

## ***In vivo* における成体マウス脳室下帯への EGF直接投与が神経幹細胞や神経前駆細胞に 及ぼす影響**

S.A. Louis<sup>1</sup>, R.E. Wagey<sup>1</sup>, R.L. Rietze<sup>3</sup>, T.E. Thomas<sup>1</sup>, A.C. Eaves<sup>2</sup> and B.A. Reynolds<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> StemCell Technologies Inc., <sup>2</sup> Terry Fox Laboratory, BC Cancer Agency, Vancouver, Canada and

<sup>3</sup> University of Queensland, Queensland Brain Institute, Brisbane, Australia

### ● 序 文

最近報告された、神経コロニー形成細胞 (Neural Colony Forming Cell, NCFC) 法と呼ばれるシングルステップの培養アッセイ (Louis et al., 2004, abstract Soc. for Neuroscience) では、神経前駆細胞と神経幹細胞 (NSC) との区別が可能であるため、ニューロスフェア法 (NA) よりも正確にNSCの存在比率を計測することができます。NCFC法では、コロニーの大きさが増殖能の指標となっています。直径が2mmを超えるコロニーの細胞は、長期間にわたる自己複製能を有し、多数の前駆細胞を生みだし、多分化能を維持しています。このことから、直径2mmを超えるコロニーを形成する細胞はNCFC-NSCと呼ばれます。直径が2mm以下のコロニーの細胞には、長期的な自己複製能がなく、前駆細胞から生じたものと考えられます。NCFC法では、成体マウス脳室下帯 (SVZ) におけるNCFC-NSCの存在比率は $0.016 \pm 0.01\%$  (平均±標準誤差) と見積もられています。

SVZにはNSCが存在することはすでに知られています。しかし、この領域内に存在する複数の異なる細胞種のうち、どの細胞種が *in vitro* でニューロスフェアを形成して幹細胞として機能するかに関しては議論の余地があります。私たちは以前、現在利用されているニューロスフェア法 (NA) では、NSCと前駆細胞を区別できないことが原因で成体脳におけるNSCの存在比率が1桁過大評価されると報告しました (Adams et al., 2004 abstract Soc. for Neuroscience)。そこで本研究では、NCFC法を利用してNSCの存在比率を正確に計測し、*in vivo* におけるEGF (Craig et al., 1996; Doetsch et al., 2002) および有糸分裂阻害剤Ara-C (Doetsch et al. 1999) の投与が成体SVZ領域のNSCに及ぼす影響を明らかにしました。

