

—総説—

## ニューロトロフィンによる神経分化の 制御機構に関する研究

伊藤 久則

**要約:** ニューロトロフィンは発生から老化に至る長期間にわたり神経細胞に作用し、生存維持、分化促進、神経機能の獲得・維持などの役割を担う神経栄養因子と考えられている。神経細胞の分化に及ぼすニューロトロフィンの作用は数多く研究されてきたが、その多くは神経分化の後期過程を対象としており、全貌の解明には程遠いのが現状である。そこで本研究では、神経分化のモデル細胞として繁用される PC12 細胞および多分化能をもつ神経幹細胞を用いて、初期神経分化過程におけるニューロトロフィンの作用を検討した。その結果、ニューロトロフィンの一つである NGF は、p75 を介して PI-3 キナーゼ/Akt 経路を活性化し、分化に先立って増殖停止を誘導すること、また、ニューロトロフィンが神経幹細胞から神経細胞への分化をプライミングすることを明らかにし、ニューロトロフィンが神経分化の初期過程の制御にも深く関わっている可能性が示唆された。

索引用語: ニューロトロフィン、神経分化、増殖停止、PC12 細胞、神経幹細胞、神経成長因子、脳由来神経栄養因子

## Neurotrophin-dependent control of neuronal differentiation

Hisanori ITO

**Abstract:** Neurotrophin is a family of neurotrophic factors that have profound influences on neuronal development, including survival, neuronal differentiation, procurement and maintenance of neuronal functions. Many previous studies have not yet fully clarified critical roles of neurotrophins for neuronal differentiation because those studies focused on the investigations about the role of neurotrophins at late stages of neuronal differentiation. In the present study, we examined mechanisms of neurotrophin-induced neuronal differentiation using PC12 cells and neural stem cells. The results obtained demonstrated that NGF activates PI-3 kinase/Akt pathways via p75 in cultured PC12 cells, which is necessary for the growth arrest, and that neurotrophins have priming effects on neuronal differentiation of neural stem cells cultured from embryonic mouse telencephalon. These findings suggest that neurotrophins also play roles in neuronal differentiation at much earlier stages of neurogenesis than expected before.

**Keyphrases:** neurotrophin, neuronal differentiation, growth arrest, PC12 cells, neural stem cells, NGF, BDNF

### 1. 緒言

脳神経系は感覚情報の処理、運動系の制御、意識や感情の創出など、身体と精神の活動を統御する最高中枢器官である。脳神経系を構成する主な細胞はオリゴデンドロサイトおよびアストロサイトという2種のグリア細胞と、機能単位であり神経伝達を直接担う神経細胞である。オリゴデンドロサイトは神経軸索を幾重にも膜構造で包み込み、ミエリンを形成して神経伝導の絶縁体として働く。アストロサイトは神経細胞の支持体としての物理的役割のほか、血

管から神経細胞へ栄養物を媒介する、不要になった神経伝達物質を取り込んで除去し神経細胞の微小環境を整える、血管内皮細胞を裏打ちして脳・血液関門を形成する、種々の神経栄養因子やサイトカインを産生する、などの重要な働きを担っている。このように3種の細胞が渾然一体となって脳神経系を構築し、機能している。

神経細胞は、発生過程で神経幹細胞としての最終分裂を終えると神経前駆細胞として特定の部位へ移動し、その場所で分化を完了する。発生の後期からは神経幹細胞からオ

リゴデンドロサイトやアストロサイトの前駆細胞が分化し、移動して神経細胞の間に入りこみ、最終的に分化してそれぞれの機能を果たすようになると、神経系としての構造が確立してくる。さらに、個々の神経細胞がそれぞれ異なった役割を果たすべく特殊なフェノタイプへと分化し、シナプスを通じた複雑な神経細胞相互の刺激連絡網や標的器官との結びつきを確立して高度な機能を獲得してゆく。

造血系、小腸、皮膚、骨格筋など多くの組織や器官には多能性幹細胞が存在し、組織特異的な細胞はこの幹細胞から発生、分化してくると考えられている。神経系における幹細胞については、「胎生期中枢神経系の原基である神経管の脳室周辺部位に、分裂能を有する神経系の前駆細胞が存在し、前駆細胞から神経細胞とグリア細胞が分化していく」という仮説が以前から提唱されていたが<sup>1)</sup>、近年、幹細胞の選択的培養法や選択的マーカーを用いた同定法などの技術的進歩があり、神経系における幹細胞 (neural stem cells) の存在が明らかとなった。神経幹細胞は、「増殖し継代を繰り返すことができる自己複製能と同時に、神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトという中枢神経系を構成する3種類の細胞に分化できる多分化能を有する未分化細胞」と定義されている<sup>2)</sup> (Fig. 1)。実際に培養下の神経幹細胞は、上皮細胞成長因子 (epidermal growth factor : EGF) あるいは塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor : FGF-2) といった増殖因子を培地に添加するとその性質を保持したまま盛んに増殖するが、増殖因子を取り除くと、特定の細胞を産み出す中間の前駆細胞 (神経前駆細胞とグリア前駆細胞) へと変化する (Fig. 1)。しかし、神経細胞およびグリア細胞の分化系譜の詳細とその制御機構については現在のところ不明な点が多い。

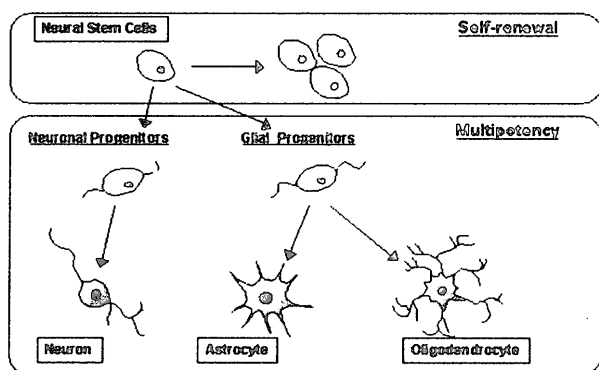


Fig. 1 Self-renewal and multipotent activity of neural stem cells.

細胞間の様々な物質の相互作用により種々の細胞内シグナルが伝達され、個々の神経細胞の分化・成熟や機能の獲得・維持が進行する。そのような作用を示す代表的な物質として神経栄養因子と呼ばれる一群のタンパク質がある。特に、最初に発見された神経成長因子 (nerve growth

factor : NGF) とその遺伝子ファミリーからなるニューロトロフィンファミリーについては多くの研究が行われ、胎生期あるいは成体の神経系において、細胞の増殖、未分化神経細胞の生存、神経細胞への分化・成熟や機能の獲得・維持あるいは神経細胞の生死のコントロールなど、多彩な役割を担っていることが分かってきた<sup>3-5)</sup>。

NGF は、1951年に Levi-Montalcini らにより発見された最初の神経栄養因子であり、ニワトリ胚の脊髄後根神経節に対して神経突起の形成や分化を促進する液性因子として発見された<sup>6)</sup>。後に、マウス顎下腺より NGF タンパク質が単離され、118個のアミノ酸からなる分子量 13,259のタンパク質が非共有結合により二量体 (26kDa) を形成していることが分かった。NGF は特定の神経細胞のみに分化誘導、生存維持などの神経栄養活性を示すため、他の神経細胞に神経栄養活性を示す類似タンパク質の存在が推定され、Barde らによって脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor : BDNF) が後根神経節神経細胞の生存維持作用を有するタンパク質として単離、精製された<sup>7)</sup>。BDNF は119個のアミノ酸からなるタンパク質であり、6つのシステイン残基の位置を含めて NGF のアミノ酸配列と類似性をもっていた。これを発端に、類似因子の探索が行われた結果、1990年にニューロトロフィン (neurotrophin : NT) -3 が同定され<sup>8)</sup>、現在までに、哺乳類では NGF、BDNF、NT-3、NT-4/5 の4種類の因子がニューロトロフィンファミリーを構成していることが明らかとなった<sup>9,10)</sup>。これらの因子のアミノ酸配列は相互に類似し (50~60%のホモロジー)、種間を越えてアミノ酸配列がよく保存されているのも特徴である。

ニューロトロフィンファミリーには高親和性と低親和性の受容体が確認されている。高親和性受容体を構成する膜タンパク質は Trk ファミリーと呼ばれ、TrkA<sup>11)</sup>、TrkB<sup>12)</sup>、TrkC<sup>13)</sup> の3種類が存在し、いずれも細胞質内にチロシンキナーゼドメインを持つ。Trk ファミリーについてもニューロトロフィンファミリーと同様に相同性が高く、種間を越えてよく保存されている。各ニューロトロフィンと Trk 受容体の関係は、TrkA は NGF と、TrkB は BDNF および NT-4/5 と、TrkC は NT-3 とそれぞれ選択的に高親和性で結合する<sup>14)</sup> (Fig. 2)。ニューロトロフィンはそれぞれの

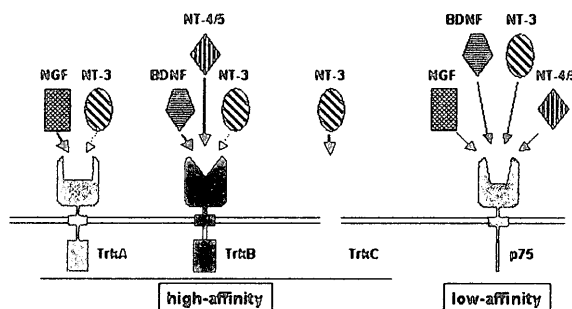


Fig. 2 Neurotrophins and neurotrophin receptors.

