

# 難治疾患共同研究拠点共同研究終了報告書

平成 25年 3 月 1 日

東京医科歯科大学難治疾患研究所長 殿

申請者(代表者)

所属機関 新潟大学大学院医歯学総合研究科

職 名 教授

氏 名 竹 林 浩 秀

下記により、共同研究の終了報告を致します。

記

研究題目	(和)転写因子 Olig2 による正常神経幹細胞とグリオーマ幹細胞の分化制御の比較 (英)Roles of Olig2 transcription factor in growth and differentiation of neural stem cells and glioma stem cells		
研究領域番号 (研究領域から選択)	1	研究対象番号 (研究対象から選択)	A
研究領域	1. 難治疾患の病因・病態解明に関する基礎・応用研究 2. 難治疾患の診断・治療・予防法の開発に関する基礎・応用研究 3. 難治疾患研究に有用な解析技術・モデル生物の開発に関する基礎・応用研究		
研究対象	A. 悪性腫瘍の共同研究 B. 脳・神経系難治疾患の共同研究 C. 心・血管系難治疾患の共同研究 D. 運動器系難治疾患の共同研究 E. 免疫・感染系難治疾患の共同研究 F. 代謝系難治疾患の共同研究 G. その他の難治疾患の共同研究		
研究期間	平成 22 年 4 月 1 日 ~ 平成 23 年 9 月 30 日		
研究組織			
氏名	所属機関・部局等	職名	役割分担
竹林浩秀 渡辺啓介 鹿川哲史 田賀哲也 柏木太一 榑 康一	熊本大学生命科学研究部脳回路構造学分野 熊本大学生命科学研究部脳回路構造学分野 東京医科歯科大学難治疾患研究所幹細胞制御分野 東京医科歯科大学難治疾患研究所幹細胞制御分野 東京医科歯科大学難治疾患研究所幹細胞制御分野 東京医科歯科大学難治疾患研究所幹細胞制御分野	准教授 助教 准教授 教授 特任助教 学振特別研究員	細胞分取と組織解析 遺伝子導入 神経幹細胞培養 アレイ解析 細胞培養・遺伝子導入 癌幹細胞培養
難治疾患研究所共同研究対応教員		(共同研究をした教員名を記載) 鹿川哲史准教授、田賀哲也教授、柏木特任助教、榑康一特別研究員	

## 研究成果

転写因子 *Olig2* はグリオーマ(神経膠腫)の悪性度と密接に関わっており、グレードⅢからⅣに進行すると発現が低下する。*Olig2* をグレードⅣグリオーマに過剰発現すると増殖抑制効果が見られることから悪性グリオーマ治療の分子標的として興味深い(Tabu et al., 2006)。しかし、このメカニズムについては細胞分化促進に伴う増殖停止なのか、腫瘍幹細胞化による分裂速度低下なのか結論されていない。私は田賀教授らとの共同研究により正常神経幹細胞に *Olig2* を強制発現するとグリア細胞分化を阻害して神経幹細胞の維持に働くことを報告した(Fukuda et al., 2004)。また、鹿川准教授と田賀教授のグループは神経幹細胞に FGF2 を作用させると *Olig2* 遺伝子の発現が誘導されることを報告しており(Abematsu et al., 2006)、幹細胞性の維持に *Olig2* が関与していることも予想していた。そこで、本共同研究では *Olig2* による正常神経幹細胞とグリオーマ幹細胞の分化制御の比較から、*Olig2* 機能が細胞分化促進に働くのか、あるいは幹細胞の維持に働くのかを明らかにすることを目的として開始した。

まず、私が作製した 2 種類の *Olig2* 遺伝子破壊マウス系統すなわち *Olig2-Cre* および *Olig2-CreER* ノックインマウスを系統と鹿川准教授が作製した *GFAP-Cre* レポーターマウス(*Cre* のレポーターコンストラクトをグリア繊維性酸性タンパク質 (*GFAP*) 遺伝子座にノックインしたマウス)を交配した。得られた胎仔終脳より *Olig2* 遺伝子変異神経幹細胞を調製し、FGF2 添加培養下で細胞増殖能を比較したが、*Olig2* 遺伝子欠損とコントロールの神経幹細胞の増殖能に有意差は認められなかった。thyroid ホルモン刺激によりオリゴデンドログリア細胞への分化誘導刺激に対する感受性を比較したところ、*Olig2* 遺伝子欠損神経幹細胞は thyroid ホルモン刺激してもオリゴデンドログリア細胞に分化しなかった。一方、LIF および BMP2 で刺激してアストログリア細胞分化誘導に対する感受性を比較したが有意差は検出されなかった。以上から、*Olig2* 遺伝子欠損した神経幹細胞の主要な表現型はオリゴデンドログリア細胞への分化能の欠失であると結論された。

一方、*Ras/Raf* シグナル経路がグリオーマの悪性度と関係しているという報告に基づき、本研究課題では、東京医科歯科大学の柏木特任助教を中心として、*Olig2* とグリオーマ幹細胞との関連に関して、FGF2 刺激により *Olig2* 遺伝子発現を誘導した神経幹細胞に活性化型 *ras* 遺伝子を導入することによる取組も行った。胎生期マウス終脳由来の神経幹細胞培養画分に、活性化型 *ras* 遺伝子を導入した。このようにして *Ras* を発現した細胞は増殖能の亢進を示した。自己複製能の亢進の有無や、ニューロンとグリア細胞への多分化能の有無について検討段階に入ることができた。また、子宮内電気穿孔法を用いてマウス胎仔脳の脳室層細胞に活性化型 *ras* 遺伝子を直接導入し、もともと *Olig2* を発現する領域と発現しない領域において活性化型 *ras* 遺伝子を取り込んだ細胞がどのような挙動を示すかについても実験を実施しており、結果が待たれる段階で、本研究課題の研究期間を終了した。

以上の結果は、活性化型 *ras* 遺伝子を導入することで、グリオーマモデル細胞の作成と詳細な病因解明・治療法開発の手段を得ることにつながるものと考察する。

### 利用した難治疾患研究リソース (○で囲む)

- 1) 疾患バイオリソース
- ② 疾患モデル動物
- 3) 疾患オミックス

### 使用した設備・資料・試料等

共焦点レーザー顕微鏡  
セルソーター

**本研究成果に関連する論文発表状況**

(本共同研究拠点経費による研究であることが謝辞に明示されている論文には \* 印を付けて下さい)

Usui N, et al.: Role of motoneuron-derived neurotrophin 3 in survival and axonal projection of sensory neurons during neural circuit formation. *Development* 139,1125–1132, 2012.

Watanabe K, et al.: Dpy19l1, a multi-transmembrane protein, regulates the radial migration of glutamatergic neurons in the developing cerebral cortex. *Development* 138, 4979–4990, 2011

Gotoh, H. et al.: Genetically-defined lineage tracing of Nkx2.2-expressing cells in chick spinal cord. *Dev Biol*, 349: 504–11, 2011.

Barnabe-Heider, F. et al.: Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell*, 7: 470–82, 2010.