● 方法

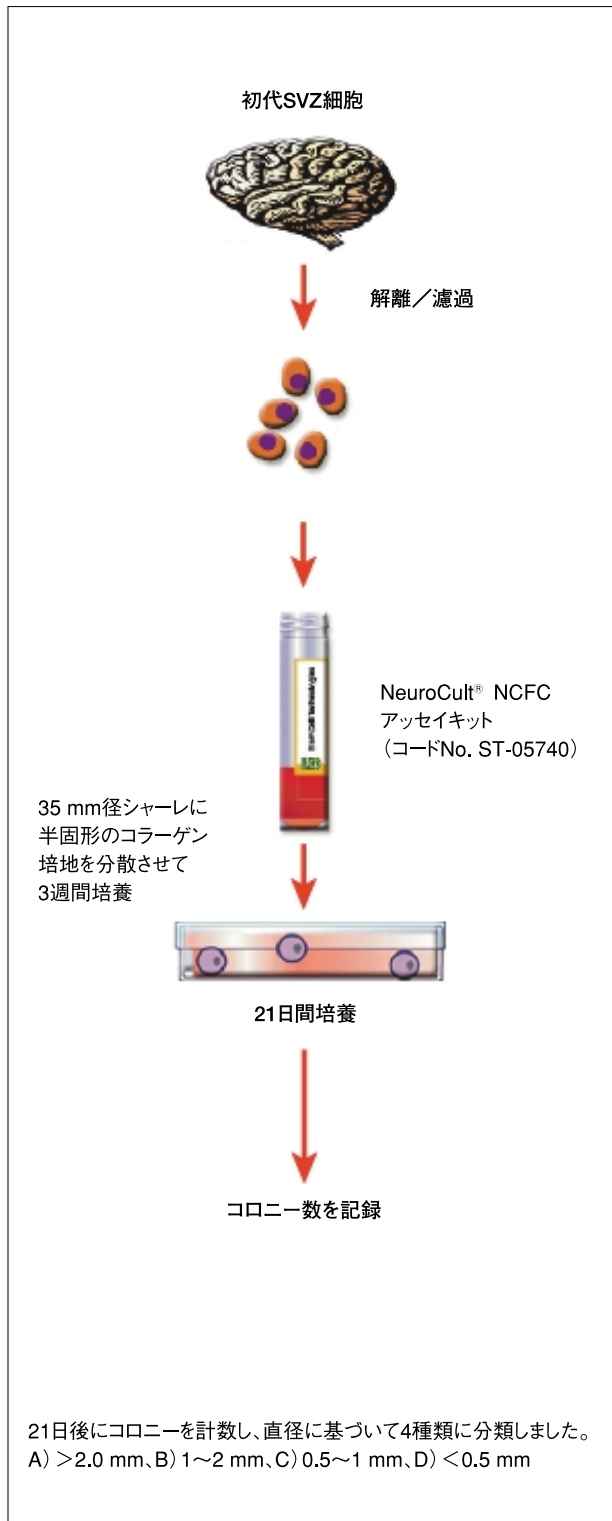


図1. 神経コロニー形成細胞 (NCFC) 法の手順

● 結果

I. NCFC法

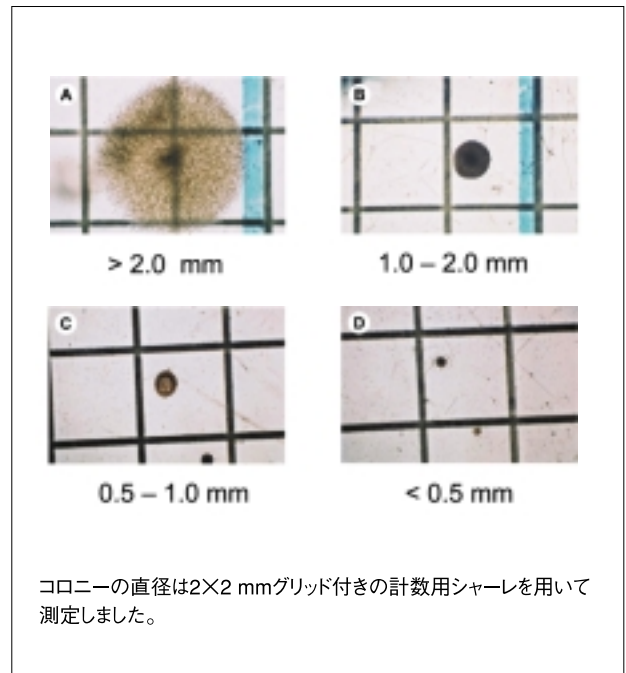


図2. NCFC法におけるコロニーのサイズ種別

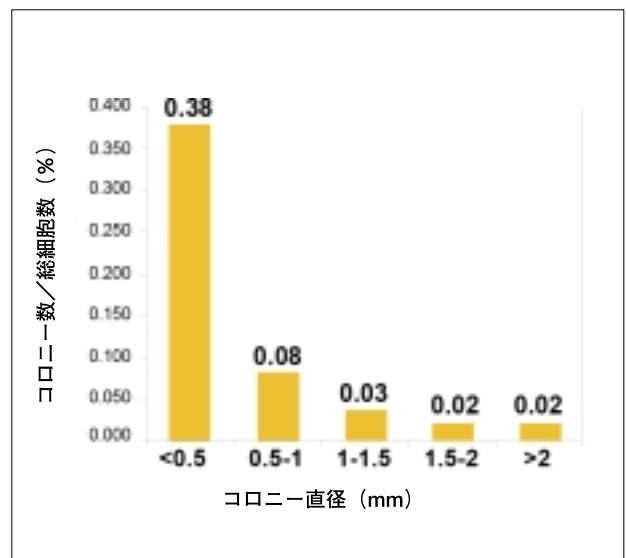


図3. 成体SVZにおけるNCFC-NSCの存在比率

- NCFC-NSC (直径が2mmを超えるコロニーを形成する細胞)の存在比率は0.016±0.01% (平均±標準誤差、n=12)です。

### 新規コロニー形成培養法による神経幹細胞および神経前駆細胞の識別

Louis, SA, Wagey, R, Thomas, TE, Eaves, AC and Reynolds, BA. 2004. Abstract; Society for Neuroscience, 2004. Online.

