

学位論文題名

Analysis of the Expression and Function of  
BRINP Family Genes During Neuronal Differentiation  
in Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Neural Stem Cells

(ES細胞由来神経幹細胞の分化過程における  
神経特異的遺伝子 BRINP ファミリーの発現変化と機能解析)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

脊髄損傷に対する確実で有効な治療法の開発のためには、脊髄損傷およびその修復過程に関する複雑なメカニズムを明らかにすることが重要だが、既知の遺伝子のみではそのメカニズムを説明できず、解明に向けて未知の遺伝子も含めた新たな糸口が必要とされている。

我々はこれまでに、交感神経細胞の分化過程において骨形成因子 (BMP : Bone morphogenetic protein) とレチノイン酸 (RA) によって発現が調節される新規タンパク質ファミリー、BRINP (BMP/RA-Inducible Neural specific Protein-1, 2, 3) を同定した。BRINP ファミリーは、種間で保存性が極めて高いが、既知のタンパク質と類似性を全く有さない新規のタンパク質ファミリーであり、中枢および末梢神経系の広範な領域において発達期から神経細胞特異的に発現している。また我々は強制発現させた各 BRINP が正常動物細胞に対して細胞周期抑制能を有することを明らかにした。この知見から、各 BRINP 遺伝子は増殖性の神経幹細胞から非増殖性の神経細胞へと分化する過程で、細胞周期の抑制を介した神経分化調節に関与していると考えられる。

今回我々は、ES細胞由来神経幹細胞の分化過程における神経特異的遺伝子 BRINP ファミリーの発現変化の検討と機能解析を行った。

【方法と結果】

マウス ES細胞 (ES) を Neural Stem Sphere 法を用いて神経幹細胞 (NSC) へ分化させた。フィーダー細胞上で7日間培養した ES コロニーを拾い集め、astrocyte conditioned medium 上で4日間浮遊培養後、Neurobasal medium / B27 (NSC medium) 培地上で7日間付着培養すると、ESコロニー周囲に NSC の遊走がみられた。この NSC を採取し、neuron differentiation medium (NDM) 上で神経細胞へ、astrocyte differentiation medium (ADM) 上でアストロサイトへ分化した。NDM 上で培養後1日から NSC の形態変化が開始し、7日では多数の軸索が認められた。免疫染色では 8III 陽性の神経細胞は  $\geq 60\%$  であった。一方、NSC は ADM 上で21日間培養後、 $>99\%$  が GFAP 陽性のアストロサイトへ分化していた。

また ES, NSC, 神経細胞, アストロサイト各細胞群の状態を、マーカー遺伝子 (ES, Oct4; 神経幹細胞, Nestin; 神経細胞, 8III; アストロサイト, GFAP) の発現量により評価した。ES の代表的なマーカー遺伝子である Oct4 は ES のみで発現がみられた。Nestin の発現は NSC で最も高く、神経細胞およびアストロサイトへの分化とともに発現量が減少した。8III と GFAP の発現量は、NSC から神経細胞の分化に従い前者が、アストロサイトへの分化に従

い後者が、それぞれ増加した。

各細胞群における BRINP 遺伝子の発現量は Real-time RT-PCR 法で定量した。ES では BRINP1,2,3 いずれも発現がみられなかった。NSC では BRINP2,3 の発現がみられた。NSC から神経細胞への分化過程では、BRINP1 が誘導され、BRINP2,3 の発現が増加した。

BRINP の機能解析として、NSC に各 BRINP を強制発現させ、細胞周期をフローサイトメトリー法で測定した。指数増殖期にある NSC では、G1 期にある細胞は 69.2%、S 期 26.1% および G2 期 7.7% であったが、各 BRINP を強制発現させた NSC では、G2 期にある細胞は消失し、S 期は 11.8-13.8% と減少し、いずれの BRINP も NSC に対して細胞増殖抑制効果を有することが明らかとなった。

