

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19273

研究課題名(和文) マウスES細胞由来の幼若な神経におけるアルコール曝露下での網羅的遺伝子発現解析

研究課題名(英文) Comprehensive gene expression analysis of alcohol exposed immature neurons derived from mouse ES cells

研究代表者

栄徳 勝光 (Eitoku, Masamitsu)

高知大学・教育研究部医療学系連携医学部門・助教

研究者番号：50552733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アルコール曝露が神経分化過程に与える影響を明らかにするべく、マウス胚性幹細胞(ESC)を用いたin vitroデフォルト神経分化系で作出した神経細胞の質の評価系を構築した。そのために、神経分化細胞特異的に発現する10遺伝子を選定し、標準的指標として用いた神経特異的なモノアレル発現を起こすゲノム刷り込み遺伝子Ube3aのゲノム刷り込みの度合いとの相関を解析した。Ube3aゲノム刷り込みの度合いと関連するマーカー遺伝子を統計的に選定した結果、Ube3aのノンコーディングアンチセンス転写産物であるUbe3a AS等のマーカーが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスの発生初期の細胞から樹立した胚性幹細胞(ESC)は、全ての体細胞に分化することができる多能性を有しているため、培養条件によって試験管内で神経に分化させることができる。これは妊娠中に胎児脳が形成される過程を模した実験系であるため、胎児性アルコール症候群の発症機構解明に適した実験系であるが、作出される神経細胞の質が不均一であることが課題であった。今回の成果によって神経細胞の質の評価が簡便に行うことができるようになったため、アルコール曝露のみならず胎生期の神経細胞の脆弱性の評価のために広く応用することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：In this study, to clarify the effects of alcohol exposure on the neural differentiation process, I constructed an evaluation system for the quality of nerve cells produced by an in vitro default neural differentiation system using mouse embryonic stem cells (ESC). For this purpose, I selected 10 genes that are expressed specifically in neural differentiated cells, and analyzed their correlation with the degree of genomic imprinting of the genome-imprinted gene Ube3a that causes neuron-specific monoallelic expression, which was used as a standard index. As a result of statistically selecting marker genes related to the degree of Ube3a genome imprinting, markers such as Ube3a AS, a non-coding antisense transcript of Ube3a, were obtained.

研究分野：分子生物学

キーワード：胎児期アルコール曝露 神経分化 胚性幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠中の胎児脳へのアルコール曝露により起こる胎児性アルコール症候群(FAS)の発症機構の理解のためには、アルコール曝露が神経分化過程に与える影響の理解が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、アルコール曝露が神経分化過程に与える影響を明らかにすることを目指して、マウス胚性幹細胞 (ESC) を用いた in vitro デフォルト神経分化系で作出した神経細胞の質の評価系を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

マウス ESC の in vitro デフォルト神経分化系を用いて作出した神経細胞の質の評価に適するマーカー遺伝子として、神経分化細胞特異的に発現する 10 遺伝子を選定した。神経細胞の質の標準的指標としては、神経特異的なモノアレル発現を起こすゲノム刷り込み遺伝子 Ube3a のゲノム刷り込みの度合いを、転写産物の配列解析で評価して用いた(図1)。神経分化過程の各ステージで発現する神経マーカー遺伝子の発現との相関を調べるべく、in vitro デフォルト神経分化系で作出した神経細胞由来 RNA 54 サンプルの Ube3a ゲノム刷り込みと神経マーカー遺伝子の発現を解析した。

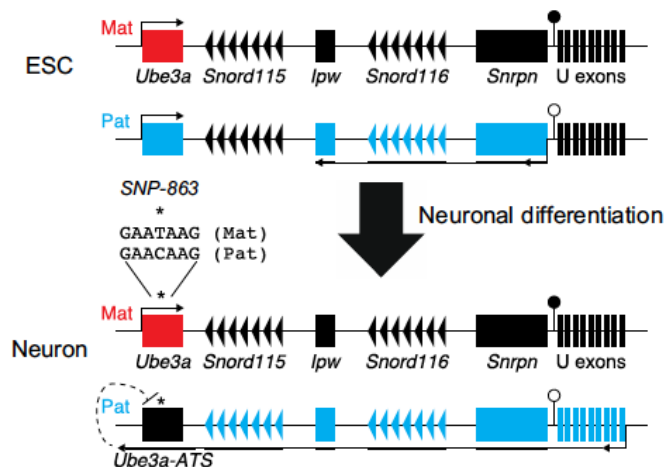


図1. 神経特異的ゲノム刷り込み遺伝子 Ube3a の位置する遺伝子座

Ube3a 遺伝子座の模式図。ニューロンにおける父系 Ube3a 発現は、Ube3a のニューロン特異的、父系対立遺伝子特異的、アンチセンス非コード転写物(Ube3a ATS)により抑制される。このように父系ないし母系の対立遺伝子発現が抑制される現象をゲノム刷り込みといい、Ube3a 遺伝子座では神経分化特異的なゲノム刷り込みが起こる。