Trk 受容体と結合し、Trk 受容体のキナーゼを活性化することによって種々の生理活性を示す。一方、低親和性受容体である p75 ニューロトロフィンレセプター (p75) は NGF 受容体として遺伝子クローニングされたが<sup>15)</sup>、その後、他のニューロトロフィンに対しても同様の親和性を示すことが明らかにされた<sup>16)</sup> (Fig. 2)。しかし、p75 については Trk ファミリーとの分子間相互作用や、細胞内シグナルのクロストークなど、その役割には不明な部分も多い。

神経細胞は細胞分裂能を失っており、しかも様々な表現型に分化しているため、均一な神経細胞を多量に調製することは困難である。しかし増殖性の株化細胞を神経細胞に分化させることができれば、多量の均一な神経細胞を分子生物学的、生化学的な解析に供することができる。このような株化細胞として広く用いられているのがラット副腎髄質褐色細胞腫、PC12 細胞である。

PC12 細胞は、1976 年に Greene と Tischler によってラット副腎髄質褐色細胞腫から樹立された細胞株である<sup>17)</sup>。この細胞は NGF 受容体である TrkA と p75 をともに発現しており、NGF に応答して増殖を停止し、神経突起を伸長して、神経細胞の骨格タンパク質、神経伝達物質合成酵素などの遺伝子を発現するようになり、クロム親和性細胞様の細胞から交感神経細胞様の形態と機能を獲得するユニークな特徴がある<sup>17, 18)</sup>。このため、PC12 細胞は NGF の細胞内シグナル伝達や神経分化のメカニズムの解析、神経伝達物質の生合成の研究や神経内分泌の研究など神経を対象とした様々な研究に広く用いられている。

ニューロトロフィンをはじめとする神経栄養因子は神経発生の後期過程で、特定の神経細胞の生存や分化・成熟に必須であることが明らかにされてきた。しかし、神経分化の初期過程における役割や中枢神経系の神経分化に対する影響など、重要な部分がまだ不明のまま残されているため、神経発生過程における神経栄養因子の機能の全体像はまだまだ見えていないというのが現状である。そこで本研究では、未分化な 2 種類の細胞、PC12 細胞と神経幹細胞を用いて、神経分化過程における神経栄養因子、特にニューロトロフィンの役割に関する以下の研究を行い、いくつかの新知見を得た。

## 2. NGF に応答異常を呈する PC12 細胞形質転換株 (PC84 細胞) の解析

NGF は 2 種類の受容体、TrkA と p75 に結合して細胞内にシグナルを伝える。NGF との結合により TrkA は二量体を形成し、細胞内ドメインのチロシン残基が自己リン酸化され、チロシンキナーゼが活性化される。この TrkA チロシンキナーゼの活性化が引き金となり、細胞内シグナル伝達経路である Ras、mitogen-activated protein (MAP) キナーゼ、ホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol:

PI) -3 キナーゼ、ホスホリパーゼ C- $\gamma$  などが活性化される<sup>19)</sup>。これらのシグナル伝達経路の活性化によって NGF の分化誘導、生存維持などの作用が引き起こされると考えられている。一方、もう一つの受容体 p75 に NGF が結合すると細胞の種類や培養環境に応じて様々な細胞応答が起きる。知覚神経細胞やオリゴデンドロサイトなどの細胞ではアポトーシスが誘導され<sup>20, 21)</sup>、海馬神経細胞や知覚神経細胞では突起伸長が促進され<sup>22, 23)</sup>、大脳皮質神経細胞ではグルタミン酸の細胞毒性に対する抵抗性が生じる<sup>24)</sup>。また、p75 は TrkA と相互作用して、TrkA への NGF の結合や TrkA の活性化を効率よく進行させる役割をもつと考えられている<sup>25)</sup>。PC12 細胞の NGF に対する応答についても TrkA と p75 の相互作用が重要であると考えられているが、p75 を介したシグナル伝達がどの細胞応答にどのように関わっているのか、詳細は明らかになっていない。

ラット副腎髄質の褐色細胞腫から樹立された PC12 細胞は、神経分化のモデル細胞として広く研究に用いられており、これまでに多くの知見が蓄積されている<sup>17, 18)</sup>。さらに、PC12 細胞の亜株、変異株、形質転換株が数多く知られており、これらの細胞を用いた研究は NGF のシグナル伝達機構の解明に大きく寄与している。例えば、PC12h は、NGF によってチロシン水酸化酵素活性 (tyrosine hydroxylase : TH) が誘導され、アドレナリン作動性の性質が増強される細胞株である<sup>26)</sup>。また、TrkA の機能が欠如している PC12nnr5 株を用いた研究では TrkA のシグナル伝達が神経分化に必須であることが確認されている<sup>27)</sup>。さらに、PC12-27 細胞はネオマイシン耐性プラスミドで形質転換された PC12 細胞の中から偶然に得られた株であり、調節性分泌機構に障害をもつが、NGF に応答して突起を伸長する<sup>28)</sup>。

Nomoto らは NGF の分泌機構を解析する目的で PC12 細胞に NGF cDNA を導入したところ、ほとんどの細胞は産生された NGF に応答して増殖を停止し、長い突起を伸長したが<sup>29)</sup>、頻度は低いものの、この細胞集団の中に盛んに増殖する細胞を見出した。この増殖性の細胞は、突起を形成しているものの、増殖を停止しないユニークな細胞であった。すなわち、NGF による増殖制御プロセスになんらかの障害があり、分化と増殖の細胞内機構を解析するには恰好の材料と考えられた。そこで、いくつかのクローンを株化し、これを用いて以下のように解析した。

## PC12 細胞形質転換株、PC84 細胞の作製および PC12 細胞との性質の比較

NGF cDNA で PC12 細胞を形質転換後、G418 を用いて遺伝子導入された細胞を選択培養した。さらに培養を継続して増殖する細胞コロニーを選択した。6 cm ディッシュ 2 枚で 6 種類のコロニーを得た。これらの細胞コロニーを PC841、PC842、PC843、PC844、PC845、PC846 と名づけ、

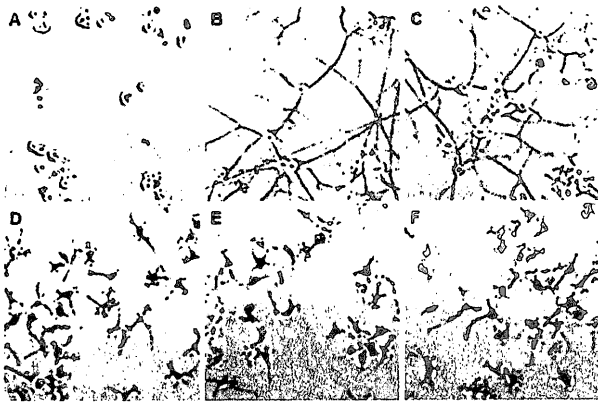


Fig.3 Morphology of PC12 and PC84 cells.

A: PC12 cells. B: PC12 cells incubated with NGF (50 ng/ml) for 4 days. C: PC12 cells transfected with NGF cDNA and cultured for 4 days. D: PC845B9 cells. E: PC846B8 cells. F: PC846F9 cells. PC84 cells were incubated for 4 days after plating.

