

(原著論文)

Cyclin dependent kinase inhibitor による神経前駆細胞の 分化誘導と脳形成

石田 剛¹⁾, 小曾戸 陽一²⁾, 富松 拓治¹⁾, 中井 祐一郎¹⁾, 中村 隆文¹⁾,
樋田 一徳²⁾, 下屋 浩一郎¹⁾

1) 川崎医科大学産婦人科学 1, 〒701-0192 倉敷市松島577

2) 同 解剖学

抄録 大脳皮質は知覚, 認知, 思考等の高次機能を担う中枢である。哺乳類では大脳皮質は 6 層構造をなし, それぞれの層では機能的, 形態的に類似した細胞集団が異なる領域からの投射をやり取りしている。神経細胞およびグリア細胞は, 胎生期から生後にかけて神経前駆細胞 (Neural progenitor cell, NPC) から分裂し産生される。NPC は時期に応じて神経細胞, 続いてグリア細胞へ分化し, 最終的な脳の構造が完成する。NPC から分化する細胞運命の決定には, 細胞分裂を中止して分化を始める機構が必要であり, その中でも Cyclin dependent kinase inhibitors (CKIs) の働きが注目されている。今回我々はこの CKIs のひとつである p18 遺伝子を用いて胎児マウス脳の発生に与える影響を解析した。

方法としては胎生 13~17 日目 (E13 - 17) のマウス胎児脳に p18 遺伝子を子宮内エレクトロポレーション法によって強制発現させ, その後に脳組織内での分布を観察した。また Cre-LoxP を用いた蛍光蛋白発現システムで個々の細胞形態の立体再構築を行った。

その結果, p18 遺伝子発現群はコントロール群に比べて多く脳室面側に留まり, 特に E14, 15 において顕著に認められた。更に遺伝子導入した細胞において分化後の形態を観察したところ, 生後脳において p18 遺伝子発現群ではアストロサイトの形態をした細胞が増えており, 免疫組織学的染色からもこれらの細胞がアストロサイトであることが示唆された。この細胞は E13~E17 いずれの時期においても増加していたが, 特に E14, 15 で顕著に認めたことから, この時期にニューロンの分化からアストロサイトの分化に切り替わる何らかのメカニズムが存在していると考えられた。

今回の研究によって NPC がニューロンへの分化からアストロサイトへの分化に切り替わるメカニズムに CKIs が関与している可能性が示唆された。アストロサイトはグルタミントランスポータの発現により, 二次的脳損傷から神経細胞を保護しており, その発生が解明されることで低酸素性虚血性脳症の治療への応用も期待される。

doi:10.11482/KMJ-J41(1)83 (平成27年6月22日受理)

キーワード: 神経発生, 脳発生, p18, アストロサイト, サイクリン

別刷請求先
石田 剛
〒701-0192 岡山県倉敷市松島577
川崎医科大学産婦人科学 1

電話: 086 (462) 1111
ファックス: 086 (462) 1199
Eメール: k0106142@med.kawasaki-m.ac.jp

緒言

大脳皮質は知覚、認知、思考等の高次機能を担う中枢である。大脳皮質は6層構造をしており、これは哺乳類において特徴的な構造である。それぞれの層には機能的、形態的に類似した細胞が集団をなしており、それぞれが異なる領域からの投射をやり取りしている。このような構造を有することで、膨大で複雑な情報処理が可能となる。神経細胞は、胎生期において大脳皮質の脳室帯及び脳室下帯に存在する神経前駆細胞（Neural progenitor cell, NPC）から inside - out パターンで分裂し産生される。このとき NPC はそれまで繰り返していた自己増殖を停止し、神経細胞へ分化する。マウスにおいては、大脳皮質における神経細胞の発生は胎生 11 日頃から開始され、胎生 12 日頃から NPC からの神経細胞への分化が始まり、13 日目に層構造が形成され始める^{1,2)}。その際に発生する神経細胞は、胎生期の決まった時期に決まった種類に分化し、決められた層へと移動することで、その最終分裂時期に応じた層を形成する³⁾。出生時に神経細胞による 6 層構造が完成し、同時に NPC はグリア産生に切り替わる。神経細胞の発生は初期（Early neurogenesis：胎生 11～12 日頃）には NPC から直接、非対称分裂によって神経細胞が産生され始め（Direct neurogenesis）、胎生中期である胎生 13 日目をピークに、Deep layer（V, VI 層）が形成される。中期以降は対称分裂によって Intermediate progenitor cell（IPC = Basal progenitor）を介した神経細胞の産生が主となり、胎生後期（胎生 15 日以降）から Upper layer（II / III, IV 層）が構築され、6 層構造が完成する⁴⁾。

一方でアストロサイト、オリゴデンドロサイトなどのグリア細胞は、主に出生後の NPC から神経細胞の分化が終了した後に引き続いて分化し、生後 10 日目頃に最終的な脳の構造が完成するといわれている。しかしながら NPC からグリア細胞に分化を始めるきっかけやそのメカニズムについては現在その詳細は解明されていない。

NPC から分化する細胞運命の決定には、細胞分裂を中止して分化を始めるシグナルが関与するとされる⁵⁾。細胞分裂周期の進行は cyclin / cyclin-dependent kinase（CDK）によってなされており、その活動は CDK inhibitors（CKIs）によって抑制的に制御されている。CKIs はいくつかの末梢組織において細胞の分化、細胞移動、アポトーシスを制御していることから^{6,7)}、脳の発達においても同様の働きをしていると考えられる。CKIs には大きく分けて INK4 ファミリーと Cip / Kip ファミリーの2種類が存在する⁸⁾。Cip / Kip ファミリーには P21, P27, P57 タンパクといった種類が存在し、これらは多様な種類の CDK に作用し阻害する。一方で INK4 ファミリーには P15, 16, 18, 19 タンパクなどが存在し、CDK4, CDK6 を選択的に阻害することで G1 期の細胞を G0 期に移し、自己増殖を止める働きがある⁹⁾。その選択的な作用から、抗がん剤への応用へと臨床実験が勧められているところである¹⁰⁾。CKIs の NPC の分化に対する作用について示された報告は、Cip / Kip ファミリーである p57 遺伝子、p27 遺伝子の2種類のみである¹¹⁾。その報告によると、p57 遺伝子は NPC に対し神経細胞及びグリア細胞の両方の分化を促進し、p27 遺伝子はグリア細胞のみの分化を促進することが示されている。

また、CKIs の結合する Cyclin D2 の発現が NPC の運命決定に重要であるという報告もあるが¹²⁾、CKIs の中でも INK4 ファミリーについてはまだ報告されていない。INK4 ファミリーに属する P18 タンパクは胎生 7 日目には翻訳されており、その時期以降のマウスの神経発生を含めたあらゆる細胞分化において働いている¹³⁾。今回我々は、この p18 遺伝子を用いて NPC における細胞分裂の停止を引き起こすことが神経分化にどういった影響を及ぼすかについて、胎児マウス脳を用いた解析を行った。

