

研究結果報告書

<研究課題>

海馬ニューロン新生における神経堤幹細胞の性状と機能解明

代表研究者:東京医科大学 組織・神経解剖学分野 准教授 大山恭司

共同研究者:長崎大学 医学部 病理学 准教授 森 亮一

【抄録】

最近、髄膜から分泌されるシグナル分子が脳ニューロンの産生を促進すること、髄膜細胞自身が脳皮質に進入してニューロンに分化することが報告された (Bifari et al., *Cell Stem Cell*, 2017)。しかし、髄膜細胞の性状やその海馬ニューロン新生における役割は明らかとなっていない。そこで本研究では、私たちが独自に見出した、髄膜に発現するシグナル分子、髄膜細胞の発生学的起源、そして髄膜細胞のプログラム細胞老化に着目して髄膜細胞の性状および機能の解析を行った。その結果、発生・発達期のマウス海馬周囲髄膜に CD271 陽性を示す神経堤幹細胞(NCSC)が常在し、レチノイン酸(RA)合成酵素 Raldh2 を発現することが明らかとなった。また海馬神経幹細胞が BLBP や転写因子 pSmad3 を発現し、グリアが Olig2 を発現するというデータを得た。そこで RA シグナル阻害剤を用いた海馬歯状回の *ex vivo* 培養実験を行なったところ、髄膜由来 RA シグナルが BLBP 陽性を示す神経幹細胞および Olig2 陽性グリアの産生に必要であることが示唆された。また髄膜に常在する NCSC を CD271MACS ビーズで精製後、オルガノイドを形成し、免疫染色にて解析したところ、髄膜に常在する NCSC が増殖し、Foxc2 陽性髄膜線維芽細胞へ分化する一方で、MAP2 陽性ニューロンに分化することが明らかとなった。そして一部の細胞がプログラム細胞老化に陥ることを *in vitro* で再構築することに成功した。今後さらに、海馬ニューロン新生における髄膜シグナルの機能解析、髄膜におけるプログラム細胞老化の分子機構とその生物学的意義を明らかにする必要がある。

1. 研究の目的

成体期における海馬ニューロン新生は、脳機能(記憶、認知)そして恒常性の維持に重要な役割を果たす。成体ニューロン新生には、脳内の神経幹前駆細胞の活性化と

ニューロン分化が必要である。最近、胎生期において、脳周囲の髄膜細胞からのシグナルが、脳のニューロン産生を促進する、あるいは髄膜細胞自身が脳皮質に進入、ニューロンに分化することが報告された (Bifari et al., *Cell Stem Cell*, 2017)。

つまり髄膜細胞は間接あるいは直接的にニューロン新生に寄与する。しかし、成体ニューロン新生における、髄膜細胞の性状とその役割はいまだに明らかとなっていない。

そこで本計画では、下記の問題に答えるために実験を行った。

- 1) 髄膜および海馬神経幹細胞にどのようなシグナル分子、転写因子などの遺伝子が発現しているか？
- 2) 海馬周辺髄膜に由来するシグナルは、転写因子の発現制御を介して海馬ニューロンの新生を促進するか？
- 3) 海馬周辺髄膜のターンオーバー(増殖→分化→老化)はどのように制御されているか？
- 4) 海馬周辺髄膜細胞は、海馬ニューロンへ分化するか？

2. 研究方法と経過

2-1 免疫組織染色

マウス組織を 4%パラホルムアルデヒド(4%PFA)で4°C一晩固定。翌日、PBS洗浄、30%スクロースに浸漬。OCT包埋後、凍結切片を作製。1次抗体で4°C一晩反応した。PBS洗浄後、蛍光2次抗体反応を行った。PBS洗浄、封入し、共焦点レーザー顕微鏡で観察、画像撮影を行った。1次抗体としては、プログラム細胞老化マーカーp21、髄膜細胞マーカーFoxc2、ニューロンマーカーMAP2、グリアマーカーOlig2、神経幹細胞マーカーBLBPなどを用いた。

2-2 髄膜細胞及び海馬神経幹細胞に

よるオルガノイド形成

マウス新生仔から髄膜あるいは海馬を採取し、ピペットで機械的に解離した後、MACS磁気ビーズで髄膜細胞(CD271+)、神経幹細胞(CD133+)を精製した。FGF2, EGF存在下、3週間マトリゲル内で培養することでオルガノイド形成実験を行った。形成したオルガノイドを4%PFAにて固定後、免疫染色にてマーカー分子の発現を解析した。

3. 研究の成果

3-1 髄膜および海馬神経幹細胞における遺伝子発現

発生期から加齢期に至るまでのマウスを用いた免疫組織染色の結果、次のデータを得た。

1) 海馬周辺髄膜にCD271陽性神経堤幹細胞(NCSC)が存在する、2) NCSCがシグナル分子RA, TGFβを発現する、3) 成体型海馬NSCは、RA, TGFβの下流転写因子pSmad3、そしてBLBPを発現するが、グリア転写因子Olig2は発現しない、4) 加齢により海馬神経幹細胞が老化、減少することを見出した。