### 【考察】

脊髄損傷に対する治療研究は数多くなされているが、脊髄損傷からの回復は非常に限られており、一度受傷するとその後、四肢麻痺・対麻痺などの重篤な後遺症を抱えていくことになる。脊髄損傷の病態は、治療介入の対象となる急性期（受傷～約1週）と亜急性期（1週～数週）、およびリハビリテーションをはじめとする保存的治療が中心となる慢性期（数週以降）に分けられる。急性期は、直接的な物理的障害に引き続いて生じる炎症を伴う化学反応により二次的に神経細胞死が誘導され、神経障害が増悪する時期である。亜急性期は急性期の二次的神経障害を経て、損傷軸索の修復および神経回路の代償的改編が行われる時期である。成熟個体の脊髄組織中には内在性の神経幹細胞が存在し、損傷修復に重要な役割を担っていると考えられており、近年注目を集めている外来的な幹細胞の移植治療は、この幹細胞の再生促進能力に期待したものである。脊髄損傷に対する幹細胞移植治療に関して、多くの研究者が神経再生促進・麻痺症状の改善効果を報告しているが、一方で異常疼痛などの副作用の可能性も報告されており、治療効果は一定していない。移植細胞の実際の役割に関しても解明されておらず、移植細胞が損傷修復に寄与するオリゴデンドロサイトに分化する一方で、再生阻害に寄与するアストロサイトにも分化してしまい、修復促進に向けた移植細胞の制御方法が問題となっている。急性期・亜急性期への治療介入は確実な有効性が示唆されているものは限られており、有効性が報告されていてもその作用機序が解明されていないものも多い。確実で有効な治療法の開発のためには、脊髄損傷およびその修復過程に関する複雑なメカニズムを明らかにすることが重要であるが、既知の遺伝子のみでその複雑なメカニズムを説明できず、解明に向けて未知の遺伝子も含めた斬新な糸口が必要とされている。

我々が発見した神経特異的新規遺伝子群 BRINP ファミリーの機能として、通常の増殖性の細胞において強制発現させた BRINP が細胞周期を抑制すること、発達期の神経幹細胞に対して細胞周期移行抑制作用を有することがわかっている。

本研究においては、ES 細胞では全ての BRINP の発現はほとんどみられなかったが、BRINP2,3 は ES 細胞から神経幹細胞へ分化する過程で発現が上昇した。BRINP1 は神経幹細胞では発現が認められなかった。神経幹細胞から神経細胞への分化過程においては全ての BRINP の発現が有意に上昇した。本研究により、全ての BRINP は ES 細胞由来神経幹細胞に対しても細胞周期抑制作用を有することが明らかとなった。このことから、BRINP が神経幹細胞の細胞周期の抑制とともに神経細胞への分化調節にも関与している可能性が示唆された。今後、脊髄損傷に対する幹細胞移植治療において、BRINP ファミリーが新たな治療標的となる可能性も期待できる。

### 【結論】

ES 細胞由来神経幹細胞の分化過程において、各 BRINP はそれぞれ異なる段階で発現が誘導され、調節をうけることが明らかとなった。また各 BRINP は細胞周期抑制作用を有しており、BRINP ファミリーによる細胞周期の抑制が神経幹細胞の分化調節に関与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 佐々木 秀 直

副 査 教 授 寶 金 清 博

副 査 教 授 三 浪 明 男

学 位 論 文 題 名

## Analysis of the Expression and Function of BRINP Family Genes During Neuronal Differentiation in Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Neural Stem Cells

(ES 細胞由来神経幹細胞の分化過程における

神経特異的遺伝子 BRINP ファミリーの発現変化と機能解析)

神経細胞は、他の増殖性細胞と異なり、細胞分裂によりその数を増やすことはないため、神経細胞には不要な細胞分裂を抑制して神経回路網の形態的安定性を維持するメカニズムが存在していると考えられるが、その詳細についてはこれまでに完全には明らかになっていない。

