重要な役割を果たしていることが知られている。特に神経成長因子(NGF)は最初に分子としての実体が解明され、脳内においては前脳基底部の中隔野神経細胞の生存を維持し、神経伝達物質の合成を促進することが明らかとなっている。しかし、未分化な神経幹細胞がどのような分化因子の作用により NGF に対する応答性を獲得し、成熟した中隔野神経細胞へと分化するのかについては、詳細な解析はなされていない。そこで本研究では、中隔野神経細胞の分化機構を解析するために、ラット胎児中隔野より細胞を単離し、SV40 T 抗原遺伝子を導入して、中隔野由来不死化神経幹細胞株を多数樹立した。

【不死化神経幹細胞株の樹立】

胎生 15 日目ラットより中隔野を切り出し、細胞を 1 日培養後に SV40 T 抗原遺伝子発現プラスミドおよびブラストサイジン耐性遺伝子発現プラスミドを導入した。ブラストサイジンにより細胞を選択し、増殖性のある不死化細胞株を 32 クローン樹立した。初期スクリーニングとして、NGF を含む神経栄養因子および bFGF, EGF, PDGF 等のサイトカインを不死化細胞株に作用させた。その結果、bFGF により形態変化を引き起こす細胞株(EG6)が見いだされた。EG6 細胞は扁平な神経上皮細胞様の形態を示すが、bFGF 処理により細胞体の収縮と突起の伸展を引き起こした。EG6 細胞において、神経幹細胞、神経細胞およびグリア細胞に特異的なマーカー遺伝子の発現を調べた結果、神経幹細胞のマーカー遺伝子であるネスチン遺伝子を発現していた。

【bFGF による trkA 遺伝子の発現誘導】

中隔野神経細胞は海馬に投射し、海馬神経細胞が産生する NGF によりその生存が維持され、神経伝達物質合成酵素の活性が増加することが知られている。そこで、EG6 細胞における高親和性 NGF 受容体遺伝子(trkA)の発現を、RT-PCR 法を用いて検討した。その結果、未処理の EG6 細胞では trkA 遺伝子の発現は検出されなかったが、bFGF で 5 日間処理した EG6 細胞において、trkA 遺伝子の発現が検出された。一方、低親和性 NGF 受容体(p75)遺伝子の発現は、未処理の細胞および bFGF で処理した細胞の両者ともに検出されなかった。脳内において trkA 遺伝子は中隔野を含む前脳基底部の NGF 応答性神経に局在することが知られている。したがって、EG6 細胞は bFGF により中隔野 NGF 応答性神経の前駆細胞に分化する可能性が示唆された。また、中隔野神経幹細胞は trkA のリガンドである NGF 自身を発現していることが報告されている⁸⁾。そこで EG6 細胞における NGF 遺伝子の発現を調べたところ、未処理および bFGF で処理した EG6 細胞はともに NGF 遺伝子を発現していた。したがって、bFGF による trkA 遺伝子の発現誘導により、内在的に発現している NGF が EG6 細胞自身に作用する可能性が示唆された。

【mRNA-ディファレンシャルディスプレイ法を用いた bFGF による遺伝子発現変化の解析】

bFGF による EG6 細胞における遺伝子発現変化を mRNA-ディファレンシャルディスプレイ法により解析した。26 種の任意プライマー(10 mer) および 3 種のアンカープライマーの計 78 通りの組合せを用いてディスプレイを行い、bFGF 処理にともなう発現量が増加するバンドを切り出してクローニングした。その結果、bFGF により発現が誘導される遺伝子として、カルモジュリンを含む 6 種の遺伝子がクローニングされた。また、発現が抑制される遺伝子として、細胞外マトリクスの一つであるトロンボスポンジン 1 を含む 4 種の遺伝子がクローニングされた。トロンボスポンジンは胎生初期の脳に一過的に発現し、神経幹細胞の移動および分化に関与することが知られている。他の遺伝子との相同性がない未知の遺伝子については、発達過程の脳における発現および組織分布について解析した。クローン 1G-2 は胎児期の脳を含む種々の組織に発現し、その発現は成体において減少した。特に脳においては生後まもなく発現が減少し、成体では検出できなかった。このことから、クローン 1G-2 は脳を含む種々の組織の発達過程において機能することが示唆された。一方、クローン 2C は胎生 15 日目ごろから脳に発現し、非神経組織においてはほとんど検出されなかった。成体の種々の神経組織における発現を調べた結果、脳の広い範囲で発現が検出されたが、脊髄における発現レベルは低く、末梢神経系の後根神経節においてはほとんど検出されなかった。以上のことから、クローン 2C は脳神経系の発達および分化した脳神経細胞の機能に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