直径2mmを超えるコロニーを形成する細胞はNCFC-NSCと呼ばれます。NCFC-NSCには次の性質があります。

- 長期間にわたる自己複製能
- 多数の子孫細胞の産生
- 多分化能の維持

直径が2mm以下のコロニーは神経前駆細胞から生じます。

## II. EGFおよびAra-Cの投与がSVZ中の神経幹細胞および神経前駆細胞に及ぼす影響

成体マウスSVZから分離された幹細胞の大多数が分裂の速い前駆細胞群に由来するものであること、また、*in vitro*においてEGFがこの種の細胞を幹細胞に転換しうることが報告されており (Doetsch et al. 2002)、このことはGrittiら (1999) によっても裏付けられています。これらの結果はそれまでの報告とは相反するものであり、幹細胞は比較的休止状態にある細胞からなる稀少な細胞群であるという一般的な見解 (Morshead et al, 1990, Morshead and van der Kooy, 2004) とも反しています。Doetschらの研究ではNSCの計測にNA法が用いられていました。つまり、NA法では幹細胞と前駆細胞を区別することができないために細胞数の計測値が誤って解釈され、そのため問題となる結果が報告されたのではないかと私たちは考えています。

SVZにおける幹細胞の動態、およびEGF投与に対する幹細胞の応答に関する問題に取り組むため、次のような実験を実施しました。

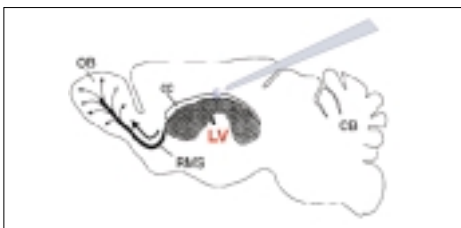


図4.

### (1) EGFの脳室内投与 (7日間)

成体マウスの脳内にEGFを7日間にわたって投与しました。7日後、マウスを殺処理してSVZ領域を解剖しました。

### (2) Ara-Cの脳室内投与 (3日間)

成体マウスの脳内にAra-Cを3日間にわたって投与しました。3日後、マウスを殺処理してSVZ領域を解剖しました。

私たちは、SVZ中の増殖細胞数の増加 (EGF投与による) または減少 (Ara-C投与による) は、内因性の幹細胞群には影響しないであろうという仮説を立てました。

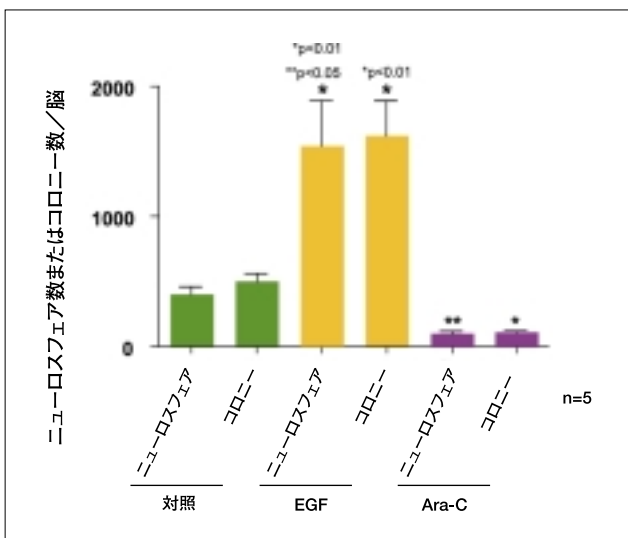


図5. NA法におけるニューロスフェア数およびNCFC法におけるコロニー数

- EGF投与により、ニューロスフェアおよびコロニーの総数は対照と比較して有意に増加しました。
- Ara-C投与により、ニューロスフェアおよびコロニーの総数は対照と比較して有意に減少しました。