以後、PC84 細胞と総称した。コロニーの中にいくつかの形態的に異なる細胞が混在していたため、PC845 細胞と PC846 細胞についてはさらにクローニングを行い、新たに得られたクローンのうち PC845B9、PC846B8、PC846F9 細胞を用いて以降の解析を行った。すべての PC84 細胞は突起を伸長していたが (Fig. 3D-F)、NGF で処理した PC12 細胞 (Fig. 3B) や NGF 遺伝子を導入した PC12 細胞 (Fig. 3C) と比較して PC84 細胞の突起は明らかに短かった。また、PC84 細胞から成熟型 (活性型) NGF が産生、分泌されていることは別に確認している (結果は示さず)。

次に、PC84 細胞の増殖の速さを PC12 細胞と比較した。PC84 細胞の増殖性は PC12 細胞よりも高く (Fig. 4A)、細胞数の倍化に要する時間 (ダブリングタイム) が明らかに短い (ダブリングタイム: PC845B9;  $1.43 \pm 0.14$ , 6B8;  $1.48 \pm 0.12$ , 6F9;  $1.51 \pm 0.11$ , PC12;  $2.04 \pm 0.09$  days)。しかし、無血清培地で培養すると、PC84 細胞は増殖を停止し (Fig. 4B)、長い突起を伸長した (結果は提示せず)。このことから、PC84 細胞は増殖を血清に依存しており、長い突起を伸長する能力をもつことが分かった。したがって PC84 細胞の突起が短いのは、細胞分裂のたびに突起が退縮して、伸長が次の分裂までの時間に限られているためと推定された。

PC84 細胞は短いながら突起を伸長して、分化した細胞の形態をもつ。そこで、PC12 細胞の神経分化の指標となるアセチルコリンエステラーゼ (acetylcholinesterase: AChE) 活性を測定し、PC84 細胞分化の程度を評価した (Fig. 5)。PC84 細胞は未処理の PC12 細胞より高い AChE 活性を示したが、50 ng/ml の NGF 存在下で分化した PC12 細胞に比べると低値であり、10 ng/ml の NGF で分化した PC12 細胞と同程度であった。通常、PC12 細胞は約 1 ng/ml の NGF で分化が開始され、50 ng/ml 以上の NGF 濃度で最

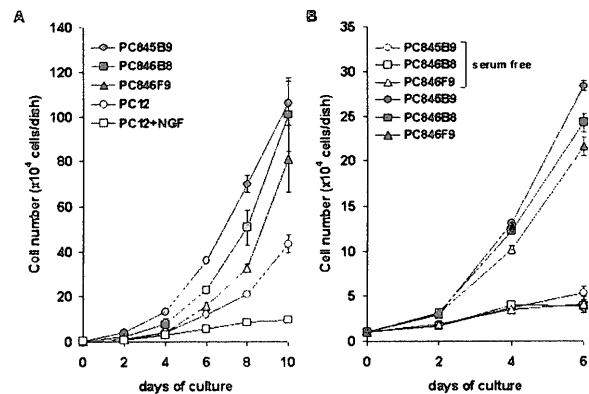


Fig. 4 Growth of PC84 cells.

A: PC12 and PC84 cells were plated (10,000 cells per dish) on day 0 in the usual medium containing 10% horse serum and 5% fetal bovine serum, and NGF (50 ng/ml) was added to half of the PC12 cultures on day 1. Cell numbers were counted with a hemocytometer at the indicated times. B: Growth in serum-free medium. PC84 cells were plated (10,000 cells per dish) in the usual medium, and on the next day the medium of the dishes was exchanged for serum-free medium (day 0). Cell numbers were counted as for A.

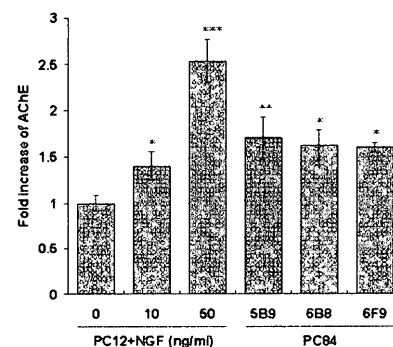
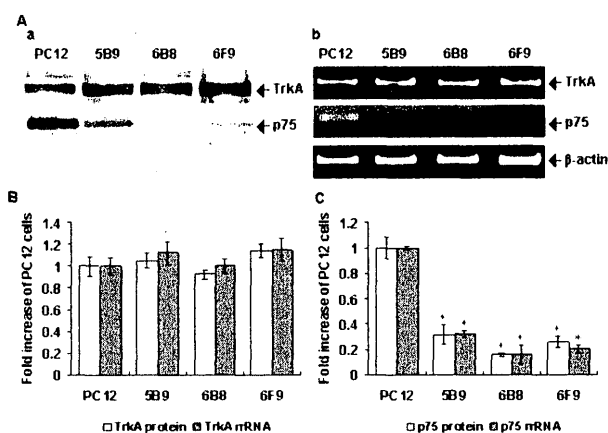


Fig. 5 Acetylcholinesterase activity in PC84 cells.

PC12 cells were incubated with or without NGF (10, 50 ng/ml) for 3 days. PC84 cells were cultured for 3 days. Protein concentration of each cell lysate was determined, and its acetylcholinesterase activity was assayed. The activity per microgram of protein is shown as -fold increase from that of nontreated PC12 cells. The probability values were determined by Student's t-test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.005$  compared with the value of nontreated PC12 cells.

大の分化応答を示すことから、PC84 細胞は、分化が十分に完了した状態にはないと考えられた。以上の結果より、PC84 細胞は分化した性質を持っているが、完全に神経細胞様に分化、成熟した細胞ではないことが示唆された。

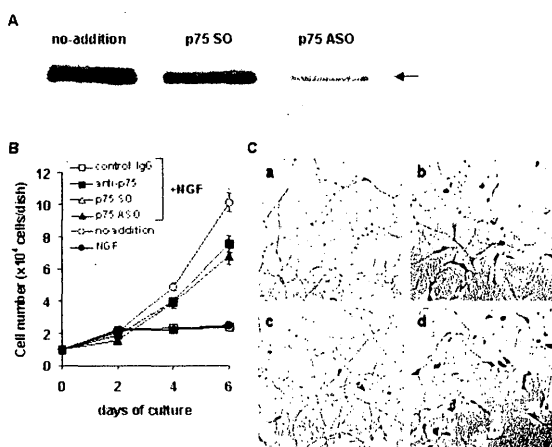
PC84 細胞と PC12 細胞について、2種類の NGF 受容体、TrkA と p75 の発現を比較した。TrkA タンパク質の発現は PC84 細胞のサブタイプ間で多少の変動がみられたが、PC12 細胞と有意な違いを認めなかった (Fig. 6A)。これに一致して、TrkA mRNA の発現も PC84 細胞と PC12 細胞で違いはなかった (Fig. 6A, B)。ところが、p75 のタンパク質と mRNA 発現は PC84 細胞で著明に減少していた (Fig. 6A, C)。これらの結果から、PC84 細胞の特性の決定に p75 の発現減少が関連している可能性が示唆された。



**Fig.6 Expression of TrkA and p75 in PC12 and PC84 cells.** PC12 and PC84 cells were cultured for 4 days, and cell lysates and total RNA were prepared. A: Each cell lysate was subjected to SDS-PAGE (7.5 and 10 %, for TrkA and p75, respectively), blotted to a membrane, and incubated with anti-TrkA or anti-p75 antibody (a). Total RNA was subjected to RT-PCR using primers for TrkA, p75, or  $\beta$ -actin and applied to a 2 % agarose gel containing ethidium bromide (b). B, C: Specific bands of TrkA (B) or p75 (C) protein and amplified DNA were densitometrically quantified and compared as fold-increase in density over the bands from PC12 cells. The probability values were determined by Student's t-test: \* $p < 0.05$  compared with the value for PC12 cells.

**PC12 細胞での p75 発現の抑制とその影響**

p75 の発現減少が NGF による PC12 細胞の分化、特に増殖の停止に影響しているかどうかを検討するため、PC12 細胞の p75 の発現や細胞内シグナルを抑制してその影響を調べた。まず、p75 遺伝子のアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) で PC12 細胞を処理すると p75 発現が減少



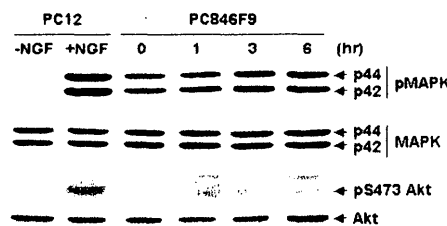
**Fig.7 Effect of inhibition of p75 function on growth and morphology of PC12 cells.** PC12 cells were plated (10,000 cells per dishes) and pretreated with sense or antisense oligonucleotide (SO or ASO) every 3 days or with anti-p75 antibody or control mouse IgG for 1 hr. Then NGF (25 ng/ml) was added to each dish (day 0) A: Expression levels of p75 (arrow) on the third day were examined by Western blotting with 50  $\mu$ g of protein in each lane. B: Cell numbers were counted at the indicated times after NGF addition. C: Morphology of PC12 cells in the presence of NGF (25 ng/ml) for 6 days after pretreatment with mouse IgG (a), anti-p75 antibody (b), SO to p75 (c), or ASO to p75 (d), as described above.