材料と方法

動物

本研究は、川崎医科大学動物実験委員会の承

認番号 (No.13-079) を受けている。マウスは Slc: ICR を用い, CLEA より購入した胎児日齢 13.5~17.5 (E13.5-17.5) の妊娠マウスを使用した。また組織および細胞解析は処置後に出生した 0, 5, 10 日目 (P0, 5, 10) の新生児マウスを各 6 匹ずつ用いた。

マウス胎児脳への遺伝子導入

E13~17 の妊娠マウスを Somnopentyl® (40-50 mg/kg, Kyoritsu seiyaku, Japan) で腹腔内麻酔下に, CKIs の一種である p18 遺伝子およびそのコントロールとしての空ベクターを子宮内エレクトロポレーション法によって強制発現させた (図 1 a, b, 50-60V, 60mA)。同時に, 細胞標識を行うために LoxP EGFP-F, H2B-KO1, Cre 遺伝子を導入した。遺伝子を導入した細胞の個々の形態を観察しやすくするために, Cre-loxP システム (図 1, 後述) を導入した。

Cre-loxP EGFP-F 遺伝子発現細胞の観察

EP の際に同時に投与する Cre 遺伝子の濃度を調節し, EGFP-F 遺伝子発現細胞の細胞形態の観察を最も容易にする濃度を調べた。強拡大写真において観察すると同時に, 大脳皮質の脳室面側の RFP 陽性細胞中の GFP 陽性細胞を数えて, 割合を比較した。

組織学的解析

4% paraformaldehyde (Merck Millipore USA) によって固定した脳組織を 20% sucrose (Nacalai tesque Japan) に置換後, ライカ振動刃ミクロトーム (Leica Microsystems, VT1200, Germany) を用いてピプラトーム切片 (16 μm)、およびライカ高機能凍結ミクロトーム (Leica Microsystems, CM3050S, Germany) を用いて凍結切片 (16 μm) を作製した。

免疫組織学的解析として, p18 遺伝子が遺伝子導入したマウスの大脳皮質で発現していることを確認するために, 抗 p18 抗体として Anti-

p18 INK4c antibody (1:500, Abcam, UK) を用いた。形質性アストロサイトのマーカーとして Anti-S100 β antibody (1:500, Abcam, UK)、線維性アストロサイトのマーカーとして Anti-GFAP antibody (1:500, Dako, Japan)、オリゴデンドロサイトのマーカーとして Anti-Olig2 antibody (1:100, Abcam, UK)、Anti-O4 antibody (1:100, Merck Millipore, USA)、ニューロンのマーカーとして Anti-NeuN antibody (1:500, Abcom, UK) を用いた。2次抗体は goat anti mouse Alexa 647, goat anti rabbit Alexa 647 (1:500, Abcam, UK) を用いた。細胞の核は全て DAPI (1:1000 Molecular Probes USA) にて染色し解析した。染色方法は, 1次抗体においては Over Night (4°C)、2次抗体においては 2時間 (室温) で反応させ, いずれも PBS で洗浄後 (5分, 3回)、封入剤として PermaFluor (Thermo Scientific, UK) で封入し観察した。

観察は, 大脳皮質細胞に目的遺伝子が注入されているかを確認するために蛍光実体顕微鏡 (Olympus, SZX16, Japan) を使用し, 作製した切片の染色後の観察に蛍光顕微鏡 (Olympus, BX61, Japan) と, 共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, FV-1000, Japan) を用いて観察した。顕微鏡写真は共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, FV-1000, Japan) を用いてそれぞれ 10倍 (NA = 0.40)、20倍 (NA = 0.70)、40倍 (NA = 0.95) の対物レンズ (Olympus, UPLANSAPO, Japan) で撮影した。

定量解析

冠状断切片にした大脳皮質の顕微鏡写真 (10倍) から, 遺伝子導入された細胞を含む部位を幅 110 μm に渡って任意に選択し, その中で皮質の厚さを均等に 5つの区域 (Zone) に分け, それぞれの区域における H2B-KO1 陽性細胞を数えた (図 3 a, b)。また, 同じく冠状断切片の顕微鏡写真 (10倍) において, 大脳皮質の全層に渡る 1視野中の GFP 陽性細胞のうち, 細胞突起を 2本以上有する細胞を数えた。そのうち脳室面から軟膜面の方向に突起

を伸ばす双極性の細胞 (bipolar) と極性を持たず全周性に多数の突起を伸ばす細胞 (non-polar) を数えて割合を比較した (図7). その際、極性が不明確な双極性細胞及び3本以上突起を伸ばす極性細胞は除外している. 細胞数の解析は、画像解析ソフト (Image J, NIH Image USA 及び Volocity, PerkinElmer, USA) を用いて計測した. 統計処理は Mann-Whitney の U 検定を用いて $p < 0.05$ を有意差ありとした.

結果

最適な EGFP-F の発現量の決定

今回の実験で遺伝子を導入した細胞の個々の形態を観察するにあたり、細胞膜を標識する EGFP-F 遺伝子を用いたが、その際に隣り合う細胞同士が重なることで形態観察が困難になった. その為、Cre-LoxP システムを用いて、EGFP-F 遺伝子を発現する細胞の数を調節して観察することを試みた (図1 e-g). まず、LoxP 遺伝子をつけた EGFP-F 遺伝子ベクターを作成し、同時に導入する Cre 遺伝子の量を調節し、EGFP-F 遺伝子を発現する細胞の単位領域あたりの個数 (GFP 陽性細胞 / RFP 陽性細胞) を強拡大画像で観察した. 観察するマウスの胎生もしくは出生時期によってその濃度は調節する必要があるが、出生前後に観察する場合に導入する Cre 遺伝子の DNA 量として $0.1\text{ng} / \mu\text{L}$, 出生後 5~10 日目に観察する際は $1.0\text{ng} / \mu\text{L}$ で実験することとした.

