

令和元年6月24日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18001

研究課題名(和文) MTF1の神経発生におけるエピゲノムプログラミングと神経変性疾患との関連の解明

研究課題名(英文) Study of epigenetic roles of MTF1 on neurodevelopment and neurodegenerative disease

研究代表者

栗田 尚佳 (Kurita, Hisaka)

岐阜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00746315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：金属応答転写因子(MTF1)は亜鉛、銅などの重金属により活性化され、生体内金属恒常性維持に働いている。また、MTF1ノックアウトマウスは胎生致死であり、MTF1は正常な個体発生に必要な不可欠と考えられるが、胎生期の発生段階での本来の役割は不明である。これまで神経発生における役割が不明であった、金属応答転写因子であるMTF1について、神経分化によって、その発現量低下することを見出した。神経分化におけるMTF1の役割については不明であるが、MTF1は細胞の未分化性の維持に重要な役割をしている可能性がある。本成果から、神経分化におけるMTF1の新たな機能解明の足掛かりになる知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はMTF1の神経発生における役割およびエピゲノムプログラミングについて解明し、成人後の孤発性の神経変性疾患との関連性に迫る点が特色である。これまで、発生期における役割が不明である金属応答転写因子MTF1の分子機能を解明し、また発生期におけるMTF1のエピゲノムプログラム因子としての可能性を探り、成人後の神経変性疾患との関連性を解明しようとする点が独創的であり、チャレンジングな課題である。本研究により、これまで不明であったMTF1の神経発生と神経変性疾患での新たな役割が解明され、DOHaD説を基盤とするMTF1を介した孤発性の神経変性疾患の発症メカニズム解明の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Metal regulatory transcription factor 1 (MTF1) has play role in homeostasis of essential metals, such as zinc (Zn) or copper (Cu). The MTF1 knock out mice are embryonic lethal. Thus it is thought that MTF1 is essential for fetal development, however the role of MTF1 in development is not elucidated. This study showed that the level of MTF1 was decreased in differentiated neuronal cells (SH-SY5Y and Neuro2a) compared to undifferentiated cells. From this result, MTF1 may be related to maintenance of pluripotency in undifferentiated neuronal cells. Our result may be a useful clue to elucidate new roles of MTF1 in neuronal development.

研究分野：環境毒性学、薬物治療学、分子生物学

キーワード：MTF1 エピジェネティクス 神経分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、パーキンソン病 (PD)、アルツハイマー病 (AD)をはじめとする神経変性疾患は、特定の神経細胞が変性、脱落することで起こる難治性の疾患である。また、神経変性疾患において、患者の大多数は家族的な遺伝歴を持たない孤発性である。したがって ALS や PD の発症メカニズムにおいて真に解明しなければならないのは、全体の大多数を占める孤発例である。これまでに、亜鉛、銅などの重金属と神経変性疾患との関わりが示唆されている。我々も ALS や PD の患者脳髄液において、亜鉛や銅の上昇を報告し (Hozumi et al., 2011)、ALS 患者脊髄において亜鉛トランスポーターの SLC30A3 発現量低下を報告している (Kaneko et al., 2014)。孤発性神経変性疾患発症の原因は、未だ解明されていないが、生活習慣、環境、化学物質の曝露などの外的な要因が考えられる (Modgil et al., 2014)。これらの報告から、何らかの環境要因が引き起こす、脳神経における金属代謝異常が、孤発性の神経変性疾患発症に関わっている可能性が示唆される。

近年、胎生期の環境要因が生後の疾患発症のリスクとなる Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 説が提唱されている。一例として胎生期の低栄養状態のために低体重で出生した子供は成人期における生活習慣病の発症リスクが高まるという報告がある。胎生期の器官発生および発達には、適切なエピゲノムプログラミングの実行が必要である。エピジェネティクスは塩基配列変化を伴わない遺伝子発現調節機構であり、そのゲノムの状態をエピゲノムという。したがって DOHaD による次世代影響は、胎生期に受ける環境要因による DNA メチル化、ヒストン修飾、マイクロ RNA などのエピゲノムプログラミング攪乱によって引き起こされると考えられている (Gillman et al., 2007)。神経変性疾患でも、DOHaD を基盤とした胎児発生期の環境を起源とする疾患発症の可能性が考えられる (Kaus and Sareen 2015)。これまでに申請者は、胎生期低亜鉛環境が仔のメタロチオネイン (MT) 遺伝子の DNA メチル化ならびにヒストン修飾を変化させ、その変化が成熟期まで残り、後天的な疾患発症のリスクになる可能性を世界にさきがけて報告している (Kurita et al., 2013)。これは、外的因子による MT などの金属代謝関連遺伝子の胎生期エピゲノム変化が引き起こす、後天的な孤発性神経変性疾患発症の可能性を支持する知見と言える。以上より、胎生期における金属代謝関連遺伝子のエピゲノム変化の異常が、成人後の孤発性の神経変性疾患発症のリスクとなると考えられる。