することを確認した (Fig. 7A)。センスオリゴヌクレオチド (SO) で処理した細胞は p75 の発現低下を示さず、NGF の添加により増殖を停止し、長い突起を伸ばしたが、ASO 処理した PC12 細胞は NGF を添加しても増殖を続け (Fig. 7B)、伸ばす突起は短かった (Fig. 7C)。さらに、NGF と p75 との結合を阻害する p75 中和抗体で PC12 細胞を処理すると、NGF 存在下でも増殖を停止せず、短い突起を伸ばすようになった (Fig. 7B, C)。これらの結果から、p75 を介した NGF シグナルは PC12 細胞の増殖停止に必要であり、その欠損は PC84 細胞が増殖を停止しない原因の一つであると考えられた。

**p75 を介した増殖停止のシグナル伝達の解析**

次に、p75 と増殖停止との関係を明らかにするため、PC84 細胞のうち PC846F9 細胞を用いて細胞内シグナル伝達、特に MAP キナーゼ経路と PI-3 キナーゼ/Akt 経路について検討した (Fig. 8)。PC846F9 細胞では MAP キナーゼがリン酸化されており、培地交換後、時間とともに強くなったが、そのリン酸化の程度は NGF 処理 5 分後の PC12 細胞よりも低かった。一方、Akt のリン酸化の程度は PC846F9 細胞ではきわめて低く、培地交換 6 時間後でも変化しなかった。このとき、Akt タンパク質そのものの発現は PC12 細胞と同程度であったことから、PC846F9 細胞は自己分泌した NGF の作用を受けても Akt をリン酸化しないことが分かった。

TrkA を介して PI-3 キナーゼが活性化され、活性化された PI-3 キナーゼによって Akt がリン酸化される細胞内カスケードが明らかになっている<sup>30)</sup>。そこで、TrkA の活性化の程度を比較したところ、PC84 細胞の TrkA はリン酸化されているが、NGF に十分に応答した PC12 細胞よりリン酸化の程度は低かった (Fig. 9)。次に、TrkA の活性化程度が低い場合 Akt がリン酸化されないのではないかと考え、PC846F9 細胞に高濃度の NGF (500ng/ml) を添加し、強い NGF 刺激を与えた。この処置によって PC846F9 細胞の TrkA のリン酸化が小幅ながら上昇し、特に 140kDa の TrkA のリン酸化が強くなった (Fig. 9)。このとき、MAP



**Fig. 8 Phosphorylation of MAP kinase and Akt in PC846F9 cells.** Medium of cells was changed to serum-free medium. PC12 cells were incubated with or without NGF (25 ng/ml) for 5 min, and PC846F9 cells were collected at 0, 1, 3, and 6 h after the medium change. Each cell lysate was subjected to SDS-PAGE (10%) and blotted on a membrane. The membrane was incubated with anti-phospho-MAP kinase antibody, anti-MAP kinase antibody, anti-phospho-Akt antibody or anti-Akt antibody.

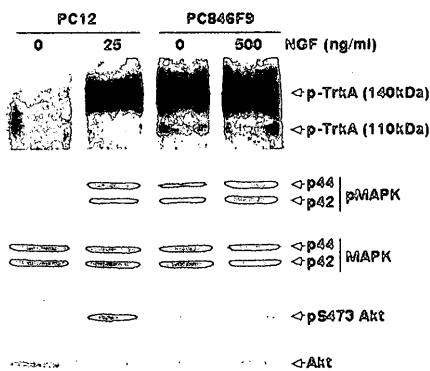


Fig.9 Effect of high concentration of NGF on phosphorylation of Akt in PC846F9 cells.

Medium of cells was changed to serum-free medium. PC12 and PC846F9 cells were treated with or without NGF (25 and 500 ng/ml, respectively) for 5 min. Phosphorylation of TrkA was analyzed by immunoprecipitation with anti-Trk antibody and Western blotting with anti-P-Tyr antibody after electrophoresis on 7.5 % gel. Phosphorylation of MAP kinase and Akt was analyzed as described in Fig. 8.

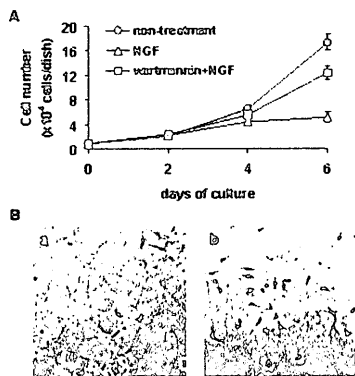


Fig.10 Effect of wortmannin on the differentiation of PC12 cells. A: PC12 cells were plated (10,000 cells per 3.5 cm dish), and pretreated next day with wortmannin (200nM) for 30 min. Then NGF (25 ng/ml) was added to each dish (day 0) and cell numbers were counted at the indicated times. B: Morphological change of PC12 cells 6 days after the addition of NGF (25 ng/ml) pretreatment with (b) or without (a) wortmannin (200nM).

キナーゼのリン酸化も強くなったが、Aktのリン酸化は起こらなかった (Fig. 9)。以上の結果から、PC84細胞におけるAktのリン酸化はTrkAの活性化の程度とは関与が薄いことが示された。また、高濃度のNGFで処理したPC846F9細胞は突起を長く伸長するようになったが、増殖は停止しなかったことから (結果は提示せず)、TrkAの活性化の増強はPC84細胞の突起形成と増殖スピードに影響を及ぼすが、増殖停止には不十分であることが分かった。すなわち、PC846F9細胞がNGF存在下でも増殖を続けるのはAktの活性化が欠如しているためと考えられた。

NGFによる細胞増殖の停止にPI-3キナーゼ/Akt経路が関与するかどうかをさらに検討するため、PI-3キナーゼの阻害剤wortmanninの効果を調べた。wortmannin存在下でPC12細胞にNGFを作用させると、細胞は増殖を続け (Fig. 10A)、突起は十分に伸長しなかった (Fig. 10B)。

すなわ

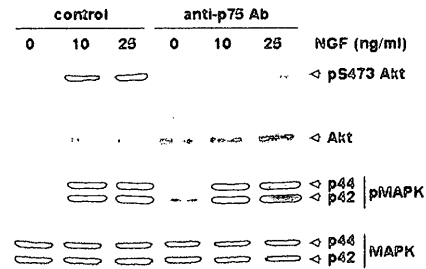


Fig. 11 Effect of repressing p75 function on phosphorylation of Akt.

Medium of PC12 cells was changed to serum-free, and the cells were pretreated with anti-p75 neutralizing antibody for 1hr before stimulation with NGF (0, 10, or 25 ng/ml) for 5 min. Phosphorylation of MAP kinase and Akt was analyzed as described in Fig. 8.

ち、Aktのリン酸化を抑制すると、PC12細胞はPC84細胞に類似の特性を示すようになった。この結果は、細胞増殖の停止にはPI-3キナーゼ/Aktの活性化が必要であることを示している。

次に、PI-3キナーゼ/Aktの活性化とp75の発現との関係を詳細に検討した。p75とNGFとの結合を抗p75抗体で阻害すると、NGFによる細胞増殖の停止が観察されなくなった (Fig. 7)。この時、抗p75抗体で処理した細胞ではNGFによるAktのリン酸化が減弱した (Fig. 11)。一方、MAPキナーゼのリン酸化は影響を受けなかった。また、抗p75抗体のかわりにマウスIgGで細胞を処理したときもAktのリン酸化は変化しなかった。以上の結果から、NGFはp75を介してAktのリン酸化を誘導し、PC12細胞の増殖を停止させることが示された。

以上、PC84細胞はp75の発現が減少しているため、NGFによるPI-3キナーゼ/Akt経路の活性化が起こらず、増殖が停止しないことが分かった。すなわち、NGFはp75を介してPI-3キナーゼ/Akt経路を活性化し、PC12細胞の増殖停止を引き起こしていると考えられる。NGFによるPC12細胞の分化誘導、特に増殖を調節する過程でp75が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。今後、p75を介したNGFシグナル伝達の役割を解明する上でPC84細胞は非常に有用なモデル細胞であると考えられる。

### 3. 神経幹細胞における塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス転写因子の発現調節を介したニューロトロフィンの神経分化促進作用

中枢神経系の神経幹細胞の未分化維持あるいは神経細胞やグリア細胞への分化は、いくつかの塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス (basic helix-loop-helix : bHLH) 転写因子により調節されていることが最近の研究により示された<sup>31, 32)</sup>。bHLH因子のうち、Mash1、Math1、neurogenin、NeuroDなどは神経細胞への分化を誘導する遺

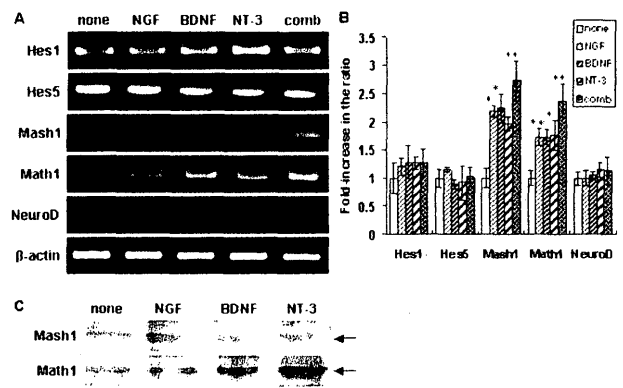
伝子の発現を活性化し<sup>32, 33</sup>、神経細胞への分化に対して促進的に作用する。一方、他の bHLH 因子である Hes1 や Hes5 は 直接 Mash1 遺伝子の発現を抑制するだけでなく、Mash1 タンパク質の転写活性を抑制しており<sup>34, 35</sup>、結果的に神経細胞への分化に対して抑制的に働いている。すなわち、Mash1, Math1 および Neurogenin と Hes1 および Hes5 の 2 つの異なるタイプの bHLH 因子群の発現がバランスよく制御されることによって正常に神経細胞が生成されると考えられる。しかし、これらの bHLH 因子群の発現や機能がどのような細胞内メカニズムで、どのような細胞外因子によって調節されるのか、ほとんど明らかになっていない。

