

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：81603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K18889

研究課題名（和文）小胞体ストレスによる神経細胞移動・突起伸長抑制に対する分子薬理学的解析

研究課題名（英文）Molecular pharmacological analysis of endoplasmic reticulum stress-induced inhibition of neuronal migration and neurite outgrowth.

研究代表者

齋藤 僚 (Saito, Ryo)

一般財団法人脳神経疾患研究所・先端医療研究センター・研究員

研究者番号：30732846

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：レチノイン酸（ATRA）による神経分化誘導モデルを用いて、小胞体ストレスによる神経突起伸長および神経細胞移動への影響を検討した。持続的なストレス負荷によってATRA刺激に伴う神経突起伸長や神経細胞移動が有意に抑制された。また、p38-MAPK経路の活性抑制やectodermal-neural cortex 1の発現低下も認められ、同シグナル経路の活性低下が小胞体ストレスに伴う神経突起伸長および神経細胞移動の抑制に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、小胞体の機能異常やエピジェネティックな遺伝子発現の制御異常が精神神経疾患の発症に関与することが示されている。本研究により、p38-MAPK経路の活性低下が小胞体ストレスに伴う神経突起伸長抑制および神経細胞移動抑制の一因であることが示された。また、DNAメチル化解析により、神経分化もしくは神経突起伸長に関連する遺伝子のメチル化/脱メチル化領域が見出された。すなわち、小胞体ストレスによってエピジェネティック異常が生じ、これらが疾患発症にも寄与する可能性が示された。本研究成果は、精神神経疾患に対する新たな治療戦略確立の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Using a model of all-trans retinoic acid (ATRA)-induced neuronal differentiation, we investigated the effects of endoplasmic reticulum (ER) stress on neurite outgrowth and neuronal migration. Sustained stress loading significantly inhibited ATRA-induced neurite outgrowth and neuronal migration. In addition, downregulation of p38-MAP kinase pathway and ectodermal-neural cortex 1 gene expression were also observed, suggesting that downregulation of this signaling pathway may contribute to the ER stress-induced inhibition of neurite outgrowth and neuronal migration.

研究分野：神経薬理学

キーワード：小胞体ストレス 神経突起伸長 MAPK シグナル伝達 エピジェネティクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経回路形成の異常による脳形成障害の中には難治性疾患が数多く存在し、重度の精神運動発達遅滞を呈することが知られている。また、これら稀少難治性疾患の発症原因は多岐に渡り、根本的な治療法が確立されていない点は大きな課題として残されている。近年、小胞体の機能異常や、DNA塩基配列の変化を伴わないエピジェネティックな遺伝子発現制御の異常が精神神経疾患の発症に関与することが示唆された。また、小胞体ストレスに対する細胞内応答（小胞体ストレス応答）は、細胞周期、神経機能、代謝および免疫応答など、種々の生命現象においても普遍的に関わっていることが報告されており、同応答機構の異常は、細胞内の恒常性を破綻させ、精神疾患や代謝性疾患、自己免疫疾患の一因となることが示されている。

研究代表者らは、これまでのマウス胚性腫瘍 P19 細胞を用いた神経分化誘導モデルでの解析を通じて、持続的な小胞体ストレス負荷が神経幹細胞の分化系譜に影響を与えることを見出している (*J Neurosci Res.* 2014; 92: 1122-33)。すなわち、神経幹細胞に対する小胞体ストレス負荷によって神経細胞への分化が促進される一方で、神経突起伸長の抑制など、神経成熟過程での異常が生じることを明らかにした。また、神経細胞の移動は、¹⁾先導突起の伸長、²⁾核・細胞質の移動、³⁾後方突起の退縮といった 3 種類の過程を繰り返すことが知られており、各段階における分子機構の異常は神経細胞の移動を障害する。したがって、上述の小胞体ストレスによる神経突起伸長の抑制は、神経細胞移動などの細胞動態にも影響を与えることで、神経回路形成を障害することが推察される。一方、小胞体ストレス下におけるエピジェネティクス研究は広く実施されておらず、精神神経疾患におけるエピジェネティクス異常と小胞体ストレスとを直接的に関連付ける分子機構の究明が望まれている。