4. 研究成果

解析した 10 遺伝子のうち、Ube3a のノンコーディングアンチセンス転写産物である Ube3a AS については、ゲノム刷り込みの度合いが高いサンプルと低いサンプルとの間で統計的に有意な差が見られた(図2)。

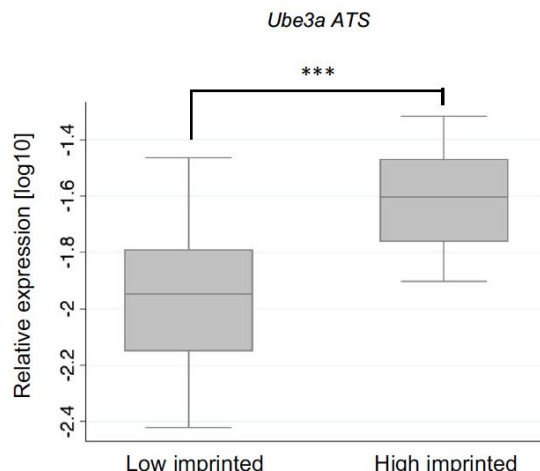


図2. ゲノム刷り込みの程度からみた Ube3a ATS の発現比較

また、Ube3a ゲノム刷り込みの度合いと関連するマーカー遺伝子を統計解析にて選定した結果、解析した 10 遺伝子のうち、Ube3a のノンコーディングアンチセンス転写産物である Ube3a AS と微小管結合タンパク質 Mtap2、微小管を構成する beta チューブリンである Tubb3 が、Ube3a ゲノム刷り込みの度合いと関連性が高いことが分かった(表 1、図 3)。これらの結果から、Ube3a ゲノム刷り込みという神経特異的な遺伝子発現制御を *in vitro* でどれだけ再現できたかについての簡便な評価系を確立することができたと言える。

表 1 . ゲノム刷り込みの程度と神経分化特異的マーカーの関連性

Marker gene	Coefficient (95% CI)
<i>Ube3a AS</i>	10.7 (1.9, 19.5)
<i>Mtap2</i>	12.8 (4.1, 21.6)
<i>Tubb3</i>	-4.3 (-7.8, -0.7)
<i>Tbr1</i>	-2.8 (-5.4, -0.1)

