主論文の要旨

Tanycyte-like cells derived from mouse embryonic stem culture show hypothalamic neural stem/progenitor cell functions

（マウス ES 細胞視床下部分化誘導系後期に残存する
Rax^{+}細胞は Tanycytes と類似する）

名古屋大学大学院医学系研究科　総合医学専攻
病態内科学講座　糖尿病・内分泌内科学分野
（指導：有馬 寛　教授）
加納 麻弓子

【背景】

近年、成体視床下部において神経新生を行う細胞が存在することが報告され Tanycytes と呼ばれている。Tanycytes は成体視床下部における神経幹／前駆細胞として機能し、神経新生を通して摂食や体重、エネルギー代謝を制御している。さらに Tanycytes の障害によって肥満や耐糖能異常が引き起こされることや、Tanycytes は加齢によって失われ高齢のマウスではほぼ完全に消失することが報告されている。したがって、多能性幹細胞からの機能的な Tanycytes の分化誘導は、疾患や加齢によって失われる視床下部ホメオスタシス、エネルギー代謝異常の新たな治療手段となり得ることが期待される。

Tanycytes は第 3 脳室周囲に細胞体が整列し、長い単極性の軸索を弓状核や腹内側核などの脳実質へと送っている。解剖学的位置によって背側よりα1、α2、β tanycytes と分類され、それぞれの Tanycytes は異なる形態と生理的機能を持っている。Tanycytes には広く Sox2 や Vimentin などの神経幹／前駆細胞マーカーが発現しており、また特に腹側 Tanycytes においては Nestin が強く発現している。

転写因子である Retina and anterior neural fold homeobox (Rax)は発生初期の視床下部前駆細胞に広く発現しているが、発生が進むにつれて減少し、成体視床下部においては Tanycytes に限局して発現している。Rax の強い発現は腹側に位置するα2 tanycytes やβ tanycytes に認められることが報告されている。

マウス ES 細胞では成長因子を厳格に除去した無血清培地を用いることによって視床下部組織へ分化誘導されることが報告されている。マウス ES 細胞視床下部分化誘導系において、分化開始後 Day7 付近で一旦強く発現した Rax は、分化が進むにつれて減少するが、神経やグリア細胞が盛んに産生されている Day22–25 に至っても一部の領域では Rax 陽性細胞が残存し続けることに着目した。この Rax 残存細胞が成体視床下部 Tanycytes と同様に神経幹／前駆細胞として機能しているのではないかと考えた。

【目的】

マウス ES 細胞視床下部分化誘導系後期に残存する Rax 陽性細胞が成体における Tanycytes と同様に神経幹／前駆細胞としての性質を有するか検討した。

【方法】

Rax-EGFP ノックインマウス ES 細胞を使用した。未分化状態で維持したマウス ES 細胞をシングルセルの状態に分散し、成長因子を厳格に除去した無血清培地中で再凝集させ、視床下部組織へと分化誘導させる。視床下部分化誘導系後期（分化誘導 Day22–25）に残存する Rax-EGFP^{+}細胞を、セルソーターを用いて sort し、その性質について解析した。

【結果】

マウス ES 細胞視床下部分化誘導系 Day22–25 における Rax-EGFP 陽性率は全体の

14.8 ± 0.94% (mean ± s.e.m., n=36)であった。Early hypothalamic progenitor cells にあたる Day7 では Rax-EGFP 陽性率が 55%–70%であることから、視床下部分化誘導系後期においては、より限定された範囲で Rax-EGFP 陽性領域が存在することがわかる。

Rax-EGFP$^+$細胞は Rax の他にも SOX2 や Vimentin、Nestin など代表的な神経幹/前駆細胞マーカーを発現していた。さらに、sort 後シングルセルの状態である Rax-EGFP$^+$細胞を接着培養させると、MAP2$^+$NeuN$^+$成熟ニューロンや GFAP$^+$アストロサイトなど、オリゴデンドロサイトを除く 2 系統の神経系細胞へと分化した。

続いて、sort した Rax-EGFP$^+$細胞の mRNA 発現を quantitative PCR を用いて評価した。Rax-EGFP$^+$細胞は、α2 tanycytes やβ tanycytes など腹側 Tanycytes に発現する *Fgf10* や *Fgf18*、Tanycytes 中の Rax 維持に関与する *Lhx2* の発現が、Rax-EGFP$^-$細胞と比較して有意に上昇していた。さらに、sort した Rax-EGFP$^+$細胞と Day7 の Early hypothalamic progenitor cells を比較すると、前者では成熟した Tanycytes に認められる *Dio2* や *Gpr50* の発現が有意に上昇していた。

次に Neurosphere 形成実験を行った。Rax-EGFP$^+$細胞は神経幹細胞の未分化性維持と自己増殖に必要な FGF-2 の存在下で、多数の Neurosphere を形成した(Figure 1)。これら Rax-EGFP$^+$ Neurosphere は Sox2、Vimentin、Nestin、Bmi1 など代表的な神経幹／前駆細胞マーカーを広く発現し、また、FGFR1 やその下流のシグナルにあたる phosphorylated Erk1/2 の発現も認められた。Rax-EGFP$^+$細胞由来の Neurosphere は安定して継代可能であり、passage10 まで継代可能なことを確認した。Rax-EGFP$^+$細胞由来の Neurosphere は継代を繰り返しても内部の神経幹／前駆細胞マーカーの発現が保たれており、passage 毎の Sox2 発現は 75.6 ± 1.94% (mean ± s.e.m., n=9)であった。これらの継代を経た Neurosphere からも、接着培養により MAP2$^+$NeuN$^+$成熟ニューロン、GFAP$^+$アストロサイト、O4$^+$ CNPase$^+$オリゴデンドロサイトの 3 系統の神経系細胞へ分化した (Figure 2)。分化したニューロンには代表的な視床下部摂食ニューロンである Neuropeptide Y$^+$のものが含まれていた。Neuropeptide Y$^+$ニューロンは腹側 Tanycytes から弓状核への分化が報告されている。

また Rax-EGFP$^+$ Neurosphere の形成は FGF-2 非存在下では有意に抑制され、さらに FGFR1 阻害薬である SU5402 によっても有意に抑制された。このことから、Rax-EGFP$^+$ Neurosphere の形成つまり Rax-EGFP$^+$細胞の自己増殖には FGF-2 が必要であることが示唆された。継代を重ねると Neurosphere 内部の Rax 発現は徐々に減少するものの (passage 6 以降)、FGF-2 を除く培地に移すことで視床下部ニューロンへの分化とともに再び一部の細胞で Rax 発現が認められた。

【結論】

マウス ES 細胞視床下部分化誘導後期に残存する Rax$^+$細胞は次のような性質を有することが示唆された。

1. Tanycytes と同様に神経幹／前駆細胞として機能し、視床下部ニューロンを含む 3 系統の神経系細胞への多分化能を有する。

2. 腹側 Tanycytes と類似する。
3. FGF-2 により自己増殖が促進され Neurosphere を形成する。
マウス ES 細胞から誘導されたこれらの Tanycytes 様細胞は視床下部再生医療における新たなアプローチとなることが期待される。