

研究成果報告書の概要

講座等名	解剖学講座	事業推進者名	北田 容章
所属部門	神経部門		
分担研究課題	主要臓器の幹細胞及びその系譜細胞の分子イメージングによる正常及び病理組織解析		
キーワード	分子イメージング、転写制御、非コードRNA とその機能		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	8名		
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）</p> <p>主任教授：北田容章（神経科学系研究総括・組織学的解析）、准教授：田中進（婦人科学・泌尿器科学系研究総括・分子生物学的イメージング解析）、講師：加瀬政彦（組織学的解析）・平原幸恵（質量分析顕微鏡解析）・林真一（遺伝学的組織学解析）、助教：大江総一（分子生物学的イメージング解析）・小池太郎（組織学的解析・微細形態電子顕微鏡解析）・中野洋輔（組織学的解析）</p>			
<p>研究成果の概要（令和元（2019）・令和2（2020）年度の研究成果について）</p> <p>2019年度・2020年度において、以下の研究等を取扱った。</p> <p>シュワン細胞は末梢神経系のグリア細胞であるが、中枢神経系・末梢神経系への移植により軸索への髄鞘形成に加え、神経再生を支持する細胞として有用であり、再生医療への応用が期待されている。われわれは線維芽細胞に様々なサイトカインを経時的に作用させることで、シュワン細胞を誘導可能であることを示した。また、この誘導シュワン細胞を末梢神経切断モデルに移植することで、その神経再生支持機能と髄鞘形成能について証明した。</p> <p>SSEA-3 はヒト多能性幹細胞のマーカーとして用いられているが、生体内に存在する多能性幹細胞として Muse 細胞が挙げられる。われわれはヒト末梢血中に SSEA-3/CD45 両陽性細胞が存在することを見出した。この細胞は脳・骨格筋・肝といったそれぞれの臓器が傷害された免疫不全マウスへの移植により、それぞれの臓器特有の細胞へと分化をしたことから、ヒト末梢血 SSEA-3/CD45 両陽性細胞は Muse 細胞様の能力を示した。これらのことは、末梢血中には SSEA-3/CD45 両陽性細胞という、これまで知られていなかった性質を示すことを示唆している。</p> <p>子宮内膜に含まれる子宮 NK 細胞はらせん状動脈のリモデリングを促進し、免疫寛容を誘導する。一方、プロゲステロンによって脱落膜化する子宮内膜間質細胞から分泌される IL15 が子宮 NK 細胞を活性化させるが、子宮内膜間質細胞において IL15 の発現を制御する転写因子は未同定であった。われわれは転写因子 HAND2 が子宮内膜間質細胞における IL15 の転写制御を制御していることを、定量的 RT-PCR、組織学的解析、ChIP-QPCR、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて明らかにした。これらの結果から、HAND2 は子宮内膜間質細胞において IL15 の転写を直接上昇させることを確認した。</p> <p>両側副腎腫瘍等における両側副腎摘出術においては、ステロイド補充の目的にて摘出副腎の健全部選択的自家移植を行うことがある。移植後副腎は内分泌能の再獲得までに時間を要するが、この過程において形態形成因子であるデザート・ヘッジホッグのびまん性発現上昇が重要であることを既に示している。このデザート・ヘッジホッグの発現制御因子は知られていなかったが、田中らは、転写因子 GATA4/6 がその一つとして重要な因子であることを明らかとした。</p> <p>睡眠覚醒は脳視床下部に存在するオレキシンにより制御されるが、オレキシンの転写制御機構は不明な点が多い。われわれはオレキシンニューロンに共存する転写制御因子 PLAGL1 を同定し、PLAGL1 がオレキシンの転写制御をおこなうことを培養細胞、マウス胎児、ならびにマウス成体を用いて証明した。</p> <p>視神経損傷マウスの網膜変化を組織化学的手法と質量顕微鏡を用い解析した。網膜では、細胞死を起こした神経節細胞と著しいアストロサイトの集積、活性化ミューラー細胞の発現を示していた。</p>			