遺伝子導入した細胞における p18 遺伝子発現の確認

エレクトロポレーション法ではそのメカニズムから、1 個の細胞に多数の遺伝子が同時に入ることから、KO1 陽性細胞にはほぼ全て p18 遺伝子が入っていると考えられる. そこで、遺伝子導入したマウスの大脳皮質において、生後 10 日目まで p18 遺伝子の発現が維持されていることを確認するために、抗 p18 抗体による免疫染色で観察した (図2). E13~15 のマウ

スではいずれの時期においても、遺伝子導入した細胞が生後 10 日に渡って p18 遺伝子を発現していた.

p18 遺伝子強制発現の時期による細胞の分布の変化

大脳皮質の 6 層構造を形成していく中で、E13~17 それぞれの時期に p18 遺伝子を発現させ細胞分裂を中止した細胞がどのような分布をしていくかを観察した. 生後 10 日目の大脳皮質で脳室面から軟膜面にかけて均等に 5 区画に分けて、それぞれの区域で遺伝子導入された GFP / KO1 細胞を数え、最も脳室面に近い区域に存在する割合をコントロール群と比較した (図3 a, b). p18 遺伝子導入群、コントロール群ともに遺伝子導入をする日数が発生ステージ後半になるにつれ、脳室面側に留まる細胞が増加した (図3 c). またいずれの日数で遺伝子導入を行った場合においても、p18 遺伝子導入群がコントロール群に比べ多く脳室面側に留まった. 更に p18 遺伝子導入群の中でも、特に E14, 15 において顕著に脳室面側に停滞した. このことから、p18 遺伝子を発現した細胞は遺伝子導入後の細胞移動が障害される可能性が示唆された.

p18 遺伝子強制発現の時期による細胞形態の変化

更に E13~17 のマウス胎児脳に遺伝子導入した細胞の形態を生後 10 日に渡り観察したところ、生後脳においてコントロール群では脳室面および軟膜面方向に双極性に 2 本の突起を伸ばした形態をした細胞が分布しているのに対し、p18 遺伝子導入群では極性を持たない円形の細胞が増えていることが判明した (図4). 一般に神経細胞は極性を持った樹状突起、軸索突起を持っており、p18 遺伝子導入群で増えた円形の細胞はグリア細胞であると考えられた. そこで免疫染色で観察したところ、これらの細胞はアストロサイトに特異的な S100B, GFAP を発現していることがわかった (図5). 更にニューロンのマーカーが陽性であるかを調べた

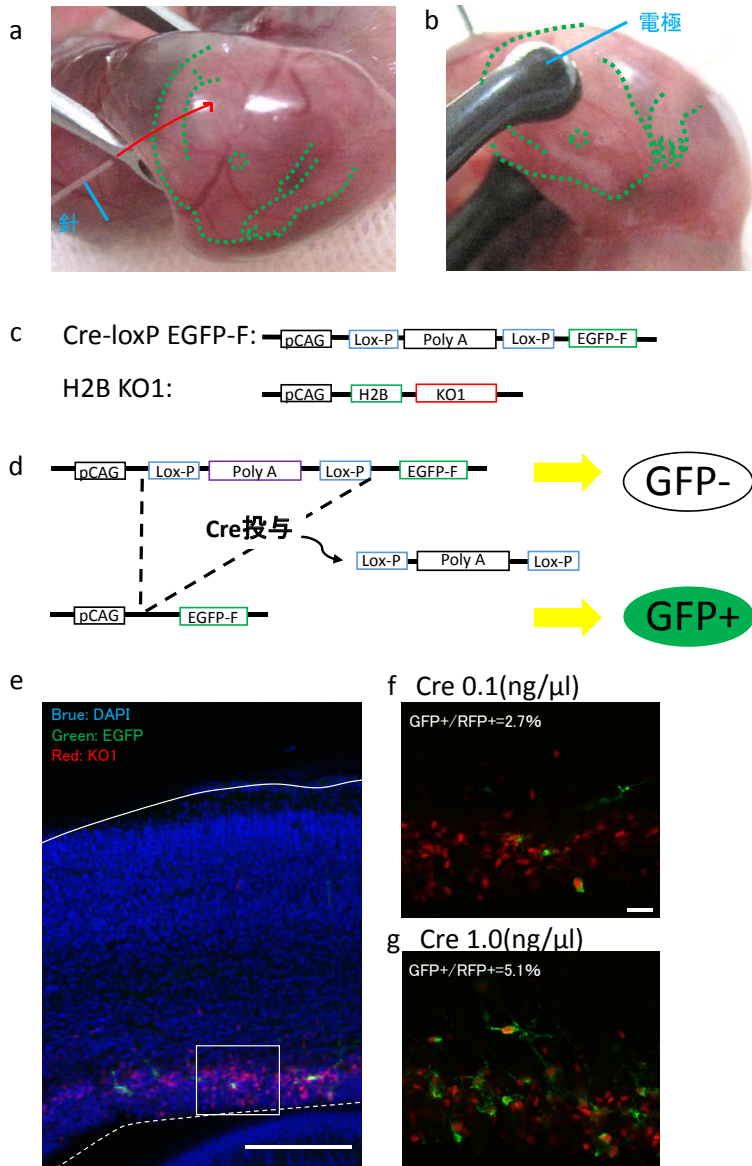


図1 子宮内エレクトロポレーション法による遺伝子の強制発現

a, b. EPをしている様子: E 13~17の妊娠マウスの胎児脳に, CKIsの一種である p18またはコントロール (CON) として空ベクター, 細胞標識を行うために LoxP EGFP-F, H2B-KO1, Cre 遺伝子を導入した. a: 妊娠マウスから子宮を導出し, 子宮壁を透過し確認した胎児の頭頂部にガラスシリンジで目的遺伝子を投与する様子を示す. b: 電極で胎児の頭部を挟み, 電流を流す (50 - 60V, 60mA) 様子を示す. c. Cre loxP EGFP-F 遺伝子および KO1 遺伝子の遺伝子座を示す. EGFP-F 蛋白は細胞膜に集積する. LoxP 配列で挟んだ Poly-A 配列をプロモータ (pCAG) 配列と EGFP-F 配列の間に組み込んだ. KO1 蛋白は遺伝子上流に H2B 配列を組み込ませることで, 細胞の核に集積させた. d. Cre loxP system を用いた EGFP-F 遺伝子発現の制御の模式図を示す. この遺伝子のみが取り込まれた場合には Poly-A 配列により EGFP-F が発現されない. Cre 蛋白が働くと LoxP に挟まれた Poly-A 配列は外れ EGFP-F が発現される. この仕組みによりエレクトロポレーションによって遺伝子を取り込んだ細胞が隣接する場合も, 同時に投与する Cre 遺伝子の量を調節することで, 細胞形態の観察を容易にした. e~g. Cre-LoxP システムを用いた, EGFP-F 発現の調節を示す. e. 生後 0 日目マウスにおける大脳皮質の冠状断切片の顕微鏡写真 (弱拡大, E 17 で遺伝子導入). 実線は皮質の軟膜面, 点線は脳室面を示す. f, g. e における囲み部分の強拡大像を示す. f は Cre 遺伝子の濃度が 0.1 ng / μl であり, g は 1.0 ng / μl である. 強制発現細胞同士が重なることなく形態観察が可能となる Cre の濃度は, 観察する時期によってやや異なるものの, 出生直後で 0.1 ng / μL であった. e: scale bar = 200 μm, f, g: scale bar = 20 μm.