脳が形成されつつある胎仔期の神経上皮組織や培養神経幹細胞にはニューロトロフィンファミリー分子とその受容体(Trk, p75)の発現が確認されている<sup>36-38</sup>ことから、ニューロトロフィンファミリーは神経幹細胞の分化過程になんらかの影響を与える因子と考えられている。実際に、NGF の神経前駆細胞に対する増殖促進<sup>39</sup>、BDNF の前脳脳室副周囲層 (subventricular zone) からの神経細胞の生成促進<sup>40</sup>、また、NT-3 の大脳皮質前駆細胞の神経分化誘導<sup>41</sup>といった神経幹細胞から神経細胞への分化方向を決定する作用が報告されている。一方、ニューロトロフィンは分化が決定された細胞が神経細胞へと成熟するのを単に促進するだけであること<sup>42</sup>、さらに、神経幹細胞に対する増殖因子が存在する場合は神経幹細胞に影響を与えないことも示されており<sup>36, 38</sup>、神経幹細胞に対するニューロトロフィンの作用に関して一貫した結論は得られていないというのが実状である。

そこで、培養神経幹細胞を用いて神経細胞への分化過程におけるニューロトロフィンの役割を bHLH 転写因子の発現との関連で検討した。

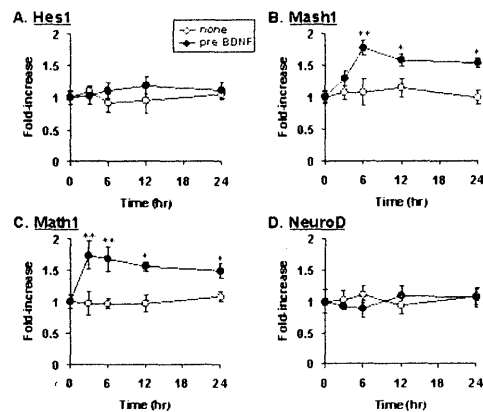
**bHLH 転写因子の mRNA 発現に及ぼすニューロトロフィンの影響**

はじめに、FGF-2 によって増殖中の神経幹細胞における 5 種類の bHLH 転写因子、Hes1、Hes5、Mash1、Math1、NeuroD の mRNA 発現に及ぼすニューロトロフィンの影響について検討した。Hes1 と Hes5 は神経幹細胞の増殖を維持し、分化を抑制する役割を担っていることが知られている<sup>43, 44</sup>が、ニューロトロフィンで処理しても mRNA レベルは変化しなかった (Fig. 12A, B)。しかし、神経細胞への分化を誘導する活性をもつ bHLH 因子である Mash1 と Math1 の mRNA はニューロトロフィン処理により有意に上昇した (Fig. 12A, B)。また、3 種類のニューロトロフィンを同時に処理すると上昇は最も大きくなることから、ニューロトロフィンによる多少の相加効果があると考えられた (Fig. 12B)。この mRNA 発現上昇をタンパク質の発現変化で確認するため、ウエスタンブロット解析を行っ



**Fig. 12 Effects of neurotrophins on the expression of bHLH transcription factor mRNAs.**

The cells were treated with vehicle (none), NGF, BDNF, NT-3 (100 ng/ml) or combined neurotrophins (100 ng/ml each) under growth conditions (in the presence of 10 ng/ml of FGF-2) for 3 days, and total RNAs were then prepared. A: Each total RNA was subjected to RT-PCR using primers specific for Hes1, Hes5, Mash1, Math1, NeuroD or  $\beta$ -actin, and each PCR product was applied to a 2% agarose gel containing ethidium bromide. B: The bands corresponding to target mRNA-derived cDNA were densitometrically quantified, and the ratio of the intensity of each bHLH factor band to that of the  $\beta$ -actin band (ratio of bHLH/ $\beta$ -actin) was calculated. The values are expressed as the means  $\pm$  S.E. of the fold-increase in the ratio of bHLH/ $\beta$ -actin, regarding the value of the vehicle-treated cells as 1.0. Significant differences from the value for the non-treated cells were determined by Tukey's test for each bHLH factor. Significance, \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ . C: Each cell lysate was subjected to SDS-gel electrophoresis (10%), blotted to a membrane, and reacted with anti-Mash1 or anti-Math1 antibody. All experiments were done three or four times.



**Fig. 13 Time-dependent changes of the expression of bHLH transcription factor mRNAs after BDNF treatment.**

Neural stem cells were cultured for the indicated times in the medium supplemented with FGF-2 alone (10 ng/ml) (open circle) or with FGF-2 (10 ng/ml) and BDNF (100 ng/ml) in combination (closed circle). Total RNAs were prepared from each culture, and an aliquot was subjected to RT-PCR using primers for Hes1 (A), Mash1 (B), Math1 (C), NeuroD (D) or  $\beta$ -actin. Then the PCR products were applied to a 2% agarose gel. The ratio of bHLH/ $\beta$ -actin was calculated for all samples as described in the legend of Fig. 12. The values are expressed as the means  $\pm$  S.E. of the fold-increase in the ratio of bHLH/ $\beta$ -actin, with the value of the cells immediately after BDNF treatment (0 hr) taken as 1.0. Significant differences from the value for the vehicle-treated cells were determined by Tukey's test for each bHLH factor. Significance, \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ . The experiments were done three times.

た結果、必ずしも mRNA 発現の程度とは一致しなかった

が、ニューロトロフィン処理による Mash1 と Math1 のタンパク質の上昇を確認することができた (Fig. 12C)。しかしながら、NeuroD の発現はどのニューロトロフィンを処理しても変化しなかった (Fig. 12B)。

次に、bHLH 転写因子群 mRNA 発現に及ぼす BDNF の作用を経時的に調べた (Fig. 13)。BDNF 処理 3 時間または 6 時間後にそれぞれ Math1 あるいは Mash1 の mRNA 発現の上昇はピークに達し、以後徐々に減少したが、BDNF 無処理のコントロール細胞と比較すると処理 24 時間後でも有意に高い発現を持続していた (Fig. 13B, C)。しかし、Hes1 と NeuroD の mRNA 発現は BDNF 処理後いずれの時間においても変化は認められなかったことから、bHLH 転写因子群 mRNA の発現に及ぼす BDNF の効果は Mash1 と Math1 に選択的であり、その発現誘導は早期に起こり、しかも持続的であることが明らかとなった。

### 神経幹細胞の分化に及ぼす BDNF の影響

神経幹細胞は FGF-2 などの増殖因子を含む増殖培地で培養すると未分化状態で増殖し、培地から増殖因子を除去すると一定の比率で神経細胞、アストロサイトあるいはオリゴデンドロサイトへと自然に分化していく。そこで、FGF-2 を除去する前に BDNF で処理した神経幹細胞からそれぞれの細胞に分化する割合を調べた (Table 1)。BDNF 無処理細胞と比較して BDNF 処理細胞では、FGF-2 除去後に MAP2 陽性細胞 (神経細胞) の割合が高くなるのに対し、GFAP 陽性細胞 (アストロサイト) の割合は有意に減少した。一方、ネスチン陽性細胞 (未分化細胞) あるいは Gal-C 陽性細胞 (オリゴデンドロサイト) の割合は、BDNF で処理しても変化しなかった。これらの結果より、BDNF を FGF-2 除去前に作用させることによって、神経細胞への分化が促進されると同時にアストロサイトへの分化が抑制されることが分かった。

**Table 1** Expression of differentiation markers after removal of FGF-2 in the neural stem cells treated with or without BDNF.

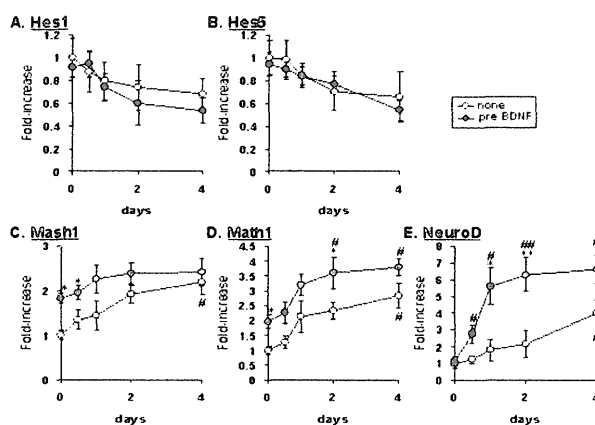
	nestin (n=6)	MAP2 (n=6)	GFAP (n=6)	Gal-C (n=6)
none	32.58 ± 2.20	19.96 ± 2.89	42.12 ± 4.54	5.68 ± 0.64
BDNF-pretreated	23.11 ± 3.92	55.04 ± 6.41 <sup>b</sup>	22.59 ± 2.48 <sup>a</sup>	3.87 ± 0.34

Dissociated neural stem cell suspensions were plated on coverslips coated with poly-L-ornithine. The cells were cultured for 3 days with FGF-2 (10 ng/ml) alone (none) or with FGF-2 (10 ng/ml) and BDNF (100 ng/ml) in combination (BDNF), then further cultured in the FGF-2- and BDNF-free medium for 6 days. The cells were fixed with paraformaldehyde solution, and then reacted with antibody against nestin, MAP2, GFAP or Gal-C. The percentage of the cells expressing each antigen was calculated in 15-20 arbitrarily selected fields. The values are presented as means ± S.E. of six coverslips cultured separately. Significance: <sup>a</sup>p<0.05 and <sup>b</sup>p<0.01 compared with the value for non-treated cells (none). Experiments were repeated three times, and typical results are presented.