3-2 海馬周辺髄膜に由来するRAシグナルは海馬神経幹細胞およびアストログリア産生を正に制御する

海馬歯状回スライスをRAシグナル阻害剤(AGN193109)存在下で6日間培養したところ、Olig2陽性グリアおよびBLBP陽性細胞の減少が認められた。BLBPは神経幹細胞およびアストログリアに発現することから、RA

シグナルが神経幹細胞およびアストログリアの産生を促進する作用をもつことが示唆された。

3-3 海馬周辺 NCSC のターンオーバー（増殖→分化→老化）解析系の確立とニューロン分化能の検討

生後 2 日目のマウス海馬周辺髄膜を単離し、CD271+MACS ビーズで NCSC を精製した後、マトリゲル内にて3週間培養した。形成したオルガノイドを 4%PFA 固定し、免疫染色にて髄膜細胞マーカー(Foxc2)、細胞老化マーカー(p21)、ニューロン分化マーカー(MAP2)の発現を解析した。その結果、Foxc2+/p21+の老化髄膜細胞に加えて少数の MAP2+ニューロンを見出した。これらの結果は、NCSC が増殖し、髄膜細胞へ分化すること、またニューロン分化能をもつことを示唆する。さらに、髄膜に常在する NCSC がプログラム老化する過程を解析する実験系を確立することに成功した。

4. 今後の課題

4-1 海馬周辺 NCSC 由来シグナル(RA , TGFβ)は、転写因子 pSmad3 の発現、転写因子 Olig2 の発現抑制を介して海馬顆粒ニューロンの新生を促進するか？

今後、BLBP 陽性細胞(神経幹細胞、アストログリア)が発現する pSmad3 に RA シグナルがどのような影響を及ぼすかを明らかにする必要がある。また Prox1 陽性顆粒細胞の産生に与える影響について解析する必要がある。

4-2 海馬周辺 NCSC のターンオーバー（増殖→分化→老化）はどのように制御されているか？

本研究で、海馬周辺髄膜に在住する NCSC のターンオーバーの解析プラットフォームの確立に成功した。今後、この解析系を用いてプログラム細胞老化を制御するシグナル系を解明する必要がある。

4-3 海馬周辺髄膜に在住する NCSC は、海馬ニューロンへ分化するか？

本研究で、髄膜に在住する CD271+の NCSC が MAP2 陽性ニューロンへの分化能をもつことが明らかとなった。今後、分化したニューロンが海馬ニューロン特異的転写因子(Prox1, Tbr1)を発現するか検証する必要がある。

5. 研究成果の公表方法

本研究成果の一部を第 99 回日本生理学会大会、解剖学会連携シンポジウム(招待講演)、日本解剖学会全国学術集会(日本解剖学会(大阪)2022)で発表した。今後、原著論文にまとめて学術雑誌に投稿する予定である。また、本研究課題の副産物として、メタボリック症候群を予防するはたらきをもつプロオピオメラノコルチン発現ニューロンの産生を制御するシグナルを明らかにした。その研究成果を神経科学の国際学術誌 Frontiers in Neuroscience に発表した(<https://doi.org/10.3389/fnins.2022.85528>)。また本成果は日刊工業新聞に掲載された(<https://www.nikkan.co.jp/articles/view/0645726>)。

Characterisation and functional analysis of neural crest stem cells in hippocampal neurogenic niche

Principal investigator: **Kyoji Ohyama**

Associate Professor, Department of Histology and Neuroanatomy, Tokyo Medical University

Co-investigator: **Ryoichi Mori**

Associate Professor, Department of Pathology, Nagasaki University Medical School

Summary

It has been shown that meninges-derived signals promote neuronal production in mouse early embryonic neocortex, and that some meningeal cells themselves migrate into the cortex to differentiate into neurons (Bifari et al., *Cell Stem Cell*, 2017). However, properties of meningeal cells and their function in postnatal neurogenesis remains elusive. Here we examined signalling molecule expressed in meninges, developmental origin of the meningeal cells, and their programmed senescence. Our data show that meninges contain CD271⁺ neural crest stem cells (NCSCs) that express Raldh2, a synthetic enzyme of retinoic acid (RA). *Ex vivo* culture experiments suggest that RA signal promotes the production of BLBP⁺ radial glia (*i.e.* neural stem cells) and Olig2⁺ glial cells in postnatal dentate gyrus. Meninges-derived organoid culture experiments also show that CD271⁺ NCSCs proliferate and differentiate into not only Foxc2⁺ meningeal fibroblasts but also MAP2⁺ neurons. Further, some of them undergo programmed senescence. Future studies will be necessary to further investigate 1) the function of meninges-derived RA signal in postnatal hippocampal neurogenesis, 2) the molecular mechanism of the programmed senescence in meninges and its biological significance.