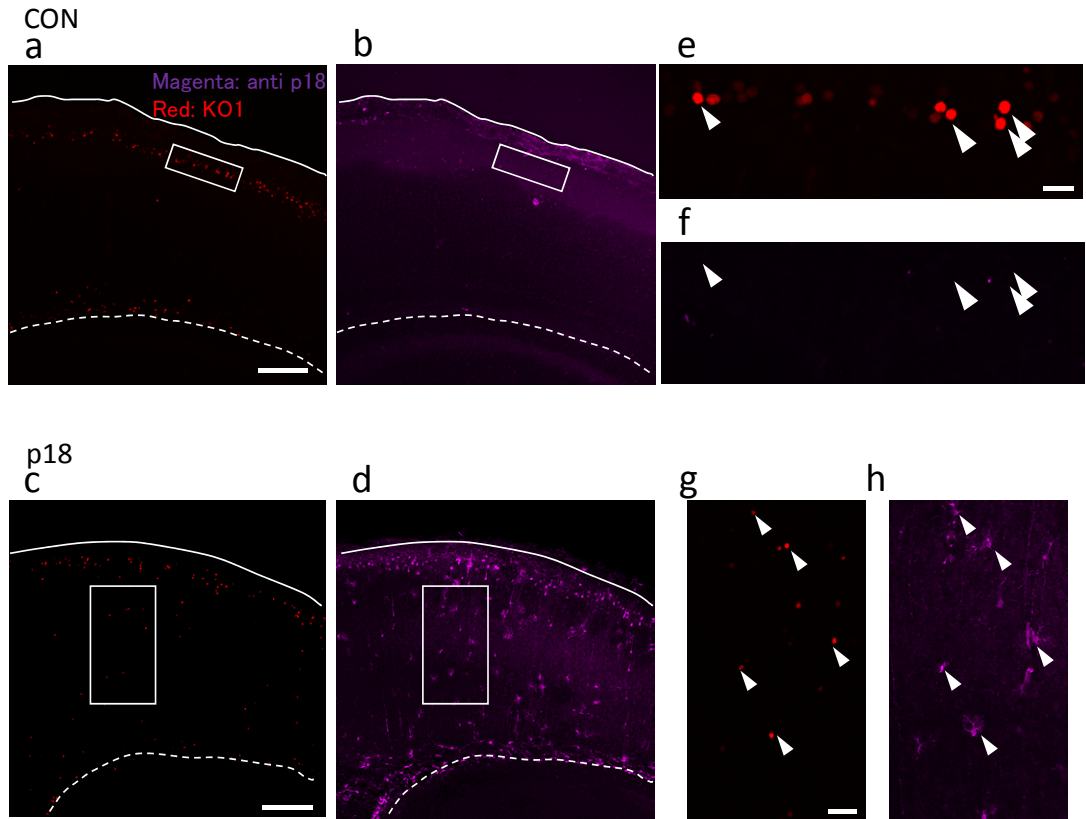


図2 抗 p18 抗体を用いた p18 遺伝子の発現

a～d. コントロール群 (a, b) 及び p18 遺伝子導入群 (c, d) における生後 10 日目マウスの大脳皮質の冠状断切片の顕微鏡写真 (弱拡大, E15 で遺伝子導入) を示す. a: KO1, b: 抗 p18 抗体. 実線は皮質の軟膜面, 点線は脳室面を示す. e, f. a, b における囲み部分及び g, h. c, d における囲み部分の強拡大像を示す. e: KO1, f: 抗 p18 抗体. コントロール群において, 遺伝子を強制発現した細胞 (矢頭) は抗 p18 抗体に陰性であり, P18 強制発現群において, 遺伝子を強制発現した細胞 (矢頭) は抗 p18 抗体に陽性であった. a - d: scale bar = 200 μm , e - h: scale bar = 20 μm .

ところ, コントロール群で認められた双極性の細胞では抗 NeuN 抗体が陽性である一方で, p18 遺伝子導入群で認められた円形細胞は抗 NeuN 抗体に陰性であった (図 6).

p18 遺伝子強制発現の時期による無極性細胞の割合の変化

このことから, NPC において p18 の強制発現によってアストロサイトへの分化を促す作用が疑われた. そこで胎生期のどの時期の NPC に p18 を強制発現することでアストロサイトの分化が引き起こされるか, 時期的な違いがあるのかを調べるために, E13～E17 に遺伝子導入

し, アストロサイト様の形態をした円形の細胞の数を割合を比較したところ, いずれの時期においても p18 を投与した方がコントロールに比べて円形細胞が増えていることがわかった (図 7). 特に E14, E15 においてその増加は顕著になっていた. また, E17 にエレクトロポレーションした場合, p18 遺伝子導入群, コントロール群共に円形の細胞が認められたが, その数は生後日数が進むにつれて減少した.