2. 研究の目的

近年、疾患特異的 iPS 細胞を活用したエピゲノム解析や疾患責任遺伝子の同定および生理機能の解明に向けた研究が精力的に行われているが、疾患発症における環境的要因とエピジェネティクス異常との関連は不明な点が多い。本研究では、稀少難治性疾患の環境的要因として小胞体ストレスに着目し、精神神経疾患におけるエピジェネティクス異常との関連を解明することを目的とした。特に、小胞体ストレスによる神経突起の伸長抑制機序および神経細胞動態への影響を解析するとともに、同機序および細胞動態に関連するエピジェネティクス変化の解明を目指した。

3. 研究の方法

- (1) **レチノイン酸による神経分化誘導モデルを用いた神経突起伸長に対する小胞体ストレスの影響**：ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞はレチノイン酸 (ATRA) 刺激に応じて神経突起を伸長させることが知られている。同細胞を 1.4×10^4 cells/cm² の密度で播種した後、1% FBS、10 μ M ATRA および 10 ng/mL ツニカマイシン (Tm: 小胞体ストレス誘導試薬) を含む培地で 3 日間の培養を行なった。各細胞の神経突起伸長は画像解析ソフトウェア NeuronJ を用いて測定した。
- (2) **Wound healing assay による神経細胞移動の解析と小胞体ストレスによる影響**：SH-SY5Y 細胞を 1.0×10^5 cells/cm² の密度で播種した後、1% FBS および 10 ng/mL Tm を含む培地中で単細胞層を形成させた。その後、ピペットチップで溝を作成し、10 μ M ATRA 刺激による神経細胞移動の誘導を行った。48 時間までの経過観察後、細胞移動に伴う溝の閉塞幅を画像解析ソフトウェア ImageJ を用いて測定した。
- (3) **小胞体ストレスによる神経突起伸長の抑制に関わる細胞内シグナル経路の同定**：SH-SY5Y 細胞を種々の条件下で培養後、総タンパク質および総 RNA の抽出を行った。各サンプルはウェスタンブロット法および RT-PCR 法を用いて解析し、タンパク質リン酸化および遺伝子発現量をそれぞれ評価した。
- (4) **小胞体ストレスに伴う DNA メチル化/脱メチル化領域の解析**：SH-SY5Y 細胞を小胞体ストレス誘導試薬存在下もしくは非存在下で培養を行った後、抽出したゲノム DNA に対して次世代シーケンサーによるメチル化解析を実施した。DNA メチル化解析によって得られた実験データ (領域リスト) は、遺伝子機能解析ツールを用いて関連遺伝子に対する遺伝子オントロジー (GO) 解析を行った。

4. 研究成果

- (1) **レチノイン酸による神経分化誘導モデルを用いた神経突起伸長に対する小胞体ストレスの影響**：神経細胞の成熟過程における小胞体ストレスの影響を検討するため、新たにヒト神経芽細胞腫での神経分化誘導モデルの確立を行った。ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に対して 10 μ M のレチノイン酸 (ATRA) を添加することで、神経突起の有意な伸長が認められた。一方、ATRA による神経突起伸長の促進は、10 ng/mL ツニカマイシン (Tm) 存在下で有意に抑制された。したがって、本神経分化誘導モデルにおいても、小胞体ストレスに伴う神経突起伸長の抑制は再現されることが示された。
- (2) **Wound healing assay による神経細胞移動の解析と小胞体ストレスによる影響**：小胞体ストレス下における神経細胞移動への影響を検討するため、SH-SY5Y 細胞を用いた Wound healing assay を実施した。培養細胞単層に一定幅の創傷を作成後、ATRA 刺激による神経

細胞移動の誘導を行った結果、ATRA 刺激後 36 時間以降に創傷エリアへの神経細胞の移動が認められた。また、同条件下において WST-8 assay および BrdU cell proliferation assay を実施し、試薬添加に伴う細胞増殖能への影響を検証した結果、ATRA 刺激に伴う細胞増殖の促進は認められず、創傷の閉塞は細胞増殖非依存的であることが示された。一方、同条件下において小胞体ストレスの影響を検討した結果、10 ng/mL Tm によって神経細胞移動が有意に抑制されることが明らかになった。