CI Confidence interval

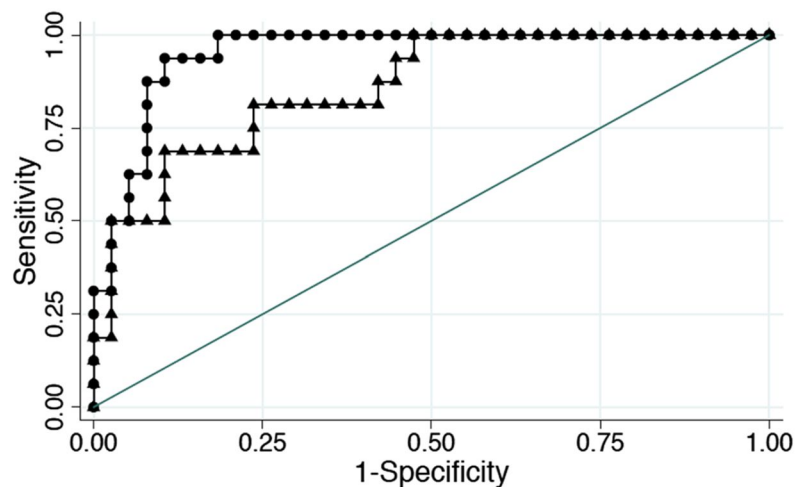


図 3 . Ube3a ゲノム刷り込みの程度からみた Ube3a ATS の発現比較

Ube3a ゲノム刷り込みを用いた神経細胞の質の評価のための ROC 曲線。Ube3a ATS のみで作成された ROC 曲線 (三角形) と、最終モデルで予測された値から構築された ROC 曲線 (丸) を比較し、後者がより質の判別能が高いことが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Mitsuda N, Eitoku M, Yamasaki K, Sakaguchi M, Yasumitsu-Lovell K, Maeda N, Fujieda M, Suganuma N; Japan Environment & Children's Study (JECS) Group.	4. 巻 18
2. 論文標題 Nausea and vomiting during pregnancy associated with lower incidence of preterm births: the Japan Environment and Children's Study (JECS)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Pregnancy and Childbirth	6. 最初と最後の頁 268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12884-018-1911-1	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 Mbelambela EP, Eitoku M, Muchanga SMJ, Villanueva AF, Hirota R, Pulphus TY, Sokolo GJ, Yasumitsu-Lovell K, Komori K, Suganuma N.	4. 巻 25
2. 論文標題 Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) among Congolese cement workers exposed to cement dust, in Kongo Central Province	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Environmental Science and Pollution Research	6. 最初と最後の頁 35074-35083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11356-018-3401-4	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 該当する
1. 著者名 Naji A, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Eitoku M, Suganuma N.	4. 巻 10
2. 論文標題 Mesenchymal stem/stromal cell function in modulating cell death	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-019-1158-4	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 該当する
1. 著者名 Muchanga Sifa Marie Joelle, Yasumitsu-Lovell Kahoko, Eitoku Masamitsu, Mbelambela Etongola Papy, Ninomiya Hitoshi, Komori Kaori, Tozin Rahma, Maeda Nagamasa, Fujieda Mikiya, Suganuma Narufumi	4. 巻 217
2. 論文標題 Preconception gynecological risk factors of postpartum depression among Japanese women: The Japan Environment and Children's Study (JECS)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Affective Disorders	6. 最初と最後の頁 34-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jad.2017.03.049	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 Eitoku Masamitsu, Kato Hidemasa, Suganuma Narufumi, Kiyosawa Hidenori	4. 巻 70
2. 論文標題 Markers associated with neuron-specific Ube3a imprinting during neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 45-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10616-017-0126-z	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 Eitoku M, Suganuma N, Kiyosawa H.	4. 巻 68
2. 論文標題 Comparison of two types of non-adherent plate for neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 2761-2768
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10616-016-9968-z	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 Noguchi S, Eitoku M, Kiyosawa H, Suganuma N.	4. 巻 28
2. 論文標題 Fibrotic gene expression coexists with alveolar proteinosis in early indium lung.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Inhal. Toxicol.	6. 最初と最後の頁 421-428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08958378.2016.1193573	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 栄徳勝光, 近藤伸二, 鈴木穰, 高田豊行, 加藤英政, 城石俊彦, 菅沼成文, 清澤秀孔
2. 発表標題 デフォルト神経分化に伴う亜種特異的モノアレル発現の動的変化
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤彩圭, 栄徳勝光, 近藤伸二, 鈴木穰, 高田豊行, 加藤英政, 城石俊彦, 菅沼成文, 清澤秀孔
2. 発表標題 マウス亜種間F1由来ES細胞におけるハウスキーピング遺伝子の亜種間特異的遺伝子発現と親亜種間における遺伝的影響の考察
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eitoku M, Kondo S, Suzuki Y, Takada T, Kato H, Shiroishi T, Suganuma N, Kiyosawa H
2. 発表標題 Transcriptional dynamics under the influence of two different genomes derived from two distinct mouse subspecies
3. 学会等名 RNA2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 栄徳勝光, 近藤伸二, 鈴木穰, 高田豊行, 加藤英政, 城石俊彦, 菅沼成文, 清澤秀孔
2. 発表標題 近交系マウスES細胞由来神経細胞の神経分化特異的ゲノム刷り込みの評価系の確立
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Eitoku M, Kondo S, Suzuki Y, Takada T, Kato H, Shiroishi T, Suganuma N, Kiyosawa H
2. 発表標題 Subspecies-specific monoallelic expression during neural differentiation.
3. 学会等名 RNA2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Mbelambela EB, Hirota R, Eitoku M, Muchanga Sifa MJ, Kiyosawa H, Ngatu NR, Yasumitsu-LoveII K, Lawanga LO, Suganuma N
2. 発表標題 Road-Traffic Emissions and Respiratory Health among Congolese Transit Workers in Kinshasa: A cross-sectional study.
3. 学会等名 ISEE-ISES AC2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Leelasiriwong T, 上村直人, 井上美穂, 栄徳勝光, 安光ラヴェル香保子, 菅沼成文
2. 発表標題 MCI and dementia discrimination by Mental Function Impairment Scale (MENFIS).
3. 学会等名 第35回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 栄徳勝光, 近藤伸二, 鈴木穰, 高田豊行, 加藤英政, 城石俊彦, 菅沼成文, 清澤秀孔
2. 発表標題 デフォルト神経分化過程での亜種特異的モノアレル発現
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
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
---------------------------	-----------------------	----