考 察

周産期医療において新生児の脳障害は依然として児の予後に大きな影響を及ぼし, その克服

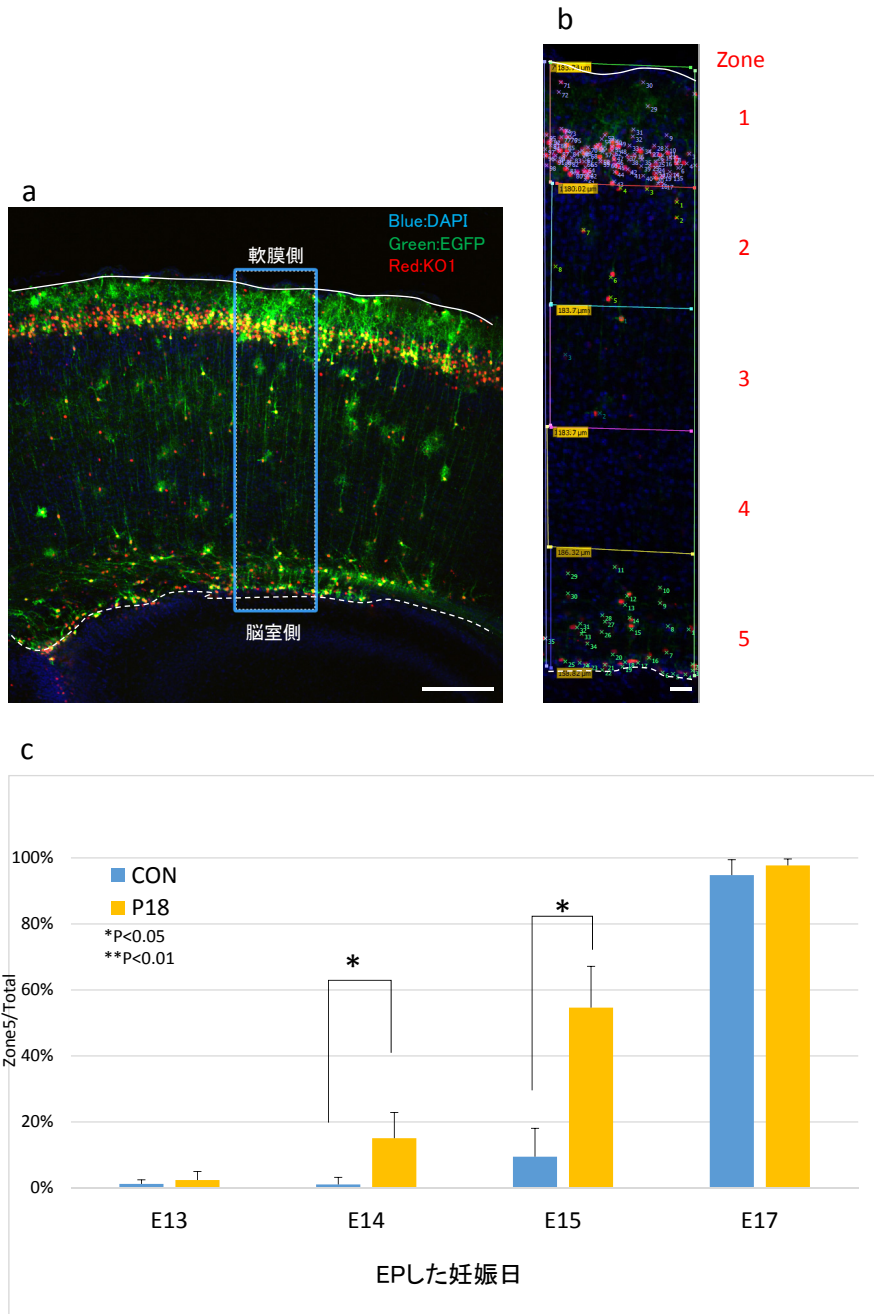


図3 遺伝子強制発現の時期による細胞分布の変化

a. p18 遺伝子導入群における生後 10 日目マウスの大脳皮質の冠状断切片の顕微鏡写真 (弱拡大, E15 で遺伝子導入) を示す。実線は皮質の軟膜面, 点線は脳室面を示す。b. a において, 遺伝子導入された細胞を多く含む領域を幅 110 μm に渡って切り取り (囲み部分), 軟膜側から脳室側に渡って均等に 5 つの領域に分け (Zone1 - 5), それぞれの領域における遺伝子発現細胞を数えた。c. 遺伝子導入した妊娠日別に生後 10 日目において, 遺伝子導入された細胞が脳室面側 (Zone5) に分布している割合のグラフ (青色: コントロール群, オレンジ色: p18 遺伝子導入群: * = $p < 0.05$) を示す。E13 および E17 において, コントロール群と p18 遺伝子導入群にその分布に差は認めなかったが, E14 および E15 において p18 遺伝子導入群はコントロール群よりも多くの細胞が脳室面側に留まった。a: scale bar = 200 μm , b: scale bar = 20 μm .

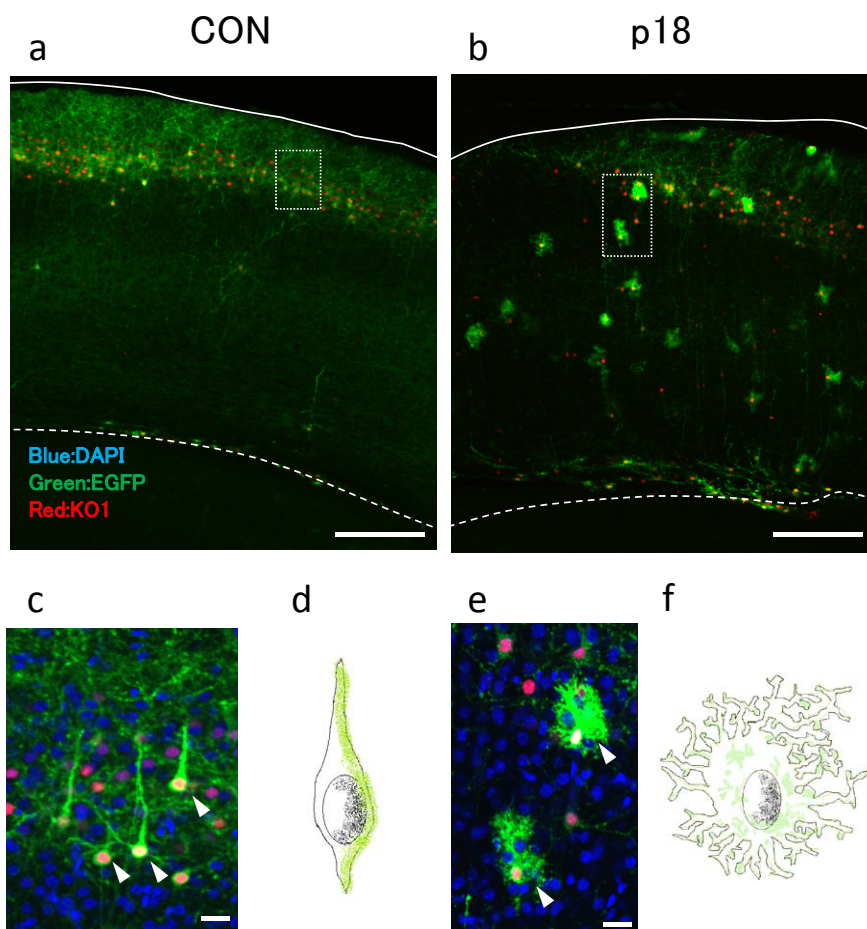


図4 p18 遺伝子導入の時期による細胞形態の観察

a, b. コントロール群 (a) 及び p18 遺伝子導入群 (b) における、生後 10 日目マウス的大脑皮質の冠状断切片の顕微鏡写真 (弱拡大, E15 で遺伝子導入) を示す. 実線は皮質の軟膜面, 点線は脳室面を示す. c, a における囲み部分, 及び e, b における囲み部分の強拡大像を示す. d, c における矢頭, 及び f, e における矢頭の細胞の模式図を示す. コントロール群では双極性の細胞がほとんどを占めている一方で, p18 遺伝子導入群では無極性の細胞が多く認められる. a, b: scale bar = 200 μm , c, e: scale bar = 20 μm .