- (3) **小胞体ストレスによる神経突起伸長の抑制に関わる細胞内シグナル経路の同定**：小胞体ストレスによる神経突起伸長抑制機序の解明を目指し、ウエスタンブロット法を用いて細胞内シグナル経路の解析を実施した。その結果、ATRA 刺激によって Erk、JNK、p38-MAPK および Akt のリン酸化が促進し、ATRA 誘導性の p38-MAPK および Akt の活性化は、10 ng/mL Tm によって抑制されることが明らかになった。続いて、神経突起伸長関連遺伝子に対する小胞体ストレスの影響を検討した結果、Tm 濃度依存的に ectodermal-neural cortex 1 (ENC1) の mRNA 量が減少することが明らかになった。さらに、10 ng/mL Tm による ATRA 誘導性の p38-MAPK および Akt の活性抑制と ENC1-mRNA の発現量低下との関連性を検討するため、各種細胞内シグナル阻害剤を用いて ENC1-mRNA の減少機序に関与するシグナル経路を解析した結果、PD169316 (p38-MAPK 阻害剤) によって ENC1-mRNA の発現量が有意に減少することが明らかになった。また、U0126 (MEK 阻害剤) でも ENC1-mRNA の発現量は減少する傾向にあることも示された。したがって、小胞体ストレス負荷は ATRA 誘導性の p38-MAPK の活性化を抑制し、同経路の抑制に伴い ENC1-mRNA の発現が低下することで神経突起の伸長が抑制される可能性が示された。
- (4) **小胞体ストレスに伴う DNA メチル化/脱メチル化領域の解析**：小胞体ストレスに伴うエピジェネティクス変化を検討するため、ゲノム DNA に対するメチル化解析を実施した結果、10 ng/mL Tm および 5 nM タブシガルギン (Tg) によって共通して DNA のメチル化が促進される遺伝子領域が 43 data set、共通して DNA の脱メチル化が促進される遺伝子領域が 31 data set 見出された (fold change > 2.0)。抽出されたメチル化/脱メチル化領域と関連する遺伝子に対して遺伝子オントロジー (GO) 解析を実施した結果、小胞体ストレスによって DNA のメチル化が促進される領域には、cellular process (GO:0009987)、biological regulation (GO:0065007)、metabolic process (GO:0008152)、response to stimulus (GO:0050896) および signaling (GO:0023052) などの Biological Process に関連する遺伝子領域が多く含まれることが明らかになった。これらの内、神経分化や突起伸長などに関連する GO term を有する遺伝子として、BMP7、GPR110、CASZ1、FZD1 および ALKAL1 などが見出された。一方、小胞体ストレスによって DNA の脱メチル化が促進される領域には、cellular process (GO:0009987)、biological regulation (GO:0065007) および metabolic process (GO:0008152) などの Biological Process に関連する遺伝子領域が多く含まれることが明らかになった。これらの内、神経分化などに関連する GO term を有する遺伝子として、SH3GL3、PRDM16、TUBB および CCNK などが見出された。