【結論】

1. ラット胎児中隔野より不死化細胞株(EG6 細胞)を樹立した。
2. EG6 細胞は神経幹細胞に特異的なネスチン遺伝子を発現しており、bFGF による形態変化に伴って trkA 遺伝子を発現することから、中隔野 NGF 応答性神経前駆細胞に由来する可能性が示唆された。
3. EG6 細胞において bFGF により発現量が増加する遺伝子を、mRNA-ディファレンシャルディスプレイ法を用いて多数クローニングした。
4. bFGF により発現が誘導される遺伝子であるクローン 2C は、発達過程の脳および成体の脳に特異的に発現していることから、脳神経細胞の分化および成熟した神経細胞の機能に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	栗原堅三
副査	教授	野村靖幸
副査	助教授	三宅教尚
副査	助教授	徳光幸子

学位論文題名

不死化神経幹細胞株の樹立と塩基性線維芽細胞増殖因子による 遺伝子発現変化の解析

申請者は、長年脳神経系の細胞の分化機構を研究していたが、このほど上記の題名の研究を学位論文としてまとめ、提出してきた。この論文について、審査委員会は慎重審査を行った。

脳神経系は多種多様な細胞によって構成され、複雑な神経回路網を形成している。脳細胞の多様性は、神経幹細胞において内在的にプログラムされた遺伝子発現とともに、環境に由来する分化因子の作用によって生じると考えられている。従来、分化因子の神経幹細胞に対する作用は、主に初代培養系を用いて解析されてきた。しかし初代培養系は構成細胞の不均一性や、得られる細胞の量が限られるといった点で問題があった。これらの問題点を克服する一つのアプローチとして、不死化細胞株の活用がある。不死化細胞株は、特定の未分化な神経組織より単離した神経幹細胞に、SV40 T 抗原遺伝子や、myc 遺伝子等を導入して作成される。これらの細胞株は、分化能と増殖能を合わせ持つ均一な細胞集団であり、神経分化機構の細胞レベルならびに分子レベルの解析に適している。

一方、脳神経系の発達、生存および神経機能の維持には、神経栄養因子と総称される一群の物質が、重要な役割を果たしていることが知られている。例えば、海馬神経細胞は代表的な神経栄養因子である神経成長因子

(NGF)を産生し、この NGF が海馬に投射している中隔野神経細胞の生存を維持することが報告されている。しかし、未分化な神経幹細胞がどのような分化因子の作用により NGF に対する応答性を獲得し、成熟した中隔野神経細胞へと分化するかについては、詳細な解析はなされていない。そこで申請者は、中隔野神経細胞の分化機構を解析するために、ラット胎児中隔野より細胞を単離し、SV40 T 抗原遺伝子を導入して、中隔野由来不死化神経幹細胞株を多数樹立した。