質量顕微鏡脂質解析においては、脂質分布層が著しく変化し、ドコサヘキサエン酸をもつホスファチジルエタノールアミンの量が上昇していた。視神経損傷は、RGC のみでなく網膜全層に影響を及ぼしていることを示し報告し、軸索伸長促進につながる手がかりを提供した。

再生は全ての脊椎動物で起こる現象であるが、その再生能力の高さは生物種ごとに大きく異なり、その中でも両生類や魚類では失われた器官を完全に再生することができる。DNA のメチル化とヒストンの修飾によるエピゲノム制御は細胞記憶を構築し、この細胞記憶に基づいて元と同じ器官が再生される。われわれは、これまでに積み上げられてきた細胞記憶と再生の関係に関する知見、各種器官再生における最新の分子メカニズムモデルを議論した。

近年、CPEB1 による mRNA 翻訳制御の重要性が報告されている。我々は、CPEB1 自身の転写後発現制御に着目し研究をおこなった。その結果、AUF1 が 3' UTR を介して CPEB1 発現を制御すること、AUF1 ノックダウンにより CPEB1 の mRNA レベルは増加しタンパク質レベルは低下することを明らかにした。これらの結果は、AUF1 が CPEB1 発現において正/負両方向性の役割を担う事を示している。

近年、長鎖非コード RNA (lncRNA) が複数の遺伝子の発現をエピジェネティック、転写、転写後の各段階で制御することが明らかになっている。本総説では、中枢神経系における神経細胞の分化、シナプス形成、シナプス可塑性に関わる遺伝子発現制御において、lncRNA が極めて重要な役割を果たしていることをまとめ、さらに、複数の lncRNA の発現異常が神経疾患の発症に関与していることも明らかにしている。

グリオーマ幹細胞 (GSC) において特異的発現を示す非コード RNA の同定と機能解析をおこなうことでグリオーマ予後改善につながる新規治療法確立を目指している。これまで、遺伝子発現解析により MES 型 GSC 特異的高発現を示す長鎖非コード RNA (lncRNA) およびマイクロ RNA を複数同定している。さらに発現抑制実験等をおこないこれらの非コード RNA が GSC 細胞表現型を制御する可能性があることを明らかにしている。このテーマに関連し研究医養成コース学生 (3 年・柿崎梨緒、阪本純加) を指導し学会発表をおこなっている。

脳梗塞領域に出現する胆汁酸の合成機構と生理機能を解析することで脳梗塞病態における意義を明らかにし新規コレステロール代謝機構としての展開を目指している。これまで、完全梗塞モデルマウスを用いた胆汁酸合成酵素発現細胞の同定、ニューロンにおける胆汁酸合成酵素発現メカニズムの解析、質量顕微鏡による胆汁酸の直接的可視化等を行い、中枢神経系における胆汁酸合成メカニズムを明らかにしている。このテーマに関連し研究医養成コース学生 (5 年・和田早織) の指導をおこなっている。

Array tomography は連続超薄切片を用い三次元的超微形態を観察する手法であり、包埋後染色法を用いることが出来る。一方、correlative light and electron microscopy は、同一細胞の光学顕微鏡像と電子顕微鏡像を得る手法である。両手法を用い、同一細胞で三次元微細構造解析と免疫組織化学的解析をおこなう方法について、自身がおこなった実験を例にして述べた。

正常ラットの脊髄神経節において p75 を発現する細胞を、免疫組織化学・三次元電子顕微鏡法・correlative light and electron microscopy を用いて同定した。この細胞は複数の広汎性グリアマーカーに陽性であるが、既知のグリアと異なった形態を示し、神経節細胞の突起起始部周辺に局在していたことから、新規グリア細胞であることを明らかにした。

細胞やシナプスの微細な構造や機能を解明するため、「遺伝子の戦い」というコンセプトのもと、遺伝子組み換えによる複数のリコンビナーゼの競合を利用した解析手法を開発した。この手法では、複数の導入遺伝子の配分比率を調整することで、単一のシナプスを標識することができる。さらに、この新規遺伝子導入手技と拡大顕微鏡を組み合わせることで、海馬の全シナプス構造の 3 次元高解像度イメージングが可能となり、内在性シナプスタンパク質の可視化が実現した。