本研究課題の遂行によって、p38-MAPK 経路の活性低下に伴う ENC1 の発現低下が小胞体ストレスによる神経突起伸長抑制および神経細胞移動抑制の一因であることが示された。しかしながら、U46619 (p38-MAPK 活性化剤) 等を用いた予備試験では、小胞体ストレスに伴う神経突起伸長の抑制に対する有意な回復効果は認められなかった。したがって、同シグナル経路以外にも神経突起伸長の抑制に大きく寄与することが推察された。一方、DNA メチル化解析では神経分化もしくは神経突起伸長に関連する遺伝子領域のメチル化/脱メチル化領域が見出され、小胞体ストレスに伴いエピジェネティクス異常が発生する可能性も示唆された。本研究課題を継続することで、神経細胞の分化成熟過程に対する小胞体ストレスの影響がより一層精査されていけば、精神神経疾患に対する新たな治療戦略の確立に進展していくと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mimori S, Kawada K, Saito R, Takahashi M, Mizoi K, Okuma Y, Hosokawa M, Kanzaki T.	4. 巻 517 (4)
2. 論文標題 Indole-3-propionic acid has chemical chaperone activity and suppresses endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 623-628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.07.074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka K, Mizuno K, Natsume C, Takanishi M, Shimada Y, Saito R, Fujita N, Fujita T.	4. 巻 5(1)
2. 論文標題 N -(carboxymethyl) lysine represses hair follicle formation by inhibiting Sonic hedgehog expression in a NF- B-independent manner.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Dermatol. & Clin. Res.	6. 最初と最後の頁 006-011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17352/2455-8605.000031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Soeda S, Saito R, Fujita N, Fukuta K, Taniura H.	4. 巻 703
2. 論文標題 Neuronal differentiation defects in induced pluripotent stem cells derived from a Prader-Willi syndrome patient.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurosci. Lett.	6. 最初と最後の頁 162-167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2019.03.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kawada K., Saito R., Mimori S., Okuma Y and Nomura Y.	4. 巻 2 (5)
2. 論文標題 Regulation of neural differentiation and synaptogenic factors by silencing of ubiquitin ligase Ddrfin.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Global Drugs & Therap.	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15761/GDT.1000S1002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 池尻朱里, 小島美駒, 齋藤僚, 平大樹, 上島智, 蓮元憲祐, 岡野友信, 角本幹夫.
2. 発表標題 CRISPR/Cas9システムによるアンジオテンシンII受容体ノックアウト細胞の樹立と評価
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三森盛亮, 川田浩一, 齋藤僚, 高橋正人, 溝井健太, 大熊康修, 細川正清, 神崎哲人.
2. 発表標題 インドール-3-プロピオン酸 (IPA) 神経変性疾患モデル培養細胞に対する神経細胞死抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島美駒, 石戸恵理, 齋藤僚, 平大樹, 上島智, 藤田隆司, 岡野友信, 角本幹夫.
2. 発表標題 CRISPR/Cas9システムを用いたアンジオテンシンII受容体ノックアウト細胞の構築
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2019 第27回クリニカルファーマシーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 添田修平, 齋藤僚, 藤田典久, 谷浦秀夫.
2. 発表標題 Prader-Willi症候群由来iPS細胞の神経幹細胞、ニューロン分化能の欠損
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 添田修平, 齋藤僚, 福田勝一朗, 谷浦秀夫.
2. 発表標題 Prader-Willi症候群由来iPS細胞の神経幹細胞分化の欠陥
3. 学会等名 第4回稀少疾患セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saito R., Nishida K., Mizumoto Y., Fujita N.
2. 発表標題 The differential effects of ER stress inducers on LPA-induced A431 cell dispersion
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤僚, 西田佳世, 水本由衣, 藤田典久.
2. 発表標題 LPA誘導性A431細胞分散に対する小胞体ストレス誘導試薬の効果
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saito R., Kawada K., Okuma Y., Fujita N., Nomura Y.
2. 発表標題 An endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD)-related factor SEL1L contribute to neuronal cell fate decision.
3. 学会等名 Neuroscience 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤僚, 添田修平, 谷浦秀夫, 藤田典久.
2. 発表標題 ヒトiPS細胞における視床下部神経幹細胞への分化誘導法の検討
3. 学会等名 第3回希少疾患セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 菊地俊, 嶋路大輝, 齋藤僚, 藤田典久.
2. 発表標題 小胞体ストレスによるectodermal-neural cortex 1の発現抑制を介した神経突起伸長の阻害
3. 学会等名 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤僚, 嶋路大輝, 菊池俊, 豊田航平, 田中秀和, 藤田典久.
2. 発表標題 Tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress inhibits neuronal cell motility
3. 学会等名 第90回日本薬理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤僚, 嶋路大輝, 豊田航平, 田中秀和, 藤田典久.
2. 発表標題 ツニカマイシン誘導性小胞体ストレスによる神経細胞動態の抑制
3. 学会等名 第2回希少疾患研究会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----