【不死化神経幹細胞株の樹立】

胎生 15 日目ラットより中隔野を切り出し、細胞を 1 日培養後に SV40 T 抗原遺伝子発現プラスミドおよびブラストサイジン耐性遺伝子発現プラスミドを導入した。ブラストサイジンにより細胞を選択し、増殖性の不死化細胞株を 32 クローン樹立した。初期スクリーニングとして、NGF を含む神経栄養因子および bFGF, EGF, PDGF 等のサイトカインを不死化細胞株に作用させた。その結果、bFGF により形態変化を引き起こす細胞株(EG6)を見いだした。EG6 細胞は扁平な神経上皮細胞様の形態を示すが、bFGF 処理により細胞体の収縮と突起の伸展を引き起こした。EG6 細胞において、神経幹細胞、神経細胞およびグリア細胞に特異的なマーカー遺伝子の発現を調べた結果、神経幹細胞のマーカー遺伝子であるネスチン遺伝子を発現していることを確認した。

【bFGF による trkA 遺伝子の発現誘導】

中隔野神経細胞は海馬に投射し、海馬神経細胞が産生する NGF によりその生存が維持される。また、NGF により神経伝達物質合成酵素の活性が増加することが知られている。そこで、申請者は EG6 細胞における高親和性 NGF 受容体遺伝子(trkA)の発現を、RT-PCR 法を用いて検討した。その結果、未処理の EG6 細胞では trkA 遺伝子の発現は検出されなかったが、bFGF で 5 日間処理した EG6 細胞において、trkA 遺伝子の発現を検出した。一方、低親和性 NGF 受容体(p75)遺伝子の発現は、未処理の細胞および bFGF で処理した細胞の両者ともに検出されなかった。脳内において trkA 遺伝子は中隔野を含む前脳基底部の NGF 応答性神経に局在することが知られている。

したがって、EG6 細胞は bFGF により中隔野 NGF 応答性神経の前駆細胞に分化する可能性が示唆された。また、中隔野神経幹細胞は trkA のリガンドである NGF 自身を発現していることが報告されている。そこで申請者は EG6 細胞における NGF 遺伝子の発現を調べ、未処理および bFGF で処理した EG6 細胞はともに NGF 遺伝子を発現していることを明らかにした。したがって、bFGF による trkA 遺伝子の発現誘導により、内在的に発現している NGF が EG6 細胞自身に作用する可能性を示唆した。

【mRNA-ディファレンシャルディスプレイ法を用いた bFGF による遺伝子発現変化の解析】

申請者は、bFGF による EG6 細胞における遺伝子発現変化を mRNA-ディファレンシャルディスプレイ法により解析した。26 種の任意プライマー(10 mer) および 3 種のアンカープライマーの計 78 通りの組合せを用いてディスプレイを行い、bFGF 処理にともなって発現量が変化するバンドを切り出してクローン化した。その結果、bFGF により発現が誘導される遺伝子として、カルモジュリンを含む 6 種の遺伝子がクローニングされた。また、発現が抑制される遺伝子として、細胞外マトリクスの一つであるトロンボスポンジン 1 を含む 4 種の遺伝子がクローニングされた。トロンボスポンジンは胎生初期の脳に一過的に発現し、神経幹細胞の移動および分化に関与することが知られている。他の遺伝子との相同性がない未知の遺伝子については、発達過程の脳における発現および組織分布について解析した。クローン 1G-2 は胎児期の脳を含む種々の組織に発現し、その発現は成体において減少した。特に脳においては生後まもなく発現が減少し、成体では検出できなかった。このことから、クローン 1G-2 は脳を含む種々の組織の発達過程において機能することが示唆された。一方、クローン 2C は胎生 15 日目ごろから脳に発現し、非神経組織においてはほとんど検出されなかった。成体の種々の神経組織における発現を調べた結果、脳の広い範囲で発現が検出されたが、脊髄における発現レベルは低く、末梢神経系の後根神経節においてはほとんど検出されなかった。以上のことから、クローン 2C は脳神経系の発達および分化した脳神経細胞の機能に重要な役割

を果たしている可能性が示唆された。

以上のように、申請者の提出した論文は、神経分化に関する多くの新しい知見を含んでおり、博士（薬学）の学位を与えるにふさわしい論文と判定した。