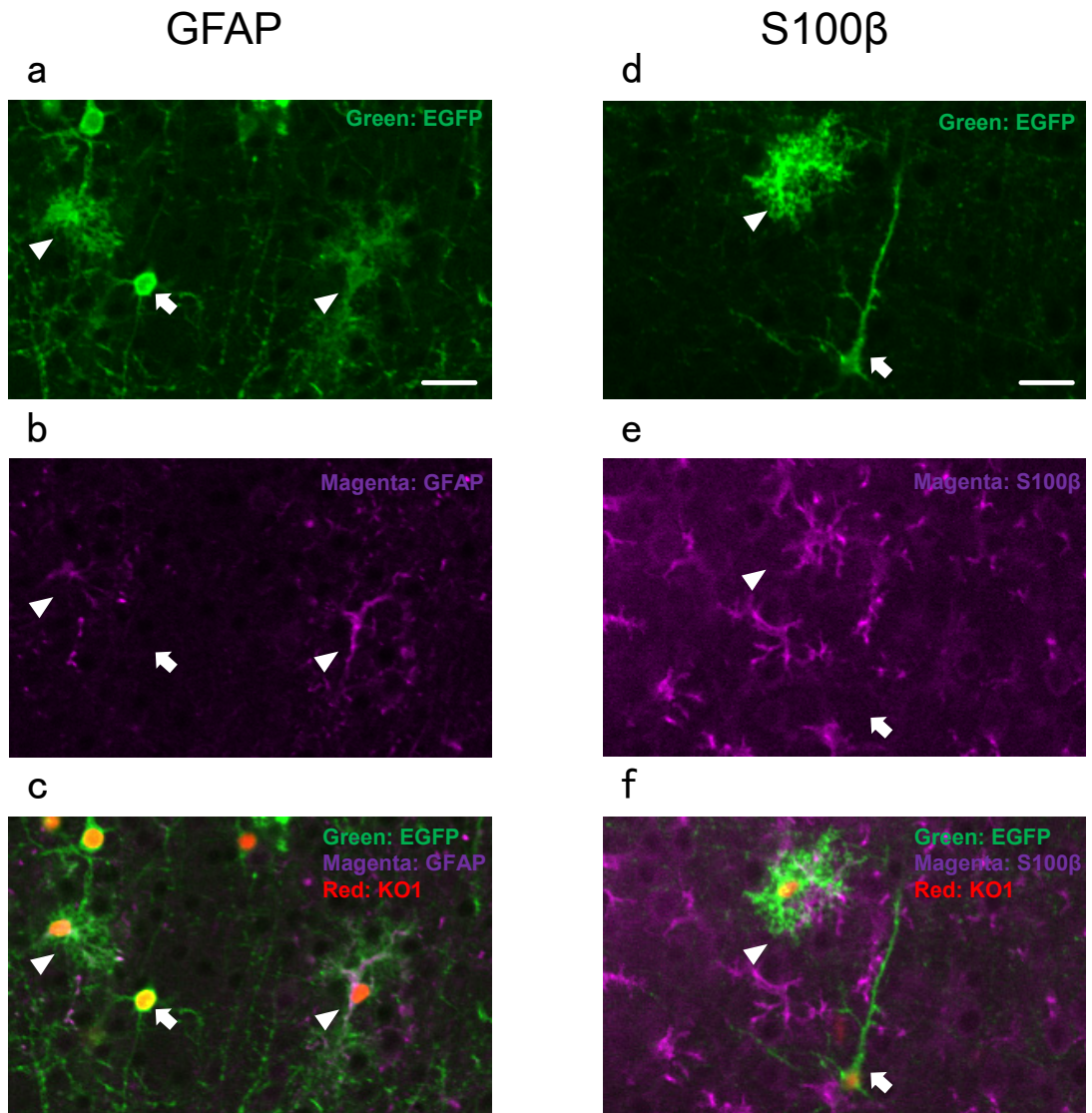


図5 p18 遺伝子発現細胞のアストロサイトのマーカーによる免疫組織学的染色
 いずれも E15 で遺伝子導入し, 生後 10 日目に大脳皮質を摘出し冠状断切片にした. 抗 GFAP 抗体 (a - c) 及び抗 S100 β 抗体 (d - f) による免疫組織学的染色をした顕微鏡写真を示す (a, d (緑): EGFP-F, b, e (紫): 抗 GFAP 抗体, c, f. Merge). 無極性の細胞 (矢頭) は抗 GFAP 抗体もしくは抗 S100 β 抗体が陽性であった. 一方で双極性細胞 (矢印) は抗 GFAP 抗体および抗 S100 β 抗体に陰性であった. scale bar = 20 μ m.