### FGF-2 除去に伴う bHLH 転写因子の発現変化

Mash1 と Math1 は神経分化過程の初期に発現し、神経分化を促進することが報告されている<sup>45-47</sup>。そこで Mash1 や Math1 の発現と BDNF による神経分化作用との間になんらかの関連性があるものと考えられた。この関連性を検討するため、FGF-2 除去前に BDNF で処理し、その後 FGF-2 を除去した細胞について bHLH 転写因子の mRNA 発現変化を調べた。BDNF 無処理細胞では FGF-2 除去後、Hes1 と Hes5 の mRNA 発現が徐々に減少し、逆に、Mash1、Math1 および NeuroD の mRNA の発現は徐々に上昇した (Fig. 14)。BDNF 処理細胞では、無処理細胞と同様に、Hes1 と Hes5 の mRNA は徐々に減少した (Fig. 14A, B) が、Mash1 と Math1 の mRNA 発現は FGF-2 を除去した時点ですでに高値であり、BDNF 無処理細胞に対する発現の有意な上昇は Mash1 mRNA では FGF-2 除去 1 日後まで、Math1 mRNA のそれは 4 日後まで持続した (Fig. 14C, D)。一方、BDNF 処理細胞での NeuroD の mRNA の発現は BDNF 無処理細胞に比べてより早い時期から上昇し始め、かつその上昇の程度も高かった (Fig. 14E)。

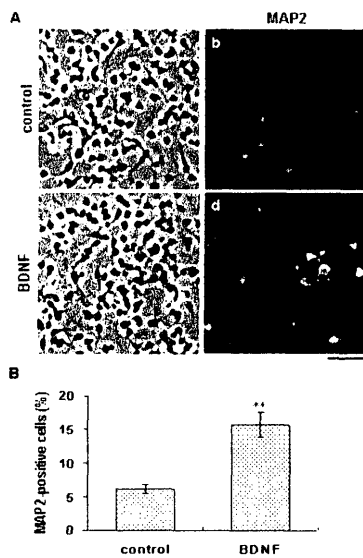
FGF-2 除去前に BDNF で処理された神経幹細胞では、Mash1 と Math1 mRNA 発現が上昇し、これによって FGF-2 除去後に起こる NeuroD の mRNA の発現が早まりかつ強くなることが分かった。すなわち、BDNF は Mash1 と Math1



**Fig. 14** Effects of BDNF-pretreatment on the changes in mRNA expression of bHLH transcription factors after FGF-2 withdrawal.

Neural stem cells were treated with FGF-2 alone (10 ng/ml) (open circle) or with FGF-2 (10 ng/ml) and BDNF (100 ng/ml) in combination (closed circle), then transferred to medium containing neither FGF-2 nor BDNF, and cultured for the indicated times. Total RNAs were prepared from each culture, and an aliquot was subjected to RT-PCR using primers for Hes1 (A), Hes5 (B), Mash1 (C), Math1 (D), NeuroD (E) or  $\beta$ -actin. Then the PCR products were applied to a 2% agarose gel. The ratio of bHLH/ $\beta$ -actin was calculated for all samples as described in the legend of Fig. 19. The values are expressed as the means ± S.E. of the fold-increase in the ratio of bHLH/ $\beta$ -actin, with the value of the cells immediately after FGF-2 removal (0 day) taken as 1.0. Significant differences from the value for the vehicle-treated cells (Student's t-test; \*), or from the value at 0 day (Tukey's test; #) were determined for each bHLH factor. Significance: <sup>\*</sup>p<0.05, <sup>\*\*</sup>p<0.01; #p<0.05, ##p<0.01. The experiments were repeated three times.





**Fig. 15 MAP2-expression after FGF-2 withdrawal hastened by BDNF-pretreatment.**

A: Neural stem cells were plated on coverslips coated with poly-L-ornithine. The cells were cultured with FGF-2 alone (a, b) or with FGF-2 and BDNF (c, d) for 3 days, then further cultured in the FGF-2- and BDNF-free medium for 1 days. The cells were then fixed, photographed under phase-contrast optics (a, c), and then stained with anti-MAP2 antibody (b, d). B: Percentage of the MAP2-expressing cells was calculated in 15-20 arbitrarily selected fields. The values are presented as the averages  $\pm$  S.E. of three independent experiments. Significance:  $**p < 0.01$ , when compared with the value for the non-treated cells. The experiments were repeated three times. Scale bar: 50  $\mu$ m.

の mRNA 発現の上昇を介して神経幹細胞から神経細胞への分化ステップを先へと推進する作用をもつと考えられる。そこで、神経幹細胞を FGF-2 のみ、あるいは FGF-2 と BDNF の共存下で 3 日間それぞれ培養した後に FGF-2 と BDNF を除去して 1 日後の MAP2 陽性細胞の割合を調べた。FGF-2 除去 1 日後という早期にもかかわらず、BDNF 処理細胞群には無処理細胞と比較して 2~3 倍もの MAP2 陽性細胞が観察された (Fig. 15)。すなわち、BDNF によって神経分化に要する時間が短縮されることが明らかとなった。言い換えれば、BDNF は神経幹細胞を神経細胞へと分化させるプライミング効果をもつことが示された。

以上のことより、ニューロトロフィンが神経幹細胞に働いて bHLH 転写因子 Mash1 と Math1 の発現を上昇させることを明らかにした。このことは bHLH 転写因子カスケードを神経分化の方向に推し進めることを意味しており、ニューロトロフィンは神経幹細胞の神経細胞への分化をプライミングする効果を有していると考えられた。

#### 4. ニューロトロフィンによる神経分化に先行する神経伝達物質合成酵素の発現誘導

分化・成熟した神経細胞は軸索を伸ばし、相互に連結し合って巨大な神経回路網を形成している。各々の神経細胞

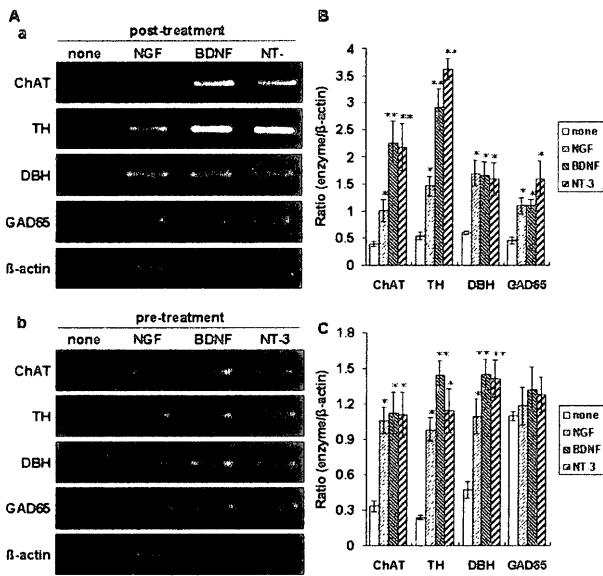
はシナプスを介して刺激を伝達し合い、複雑で多彩な高次機能を発揮する。シナプス間の刺激伝達は神経終末から遊離されるグルタミン酸、アセチルコリン、ドパミン、ノルアドレナリンなどの種々の神経伝達物質が担っている。神経細胞内で合成され、刺激によって神経終末から分泌される神経伝達物質は神経細胞のタイプごとに異なっており、その種類は神経細胞の特性や機能を決定する要因の一つとなっている。

ニューロトロフィンは領域特異的、表現型特異的に未分化神経細胞に作用し、神経伝達物質合成酵素を含めた種々の神経特異的遺伝子の発現を誘導することによって神経細胞を成熟させると考えられている<sup>48-50)</sup>。例えば、培養下において胎仔の前脳基底核の未分化コリン作動性神経細胞や中脳の未分化ドパミン作動性神経細胞はそれぞれ NGF および BDNF によりアセチルコリンの合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ (choline acetyltransferase : ChAT) や TH の発現が上昇するようになる<sup>51-54)</sup>。しかし、この作用は未分化神経細胞の分化・成熟の促進<sup>55)</sup>なのか、あるいは分化した神経細胞の生存維持<sup>40)</sup>なのかという議論の余地が残されている。さらに、神経細胞における神経伝達物質の選択にニューロトロフィンが直接関与しているかどうかという未解決の問題があり、神経分化に及ぼすニューロトロフィンの機能を考える上で重要な問題になっている。