金属応答転写因子 (MTF1) は、亜鉛、銅などの必須微量金属、カドミウムや水銀などの環境汚染重金属による刺激により活性化され、各種遺伝子のプロモーター領域の金属応答配列 (MRE) に結合し、金属結合タンパクである MT や一部の亜鉛トランスポーターの転写発現を調節している (Gunther et al., 2012)。よって MTF1 は環境重金属毒性防御や、生体内金属恒常性維持に働いている。また、MTF1 ノックアウトマウスは胎生致死であり (Gune et al., 1998)、MTF1 は正常な個体発生に必要不可欠と考えられるが、胎生期の発生段階における本来の役割は不明である。また、MTF1 は種々のエピジェネティクス関連酵素を遺伝子にリクルートし、エピゲノム変化を引き起こす (Majumder et al., 2006)。申請者も胎生期低亜鉛環境を経験した成熟マウスにおける MT 遺伝子のプロモーター領域の MTF1 結合量の増加を報告している (Kurita et al., 2013)。以上から MTF1 による金属代謝関連遺伝子の胎生期エピゲノムプログラミング異常が、後天的な疾患発症のリスクとなることが予想される。一方で、MTF1 を運動神経で過剰発現させると寿命が長くなり (Bahadorani et al., 2010)、孤発性 ALS 患者においては MTF1 の遺伝子多型が観察されている (Morahan et al., 2007)。また、MTF1 は PD 原因遺伝子の Parkin による運動障害を回復させる (Saini et al., 2011) ことから、MTF1 の ALS や PD への関与が示唆される。以上から、胎生期の神経発達におけるエピゲノムプログラミングが正常に行われない場合、成人後の神経変性疾患発症のリスクになる可能性がある。

申請者は孤発性神経変性疾患発症の原因として、金属代謝関連分子の異常に伴う生体内金属恒常性の破綻、および胎生期における遺伝子のエピゲノムプログラミング異常を仮定した。本研究では、胎生期におけるゲノムに刻印されるエピゲノム変化のキープレイヤーとして金属応答転写因子 MTF1 に注目し、神経分化への影響ならびに MTF1 の神経分化におけるエピゲノムプログラミングの役割を解明し、金属代謝異常を基にした孤発性の神経変性疾患への関連性を明らかにする。

### 2. 研究の目的

胎生期の神経発達におけるエピゲノムプログラミングが正常に行われない場合、成人後の神経変性疾患発症のリスクになる可能性がある。申請者は孤発性の神経変性疾患発症の原因として、金属代謝関連分子の異常に伴う生体内金属恒常性の破綻、および胎生期における遺伝子のエピゲノムプログラミング異常を仮定した。本研究では、胎生期におけるゲノムに刻印されるエピゲノム変化のキープレイヤーとして金属応答転写因子の metal responsive transfactor1 (MTF1) に注目した。MTF1 の神経分化への影響ならびに MTF1 の神経分化におけるエピゲノムプログラミングの役割を解明し、金属代謝異常を基にした孤発性の神経変性疾患への関連性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

神経発達期の MTF1 のエピゲノムプログラム異常が、神経成熟後の神経変性疾患発症のリスク

となる可能性を検証する。始めに MTF1 の神経発達における機能的解析と、発生エピゲノムプログラミングにおける役割を神経分化誘導時での MTF1 ノックアウト細胞を用いて検証する。加えて、神経発達期における MTF1 による金属代謝および神経変性疾患関連遺伝子へのエピゲノム変化に及ぼす影響を検討する。そして、神経発達期特異的に MTF1 をノックダウンした成熟神経細胞に孤発性神経変性疾患の原因として提唱されている酸化ストレス・小胞体ストレス、重金属曝露などを行い、神経変性疾患原因分子の細胞内タンパク凝集体や形態変化などの毒性表現型を検討する。最後に臨床サンプルを用いて *in vitro* 実験で得られた分子メカニズムとの比較検討を行う。

#### 4．研究成果

SH-SY5Y 細胞と LUHMES 細胞の 2 種類の神経分化誘導系において、神経分化が進むと MTF1 発現量が減少することが見出された。さらに、今年度は、マウスの神経芽細胞種の Neuro2a 細胞においても、神経分化に伴い、MTF1 の発現減少を見出すことができた。細胞種が違って、同様な神経分化による MTF1 発現減少が観察されたため、この現象は確実なものと考えられる。またこれまでに、*in vivo* においても、胎生 18.5 日での大脳皮質と海馬において一様に MTF1 発現が認められた。今年度は、生後の脳サンプルを用い、神経成熟に伴う、経時的な MTF1 発現を、*in vivo* で詳細に行おうと試みたが、サンプリングは終わったものの、すべての解析を終了することができなかった。神経分化における MTF1 の役割については不明であるが、やはり、今年度の神経分化誘導系を用いた解析の結果から、MTF1 は細胞の未分化性の維持に重要な役割をしている可能性が高まった。MTF1 の未分化、分化時における役割を解明するためには、今後は MTF1 ノックダウン細胞などで、神経分化前後での神経突起伸長、未分化マーカーの変化などの解析が必要となってくる。

#### 5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Hisaka Kurita 「Analysis of epigenetic modifications by methylmercury exposure in neuronal differentiation model」フォーラム 2018：衛生薬学・環境トキシコロジー  
(日韓次世代シンポジウム) (平成 30 年 9 月 10 日～11 日 長崎 アルカス佐世保) 口頭発表

栗田 尚佳, 郷 すずな, 松本 夏南, 畑野 愛, 位田 雅俊, 保住 功 「神経分化時における環境化学物質曝露によるエピジェネティクス変化の解析」第 45 回日本毒性学会学術年会 (平成 30 年 7 月 18 日～20 日 大阪 大阪国際会議場) ポスター発表

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。