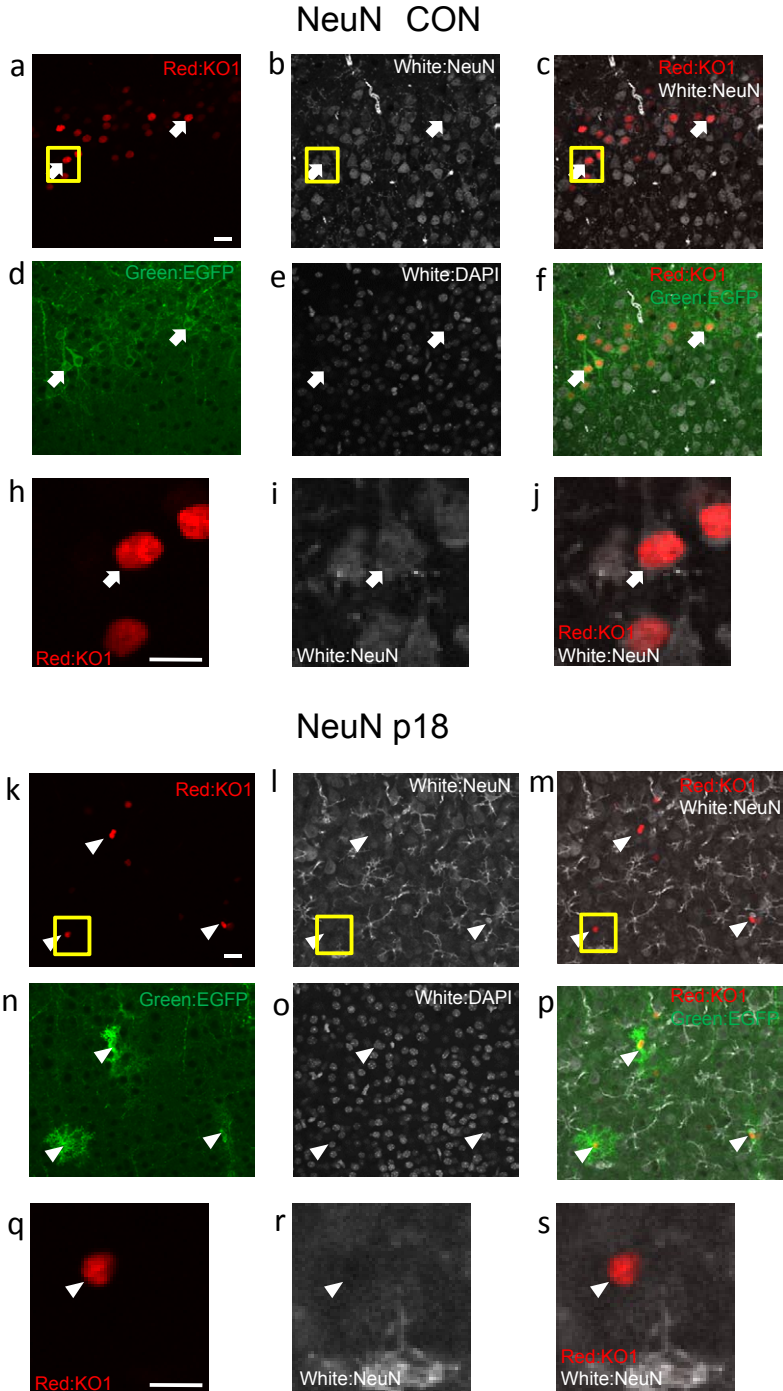


図6 遺伝子発現細胞の抗 NeuN 抗体による免疫組織学的染色
 コントロール群 (a-j) 及び p18 遺伝子導入群 (k-s) における生後 10 日目マウスの大脳皮質の顕微鏡写真を示す
 (E15 で遺伝子導入)。 a, k. H2B-KO1, b, l. NeuN, c, m. a と c 及び k と l の Merge, d, n. EGFP-F, e, o. DAPI, f, p. a, b, d
 及び k, l, n の Merge, h-j, q-s. a-c 及び k-m の囲み部分の拡大像。 コントロール群で大半を占める双極性細胞 (矢印)
 は抗 NeuN 抗体に陽性である一方で, p18 遺伝子導入群で多く認めた無極性細胞 (矢頭) は抗 NeuN 抗体に陰性であっ
 た。 a-f, k-p: scale bar = 20 μ m, h-j, q-s: scale bar = 10 μ m.

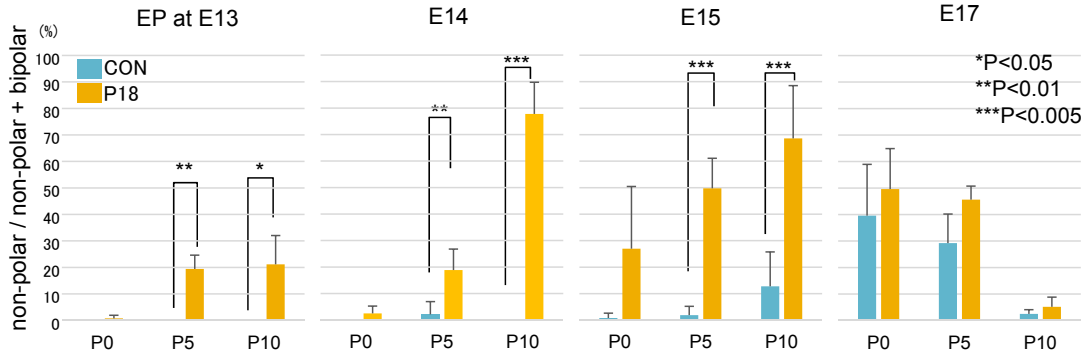


図7 p18遺伝子強制発現の時期による無極性細胞の割合の変化

EPした妊娠日別の生後0, 5, 10日目においてEPされた細胞が無極性細胞 (non-polar) に分化した割合のグラフ (青色: コントロール群, 黄色: p18 強制発現群: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.005$) を示す. 細胞突起を2本以上伸ばす GFP 陽性細胞のうち, 極性を持たずに全周性に突起を伸ばす細胞 (non-polar) を比較した. E13~17のいずれの時期に遺伝子導入してもコントロール群と比べて p18 遺伝子導入群で無極性細胞が多い傾向にあるが, その差は特に E14, 15 において顕著であった.

は重要な課題である. 脳障害の克服には脳の発生・発達の理解が必須であるが, 今回の研究によって NPC がニューロンへの分化からアストロサイトへの分化に切り替わるメカニズムに p18 遺伝子が関与している可能性が示唆された.

今回子宮内エレクトロポレーション法を用いてマウス脳組織に部分的に p18 遺伝子を過剰発現させて観察を行った. その際 Cre-LoxP システムを用いて標識遺伝子を発現する細胞数を調節することで, 隣り合う細胞の形態観察を容易にするメカニズムを構築した.

本来 NPC は胎生期の決められた時期に自己増殖を停止しその時期に応じた神経細胞へ分化しそれぞれの層に移動していくが^{1,2)}, 大脳皮質の基底膜面において p18 遺伝子を過剰発現した NPC は, 神経細胞層に移動することなく脳室面側に留まる傾向が増える事が示された. これは最終的に層構築に携わらないアストロサイトに分化する細胞が増えた事が原因の一つと考えられるが, 実際ニューロンに分化した細胞で細胞移動に変化が生じているかは今後調査する余地がある. 更に, p18 遺伝子導入群における遺伝子発現細胞の一部は軟膜側 (zone1, 2) に認めているが (図 2c, d および図 3 a, b), これらの細胞は元来, より胎生後期に分化する

べき神経細胞であると我々は考えている. それを裏付ける結果として, 生後脳で Zone1 と Zone2 に存在する KO1 陽性細胞の割合を遺伝子導入した時期別に比較したところ, その細胞数のピークがコントロール群では E15 であったのに対して, p18 遺伝子導入群では E14 であり, p18 遺伝子の強制発現により神経分化が前倒した結果が得られた (データは提示していない). このことから, p18 遺伝子を強制発現した細胞は分化の時期を早められている可能性が強く疑われる.

また, 今回の我々の実験において, E13~17 いずれの妊娠時期においても, INK4 ファミリーの p18 遺伝子を強制発現させることで, 本来出生後に NPC から分化すると言われるアストロサイトに分化する数が最終的に増えた. Tury らの報告¹¹⁾によると, 同じ CKIs の中でも Cip / Kip ファミリーである p27 タンパクはアストロサイトおよびニューロンの細胞数を増やし, p57 タンパクはニューロンのみを増やしアストロサイトの数は変わらなかった. しかし今回の実験では神経細胞の絶対数の多さと手技的に神経細胞自体の絶対数を比較することは困難であった.

また p18 遺伝子が NPC に対しその将来をア

ストロサイトに誘導する割合は、特に妊娠 14～15 日目にエレクトロポレーションした場合に特に顕著に増加していることから、特にこの時期にニューロンの分化からアストロサイトの分化に切り替わる何らかのメカニズムが存在していると考えられる。そのメカニズムとしては DNA のメチル化などによる、翻訳遺伝子の変化や、Notch シグナル、Stat3 シグナルを始めとした多くの転写調節因子による経路が関係しているという報告¹⁴⁾もあることから、今後 DNA シークエンスによって、翻訳遺伝子の変化を検討している。このことから今後遺伝子発現解析を進めていくことで、依然不明な点が多いアストロサイト産生の仕組みを明らかにしていくことができるかと期待される。

アストロサイトについては近年様々な働きが解明されているが、その中でも神経障害時に発生するグルタミン酸を吸収し周囲の組織を興奮毒性から守る他、感染や低酸素の際に発生するフリーラジカルを中和し周囲の組織を保護することが分かっている¹⁵⁾。アストロサイトの分化をコントロールすることで、脳障害の際、二次的脳損傷からの脳保護につながる事が期待され、今回の研究がそのきっかけとなりうると考えられる。更にこの解析システムを用いて胎児・新生児の脳障害に寄与する可能性のある因子の胎児脳への遺伝子導入ならびに胎児羊水内および母獣への投与により発生学的変化、長期的影響に関する解析を行うことで障害発生を軽減・予防しうる方策を見出すことが期待される。