そこで、神経伝達物質を生合成するいくつかの律速酵素の発現に対するニューロトロフィンの効果を未分化細胞として培養神経幹細胞を用いて検討した。律速酵素に ChAT、TH、ドパミン- $\beta$ -水酸化酵素 (dopamine beta hydroxylase : DBH) およびグルタミン酸脱炭酸酵素 (glutamate decarboxylase : GAD) 65 の 4 種類のあげ、その発現変化を解析した。

#### 分化誘導後の神経伝達物質合成酵素の発現

神経幹細胞が細胞分化する過程においてニューロトロフィンが神経伝達物質合成酵素の発現にどのように影響するか検討した。培地から FGF-2 を除去した後、個々のニューロトロフィンを添加して 7 日間培養した細胞 (ニューロトロフィン後処理細胞) について、ChAT、TH、DBH および GAD65 mRNA の発現を調べた。ChAT、TH、DBH、および GAD65 はそれぞれアセチルコリン、ドパミン、ノルアドレナリン、GABA の生合成酵素である。ニューロトロフィンで処理すると 4 種類の合成酵素の mRNA 発現が有意に上昇し (Fig. 16Aa, B)、ニューロトロフィンがコリン作動性、アドレナリン作動性あるいはドパミン作動性神経細胞の神経伝達物質合成酵素の発現を促進することが示された。次に、増殖条件下で維持した神経幹細胞における神経伝達物質合成酵素の発現に及ぼすニューロト



**Fig. 16** Effects of neurotrophins administered before or after FGF-2 removal on the mRNA expression of ChAT, TH, DBH, and GAD65 in differentiating neural stem cells.

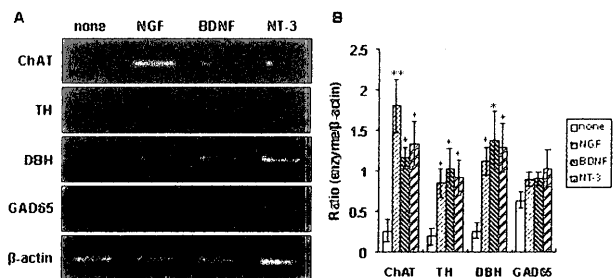
Neural stem cells were plated on poly-L-ornithine-coated dishes, and the dishes were then divided into two groups. The first group (post-treatment group) was cultured in the medium containing FGF-2 (10 ng/ml) (proliferation medium) for 3 days, and then in the FGF-2-free medium (differentiation medium) with or without each neurotrophin (NGF, BDNF or NT-3, 100 ng/ml) for 7 days. The second group (pre-treatment group) was cultured for 3 days in the proliferation medium with or without each neurotrophin (100 ng/ml), and then cultured for another 7 days in the differentiation medium containing neither FGF-2 nor neurotrophin. A: Total RNAs from the cells were subjected to RT-PCR using primers specific for ChAT, TH, DBH, GAD65, and  $\beta$ -actin. The PCR products were electrophoresed in 2 % agarose gels, and the gels were then stained with ethidium bromide. The intensity of the target band was densitometrically quantified, and the ratio of the intensity of target enzyme band to that of the  $\beta$ -actin band (ratio of enzyme/ $\beta$ -actin) was calculated for post-treated (B) and pre-treated (C) cells. The values are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of the ratio of enzyme/ $\beta$ -actin. Significance of differences from the values of non-treated cells (none) was determined by Tukey's test for each enzyme. Significance, \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01.

ロフィンの効果を調べるため、FGF-2 を含む培地にニューロトロフィンを添加して、その後 FGF-2 とニューロトロフィンを除去して7日間培養した細胞(ニューロトロフィン前処理細胞)について合成酵素の mRNA の発現について検討した。この条件下においても ChAT、TH、DBH の mRNA は用いた3種類すべてのニューロトロフィンによって有意に上昇したが、GAD65 mRNA の発現は変化しなかった (Fig. 16Ab, C)。この結果から得られた最も重要な点は、増殖性と多分化能を保持する神経幹細胞に対してニューロトロフィンが作用し、FGF-2 除去後に ChAT、TH、DBH の発現を高めたことである。すなわち、神経伝

達物質合成酵素の発現は神経分化以前にその引き金が引かれていることを意味している。

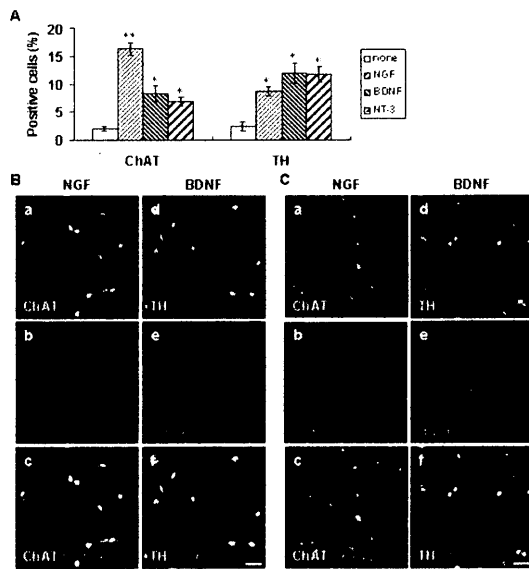
#### 未分化神経幹細胞での神経伝達物質合成酵素の発現変化

神経幹細胞を FGF-2 存在下でニューロトロフィン処理すると、FGF-2 除去後に ChAT、TH、DBH の mRNA 発現が上昇することが分かったが、ニューロトロフィンではなく FGF-2 の除去による作用とも考えられる。そこで FGF-2 の持続的存在下で解析した。NGF、BDNF、NT-3 はいずれも ChAT、TH、DBH の mRNA 発現を上昇させたが、GAD65 の mRNA 発現には影響しなかった (Fig. 17)。NGF による ChAT の mRNA 発現の程度は BDNF、NT-3 の作用と比較して高かったが、TH、DBH の発現には3種類のニューロトロフィンに違いはみられなかった (Fig. 17B)。免疫染色による解析を行った結果、いずれのニューロトロフィンでも ChAT あるいは TH 陽性細胞数の増加が観察された (Fig. 18A)。NGF で処理した細胞の方が BDNF および NT-3 を処理した細胞より ChAT 陽性細胞数の上昇が顕著であり、TH 陽性細胞数の増加はこの逆の傾向がみられた (Fig. 18A)。NGF あるいは BDNF によって誘導された ChAT および TH 陽性細胞は、ネスチンを共発現していたが (Fig. 18B)、MAP2 および GFAP は発現していなかった (結果は提示せず)。この結果は、神経幹細胞に神経分化を特徴づける神経伝達物質合成酵素が誘導されたことを示している。さらに、細胞が本当に神経幹細胞であることを確認するため、合成酵素を発現する細胞が増殖能をもつかどうかを解析した。増殖する細胞は DNA 合成を行うのでヌクレオチドアナログである BrdU を取り込むことを利用し、培地中に添加して増殖中の細胞を標識した。その結果、ほとんどの ChAT または TH 陽性細胞は BrdU 陽性で



**Fig. 17** Effects of neurotrophins on the expression of ChAT, TH, DBH, and GAD65 mRNAs in proliferating neural stem cells.

A: Neural stem cells were cultured for 3 days with or without NGF, BDNF or NT-3 (100 ng/ml) in the proliferation medium. An aliquot of total RNAs from each dish was subjected to RT-PCR, and the PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. The gels were stained with ethidium bromide. B: The ratio of the intensity of the target enzyme band to that of  $\beta$ -actin band was calculated. The values are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of the ratio of enzyme/ $\beta$ -actin. Significance of differences from the values of the non-treated cells was determined by Tukey's test. Significance, \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01.



**Fig. 18 Effect of neurotrophins on the expression of ChAT, TH, and nestin proteins in proliferating neural stem cells.**

Dissociated neural stem cells were cultured, and treated similarly as described in the legend of Fig. 17. The fixed cells were reacted with antibody against ChAT, TH or nestin, and visualized with fluorescein-5-isothiocyanate-conjugated anti-rabbit or anti-goat IgG, or rhodamine-conjugated anti-mouse IgG. For testing the incorporation of BrdU, the cells were incubated with 10  $\mu$ M BrdU for 3 hr followed by cell fixation. The fixed cells were subsequently reacted with anti-BrdU antibody and Alexa Fluor 546-conjugated anti-sheep IgG antibody. A: The percentage of the cells expressing ChAT or TH was calculated in 15-20 arbitrarily selected fields. The values are presented as means  $\pm$  S.E. of three coverslips cultured separately. Significance: \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01 compared with the value for non-treated cells (none). B: Photographic images double-immunostained with nestin and ChAT or TH of NGF-treated cells (a-c) and BDNF-treated cells (d-f) are shown. Green color is for ChAT (a) or TH (d), red color, for nestin (b, e), and yellow color, merged images (c, f). Scale bar: 50  $\mu$ m. C: Photographic images double-immunostained with BrdU and ChAT or TH of NGF-treated cells (a-c) and BDNF-treated cells (d-f) are shown. Green color is for ChAT (a) or TH (d), red color, for BrdU (b, e), and yellow color, merged images (c, f). Scale bar: 50  $\mu$ m. These experiments were repeated three times.