我々はこれまでに新規神経特異的遺伝子群 BRINP (BMP/RA-Inducible Neural specific Protein-1, 2, 3) ファミリーを同定した。これまでの研究で、各 BRINP 遺伝子は、脳の形成初期から強く発現しており、また脳の発達過程において、その発現は変化していること、正常動物細胞に対して細胞周期抑制能を有することがわかっている。

今回我々は、ES 細胞由来神経幹細胞の分化過程における神経特異的遺伝子 BRINP ファミリーの発現変化の検討と機能解析を行った。

Neural Stem Sphere 法を用いて ES 細胞から神経幹細胞へ分化誘導を行った。その後、神経幹細胞を BDNF, レチノイン酸, ホルスコリンを用いて神経細胞へ分化した。各細胞群を免疫染色および定量的 RT-PCR 法で評価した上で、BRINP ファミリーの発現変化を定量的 RT-PCR で評価した。ES 細胞では全ての BRINP の発現はほとんどみられなかった。ES 細胞から神経幹細胞への分化過程では、BRINP2・3 の発現が認められ、神経幹細胞から神経細胞への分化過程では、BRINP1 が誘導され、BRINP2・3 の発現が増加した。また神経幹細胞に各 BRINP 遺伝子を強制発現させ、細胞周期解析を行ったところ、全ての BRINP 遺伝子が神経幹細胞に対して細胞周期抑制能を有していることが明らかとなり、BRINP ファミリーが神経幹細胞の細胞周期の抑制とともに、神経細胞への分化調節にも関与している可能性が示唆された。BRINP ファミリーは神経分化に伴って誘導され、発現量は増加するが、BRINP1 は、BRINP2・3 と異なり、神経幹細胞から神経細胞への分化過程のみで発現が誘導されることから、BRINP1 が神経分化において、クリティカルな役割を果たしていると考えられた。

審査にあたり、副査寶金教授から BRINP ファミリーのもつ神経保護作用は申請者の研究で明らかになった事なのか、BRINP には細胞周期抑制能があるようだが、腫瘍形成との関連性はあるか、BRINP KO マウスを作成することと脊髄損傷との関連性はどういう点か、との質問があった。申請者は神経保護作用に関しては前任者の研究で明らかになったことで

あること、ヒト膀胱癌において BRINP1 の発現が抑制されている事がわかっており、神経系以外において BRINP ファミリーが腫瘍形成抑制に関与している可能性があること、BRINP ファミリーは脊髄以外の中枢および末梢神経系に広く発現が認められているため、KO マウスの解析により、脊髄損傷以外の疾患にも関与している可能性があり解析を行っていることを回答した。次いで副査三浪教授から、BRINP1,2,3 のタンパク構造の相同性はどれくらいか、BRINP KO マウス脊髄損傷モデルでは神経回復はとなると予想されるか、との質問があった。申請者は BRINP1,2,3 の相同性はタンパクレベルで 50-70% と高いこと、BRINP1 KO マウスについては、行動解析が終了後に脊髄損傷モデルを作成し検討する予定であることを回答した。最後に主査佐々木教授から、BRINP1 KO マウスでは神経系へ発達は組織レベルや細胞レベルでも正常か、BRINP が成人発症の神経疾患に関わるという報告はあるかとの質問があった。申請者は BRINP1 KO マウスでは神経系に組織学的な異常は見られなかったが、細胞レベルの検討はまだ行えていないこと、現時点では成人発症の神経疾患に関わるという報告はないが、BRINP1 KO マウスの行動解析で多動性の増加、social interaction の低下が認められていることから、BRINP が疾患に関与する可能性があることを回答した。

この論文は、BRINP ファミリーが神経幹細胞の細胞周期の抑制とともに、神経細胞への分化調節にも関与している可能性を示唆しており、さらなる研究により BRINP1 遺伝子が神経損傷のメカニズム解明や治療法の開発に重要な役割を担っていくと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。