謝 辞

本研究は川崎プロジェクト研究費平成 26 年度（大学院研究）26 大 -1「脳形成時に神経前駆細胞がグリア細胞へ分化するメカニズムの解析－新生児脳障害の病態改善に向けて－」及び学術研究助成基金助成金）基盤研究（C）「子宮収縮における子宮筋－免疫担当細胞連関・酸化ストレス制御機構の解析」（主任研究者：下屋浩一郎）を用いて行った。なお、本研究についての利益相反はない。

本研究を終えるにあたり、ご指導とご協力をいただいた川崎医科大学解剖学教室の岩下美里ティーチング

アシスタントに深謝いたします。

略語一覧

NPC: Neural progenitor cell
 CDK: cyclin / cyclin-dependent kinase
 CKIs: Cyclin dependent kinase inhibitors
 NPC: Neural progenitor cell
 IPC: Intermediate progenitor cell (= Basal progenitor)
 CON: control
 DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole
 GFP: green fluorescence protein
 EGFP: enhanced green fluorescence protein
 GFAP: glial fibrillary acidic protein
 S100 β : beta subunit nerve tissue protein S100
 Olig2: Oligodendrocyte transcription factor 2
 O4: Oligodendrocyte Marker O4

引用文献

- 1) Angevine JB Jr, Sidman RL: Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature*. 192:766-768, 1961
- 2) Rakic P, Stensas LJ, Sayre E, Sidman RL: Computer-aided three-dimensional reconstruction and quantitative analysis of cells from serial electron microscopic montages of foetal monkey brain. *Nature*. 250:31-34, 1974
- 3) McConnell SK, Kaznowski CE: Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science*. 254:282-285, 1991
- 4) Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD: Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*. 8:427-437, 2007
- 5) Ohnuma S, Philpott A, Harris WA: Cell cycle and cell fate in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*. 11:66-73, 2001
- 6) Zhang Y, Lin SC: Molecular characterization of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 promoter. *Biochim Biophys Acta*. 1353:307-317, 1997
- 7) Besson A, Dowdy SF, Roberts JM: CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 14:159-169, 2008
- 8) Morgan DO: Principles of CDK regulation. *Nature*. 374:131-134, 1995
- 9) Yanxin Li, Rekha Pal, Li-Ying Sung, *et al.*: Regulation of T cell differentiation and alloimmunity by the cyclin-dependent kinase inhibitor p18ink4c. *PLoS One*. Mar

- 10;9:e91587, 2014
- 10) Wardell SE, Ellis MJ, Alley HM, *et al.*: Efficacy of SERD/SERM Hybrid-CDK4/6 inhibitor combinations in models of endocrine therapy resistant breast cancer. *Clin Cancer Res.* May 19. pii:clincanres. 0360, 2015
 - 11) Tury A, Mairet-Coello G, DiCicco-Bloom E: The cyclin-dependent kinase inhibitor p57Kip2 regulates cell cycle exit, differentiation, and migration of embryonic cerebral cortical precursors. *Cereb Cortex.* 21:1840-1856, 2011
 - 12) Tsunekawa Y, Osumi N: How to keep proliferative neural stem / progenitor cells: a critical role of asymmetric inheritance of cyclin D2. *Cell Cycle.* 11:3550-4, 2012
 - 13) Zindy F, den Besten W, Chen B, Rehg JE, Latres E, Barbacid M, Pollard JW, Sherr CJ, Cohen PE, Rousset MF: Control of spermatogenesis in mice by the cyclin D-dependent kinase inhibitors p18(Ink4c) and p19(Ink4d). *Mol Cell Biol* 21: 3244-3255. 2001
 - 14) Wen S, Li H, Liu J: Dynamic signaling for neural stem cell fate determination. *Cell Adhesion & Migration.* Jan-Mar; 3:107-117, 2009
 - 15) Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, *et al.*: Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron.* 16:675-686, 1996

〈Original Article〉

Correlation between differentiation of neural progenitor cells by Cyclin dependent kinase inhibitor and brain development,

Tsuyoshi ISHIDA ¹⁾, Yoichi KOSODO ²⁾, Takuji TOMIMATSU ¹⁾, Yuichiro NAKAI ¹⁾, Takafumi NAKAMURA ¹⁾, Kazunori TOIDA ²⁾, Koichiro SHIMOYA ¹⁾

1) Department of Obstetrics and Gynecology, 2) Department of Anatomy, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

ABSTRACT The cerebral cortex plays a central role in high-level functions such as thinking, perception, and cognition. In mammals, the cerebral cortex has a six-layered structure, and each layer contains cells with similar functions and shapes that exchange signals from different regions of the brain. Neurons and glial cells are produced by differentiation from neural progenitor cells (NPC) from the embryonic stage up to the postnatal stage.

NPCs are differentiated into neurons at the embryonic stage, and switch into glial cells at birth, before the structure of the brain is mature. Some molecules have been proposed to determine the cell fate of NPCs by stopping cell division and initiating differentiation. Cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs) are considered to be important molecular factors in this process. Here we used a CKI, the p18 gene, and analyzed its effect on the formation of the fetal mouse brain. For this purpose, we expressed the p18 gene in the mouse fetal brain at embryonic day 13 to day 17 (E13-17), and observed the distribution of the electroporated cells in the cortical tissue. Furthermore, we performed three-dimensional reconstruction of the individual cellular morphology by using the Cre-LoxP fluorescent protein expression system.

As a result, the p18-gene expressing cells remained in the ventricular zone more than the

control cells. The difference was particularly remarkable at E14 and E15. Importantly, we observed a differentiated cell shape in electroporated cells, and found that the proportion of astrocyte-like cells was greatly increased in the p18 gene-expressing group compared to the control group. We confirmed that these cells were indeed astrocytes with immunohistochemical staining. The number of such astrocyte-like cells increased at any time of electroporation from E13 to E17, especially at E14 and E15. Therefore, we propose that there might be some mechanisms that control the switch from neurons to astrocytes at this stage of development.

In conclusion, our study suggests that CKIs are involved in the differentiation program of NPCs from neurons to astrocytes. Astrocytes are known to protect neurons from secondary brain damage by the expression of glutamine transporter. Therefore, elucidating the mechanism of their generation is expected to have applications for the treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in the future.

(Accepted on June 22, 2015)

Key words : **Neurogenesis, brain development, p18, astrocytes, cyclin**

Corresponding author

Tsuyoshi Ishida

Obstetrics and Gynecology, Kawasaki Medical School,
577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 462 1199

E-mail : k0106142@med.kawasaki-m.ac.jp