あり、増殖性を保持する細胞であることが分かった (Fig. 18C)。

以上の結果より、ニューロトロフィンが増殖中の未分化神経幹細胞に対して ChAT、TH の発現を誘導することが判明し、ニューロトロフィンをはじめとする種々の成長因子や神経栄養因子を使って、神経幹細胞から治療にあった表現型をもつ神経細胞を大量に調製する技術の確立に大きく寄与するものと考えられる。

### 5. 総括

本研究結果から、神経分化過程において、NGF が p75

を介して PI-3 キナーゼ/Akt 経路を活性化し、PC12 細胞の増殖停止を誘導すること、ニューロトロフィンが神経幹細胞から神経細胞への分化をプライミングする効果をもつことを明らかにした。これまで、ニューロトロフィンの作用に関する研究は神経分化の後期過程に集中してなされてきたが、本研究で得られた知見は、ニューロトロフィンが神経分化の初期過程の制御にも深く関わっていることを示している。近年、神経疾患などで失われた神経細胞を神経幹細胞によって補充、再生しようとする試みが成されつつある。しかし、この夢の治療を実現するには神経幹細胞の分化を制御する機構の解明が不可欠である。本研究の成果はニューロトロフィンの役割を大きくクローズアップするものであり、神経分化機構の解明の糸口になるものと期待される。

### 6. 謝辞

本総説に記述した研究は岐阜薬科大学分子生物学教室で行われたものであり、研究の遂行にあたり終始御懇篤なる御指導御鞭撻を賜りました恩師古川昭栄教授ならびに同教室の各位に深甚なる謝意を表します。

### 7. 参考文献

- 1) Levitt, P., Cooper, M.L., Rakic, P. *J. Neurosci.* **1**, 27-39 (1981).
- 2) McKay, R. *Science* **276**, 66-71 (1997).
- 3) Barde, Y.A. *Neuron* **2**, 1525-1534 (1989).
- 4) Wright, E.M., Vogel, K.S., Davies, A.M. *Neuron* **9**, 139-150 (1992).
- 5) Frade, J.M., Barde, Y.A. *Development* **126**, 683-690 (1999).
- 6) Levi-Montalcini, R., Hamburger, V. *J. Exp. Zool.* **116**, 321-362 (1951).
- 7) Barde, Y.A., Edgar, D., Thoenen, H. *EMBO J.* **1**, 549-553 (1982).
- 8) Hohn, A.L., Leibrock, J., Bailey, K., Barde, Y.A. *Nature* **344**, 339-341 (1990).
- 9) Berkemeier, L.R., Winslow, J.W., Kaplan, D.R., Nikolics, K., Goeddel, D.V., Posenthal, A. *Neuron* **7**, 857-866 (1991).
- 10) Ip, N.Y., Ibanez, C.F., Nye, S.H., McClain, J., Jones, P.F., Gies, D.R., Belluscio, L., Le Beau, M.M., Espinosa, R., Squinto, S.P., Persson, H., Yancopoulos, G.D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 3060-3064 (1992).
- 11) Martin-Zanca, D., Hugges, S.H., Barbacid, M. *Nature* **319**, 743-748 (1986).
- 12) Klein, R., Parada, L.F., Coulier, F., Barbacid, M. *EMBO J.* **8**, 3701-3709 (1989).
- 13) Lamballe, F., Klein, R., Barbacid, M. *Cell* **66**, 96 7-979 (1991).

- 14) Kaplan, D.R., Stevens, R.M. *J. Neurobiol.* 25, 1404-1417 (1994).
- 15) Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C.R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M., Chao, M. *Cell* 47, 545-554 (1986).
- 16) Rodriguez-Tebar, A., Dechant, G., Barde, Y.A. *Neuron* 4, 487-492 (1992).
- 17) Greene, L.A., Tischler, A.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 2424-2428 (1976).
- 18) Greene, L.A., Kaplan, D.R. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 579-587 (1995).
- 19) Friedman, W.J., Greene, L.A. *Cell Res.* 253, 131-142 (1999).
- 20) Barrett, G.L., Bartlett, P.F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 6501-6505 (1994).
- 21) Casaccia-Bonnel, P., Carter, B.D., Dobrowsky, R.T., Chao M.V. *Nature* 383, 716-719 (1996).
- 22) Brann, A.B., Scott, R., Neuberger, Y., Abulafia, D., Boldin, S., Fainzilber, M., Futerman, A.H. *J. Neurosci.* 19, 8199-8206 (1999).
- 23) Kimpinski, K., Jelinski, S., Mearow, K. *Neuroscience* 93, 253-263 (1999).
- 24) Kume, T., Nishikawa, H., Tomioka, H., Katsuki, H., Akaike, A., Kaneko, S., Maeda, T., Kihara, T., Shimohama, S. *Brain Res.* 852, 279-289 (2000).
- 25) Barker, P.A., Shooter, E.M. *Neuron* 13, 203-215 (1994).
- 26) Hatanaka, H. *Brain Res.* 222, 225-233 (1981).
- 27) Green, S.H., Rydel, R.E., Connolly, J.L., Greene, L.A. *J. Cel. Biol.* 102, 830-843 (1986).
- 28) Leoni, C., Menegon, A., Benfenati, F., Toniolo, D., Pennuto, M., Valtorta, F. *Mol. Biol. Cell* 10, 2919-2931 (1999).
- 29) Nomoto, H., Tomotoshi, K., Ito, H., Furukawa, S. *J. Neurosci. Res.* 59, 632-642 (2000).
- 30) Kaplan, D.R., Miller, F.D. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 381-391 (2000).
- 31) Kageyama, R., Nakanishi, S. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 659-665 (1997).
- 32) Lee, J.E. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 13-20 (1997).
- 33) Guillemot, F., Joyner, A.L. *Mech. Dev.* 42, 171-185 (1993).
- 34) Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R., Nakanishi, S. *Genes Dev.* 6, 2620-2634 (1992).
- 35) Akazawa, C., Sasai, Y., Nakanishi, S., Kageyama, R. *J. Biol. Chem.* 267, 21879-21885 (1992).
- 36) Lachyankar, M.B., Condon, P.J., Quesenberry, P.J., Litofsky, N.S., Recht, L.D., Ross, A.H. *Exp. Neurology* 144, 350-360 (1997).
- 37) Fukumitsu, H., Furukawa, Y., Tsusaka, M., Kinukawa, H., Nitta, A., Nomoto, H., Mima, T., Furukawa, S. *Neuroscience* 84, 115-127 (1998).
- 38) Benoit, B.O., Savarese, T., Joly, M., Engstrom, C.M., Pang, L., Reilly, J., Recht, L.D., Ross, A.H., Quesenberry, P.J. *J. Neurobiol.* 46, 265-280 (2001).
- 39) Cattaneo, E., McKay, R. *Nature* 347, 762-765 (1990).
- 40) Kirschenbaum, B., Goldman, S.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 210-214 (1995).
- 41) Ghosh, A., Greenberg, M.E. *Neuron* 15, 89-103 (1995).
- 42) Takahashi, J., Palmer, T.D., Gage, F.H. *J. Neurobiol.* 38, 65-81 (1999).
- 43) Ishibashi, M., Moriyoshi, K., Sasai, Y., Shiota, K., Nakanishi, S., Kageyama, R. *EMBO J.* 15, 1799-1805 (1994).
- 44) Ohtsuka, T., Sakumoto, M., Guillemot, F., Kageyama, R. *J. Biol. Chem.* 276, 30467-30474 (2001).
- 45) Ben-Arie, N., Bellen, H.J., Armstrong, D.L., McCall, A.E., Gordadze, P.R., Guo, Q., Matzuk, M.M., Zoghbi, H.Y. *Nature* 390, 169-172 (1997).
- 46) Casarosa, S., Fode, C., Guillemot, F. *Development* 126, 525-534 (1999).
- 47) Nieto, M., Schuurmans, C., Britz, O., Guillemot, F. *Neuron* 29, 401-413 (2001).
- 48) Snider, W.D. *Cell* 77, 627-638 (1994).
- 49) Birling, M.C., Price, J. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 878-884 (1995).
- 50) Henderson, C.E. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 64-70 (1996).
- 51) Hartikka, J., Hefti, F. *J. Neurosci. Res.* 21, 352-364 (1988).
- 52) Lorenzi, M.V., Knusel, B., Hefti, F. *Neurosci. Lett.* 140, 185-188 (1992).
- 53) Zhou, J., Bradford, H.F., Stern, G.M. *Brain Res.* 656, 147-156 (1994).
- 54) Spenger, C., Hyman, C., Studer, L., Egli, M., Evtouchenko, L., Jackson, C., Dahl-Jorgensen, A., Lindsay, R.M., Seiler, R.W. *Exp. Neurol.* 133, 50-63 (1995).
- 55) Ahmed, S., Reynolds, B.A., Weiss, S. *J. Neurosci.* 15, 5765-5778 (1995).

\* 本総説は岐阜薬科大学博士論文（甲 第 88 号）の内容を中心にまとめたものである。