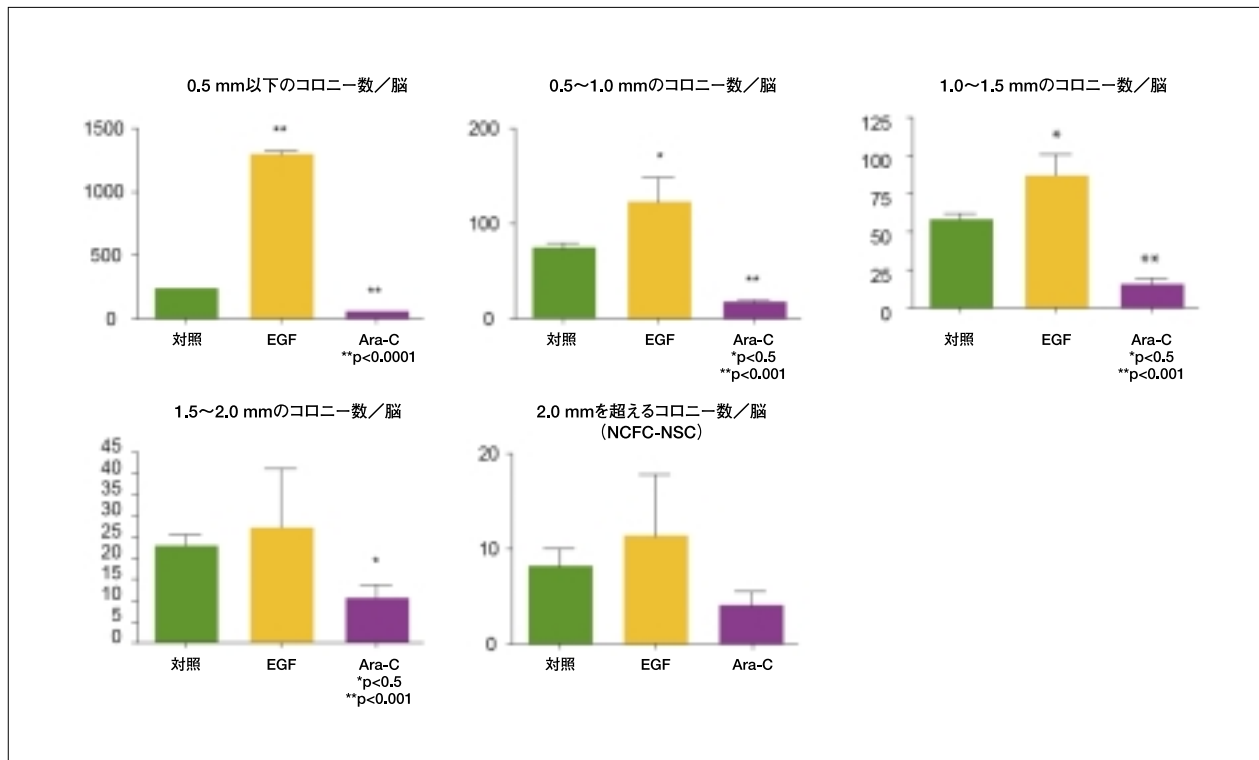


図6. EGFの投与およびAra-Cの殺細胞作用がコロニー形成細胞数に及ぼす影響

NSCまたは前駆細胞の数は次式により求めました。

[コロニー種別ごとのコロニー数/総コロニー数]×100%×脳1個あたりの総コロニー数 (平均±標準誤差)

- EGFは、直径1.5mm以下のコロニー数を有意に増加させましたが、2.0mmを超えるコロニー数（NCFC-NSC数）には影響しませんでした。
- Ara-Cは、直径2.0mm以下のコロニー数を有意に減少させましたが、2.0mmを超えるコロニー数には有意な影響を及ぼしませんでした。

### ●まとめ

- 7日間にわたってEGFを側脳室に投与すると、前駆細胞数は増加しましたが、幹細胞群への有意な影響は認められませんでした。
- 3日間にわたってAra-Cを投与すると、SVZ中の前駆細胞数は有意に減少しましたが、*in vitro*において分離可能な幹細胞の数への影響はありませんでした。

### ●結論

本研究の結果は、成体マウスSVZに含まれる内因性の幹細胞群は比較的稀少で休止状態にある細胞群であり、EGFが前駆細胞を幹細胞に転換することはないという仮説を裏付けるものです。

このニュースレターは、StemCell社のTechnical Bulletinを和訳したものです。  
原文は下記サイトからご覧いただけます。  
<http://www.stemcell.com/technical/bulletins.asp>  
あわせてご参照ください。

株式会社

**ベリタス**

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル  
TEL.03-3593-3211 (代) FAX.03-3593-3216  
E-mail: veritas@veritastk.co.jp  
<http://www.veritastk.co.jp/>