

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22368

研究課題名（和文）インターロイキン類によるほ乳類ニューロンのレトロトランスポゾン制御

研究課題名（英文）Regulation of retrotransposable elements in the mammalian neuron by Interleukin family members

研究代表者

今村 拓也（Imamura, Takuya）

広島大学・統合生命科学研究科（理）・教授

研究者番号：90390682

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：母体が感染症などによるストレスを受けた場合、IL17Aが脳内に移行し胎子の発達異常を惹起してしまうリスクが高くなるが、近縁のタンパク質であるIL17Dの投与により、細胞内MAPKシグナルを介してゲノムを守ることができることが明らかとなった。また、IL17Dの投与方法を脳内投与から変更し、さらに非侵襲性を高めることを試みた。その結果、IL17Dの尾静脈投与でも脳の層構造異常を是正できた。これは本課題へ挑戦したことの意義を強く深めるものであり、成果が大きく発展する可能性が高いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、マウスを活用した研究により、医療や動物生産に向けたインターロイキン類の新しい利用法が提案できた。妊娠時の胎児の健康管理は緊喫の課題であり、全ての脳細胞の根幹をなすゲノムについて、その崩壊を末梢投与により簡便に食い止めることができる可能性が出てきたことにより、今後は、IL17Dを含むインターロイキン類の制御により母体の免疫を管理することで、出生児の統合失調症発症リスクを根本から抑える方法論の開発が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Maternal immune activation (MIA) promotes the abnormal cortical formation that causes the incidence of autism spectrum disorder in offspring. IL-17 cytokine family members, especially Interleukin-17A (IL-17A) produced by Th17 cells, have been believed to mediate this phenomenon through NF- $\kappa$ B pathway. We find unexpected pattern of interleukin-17D (IL-17D) expression in neural stem/precursor cells. It increases during mouse brain development, raising the possibility that IL-17D has a supportive function differently from IL-17A. Functional studies indicated that apoptotic cells increased after IL17d knockdown and exogenous IL-17D can protect from MIA-induced abnormal cortical formation in the fetal brain through MEK pathway. Our data suggest that neural IL-17D supports normal brain development in offspring to resist against maternally derived inflammatory IL-17A signals.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：レトロトランスポゾン インターロイキン IL17D

### 1. 研究開始当初の背景

ほ乳類脳の神経回路再生においては、炎症の拡大防止が大きな難関となっている。物理的受傷あるいはストレスにより血液脳関門がダメージを受けると、脳実質に侵入した免疫担当細胞がニューロンのアポトーシスを誘導してしまう。慢性炎症では、例えば細胞死を逃れたとしても、クロマチン修飾の大転換/DNA 脱メチル化が起こり、これに伴い、レトロトランスポゾン等のウイルス由来転移因子の持続的活性化が引き起こされる。

本研究は、研究代表者の独創的な研究成果に立脚して、慢性炎症からニューロンゲノムを根本的に守る方法論の開発を発想したものである。予備研究として、ニューロン自身が産生するインターロイキン系液性因子である IL17D がこのリスクに対処しうることを見出していた。それは以下のような経緯から見出したものである。研究代表者は、マウス初期胚において、IL17D が多能性の獲得・維持に機能しており、このタンパク質をコードする遺伝子をノックダウンすると、アポトーシスにより細胞死が起こり、桑実胚期に発生が停止してしまうが、これは IL17D タンパク質の添加により回復することができることをすでに論文報告していた (Hamazaki et al., *Development*, 2015)。ここで、不思議なことに、正常胚とノックダウン胚を同じシーケンス深度で RNA-seq データを取得・解析したのに、ノックダウン胚では mRNA にマップされる配列が全体に少ないことが分かったのである。そのため、バイオフィンフォマティクスを遺伝子外領域にも適用したところ、上述したレトロトランスポゾンの異常活性化を発見したのである。このような活性化は、成体においてはニューロンで顕著に認められ、特定タンパク質コード遺伝子活性化→転移因子制御、という新たな制御軸が発見されたことにより、今後は、この分子カスケードに切り込むことが重要であると考えられた。特定タンパク質コード遺伝子がゲノムに占める割合は高々数%であり、一方、残りの 90%強のゲノム領域はかつてジャンクであると考えられていたが、遺伝子制御に加えて転移因子制御がニューロンゲノムの防御に繋がるさまを解明できれば、動物病態制御の簡便化に繋がるはずである。

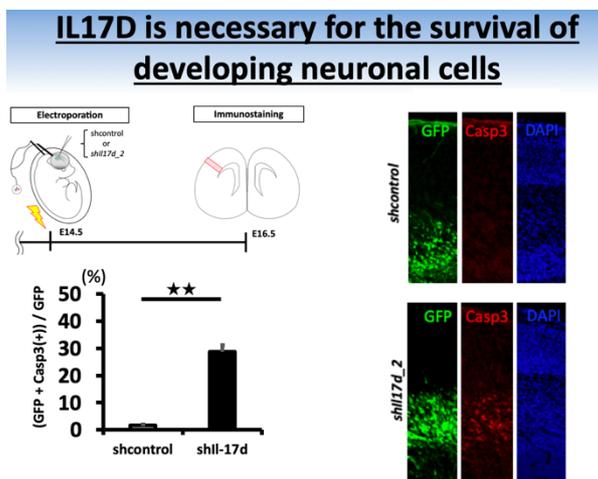
### 2. 研究の目的

本研究では、マウス脳におけるインターロイキン類のゲノムワイド効果解析から、単純な液性因子投与による慢性疾患の防止機構を解明し、動物病態制御の簡便化に繋げていく。免疫関連分子が、シグナル伝達を介した細胞増殖制御と免疫反応に関与する以外にも、「ゲノム免疫」に寄与すると考え、新分野を開拓することとした。

### 3. 研究の方法

感染やストレスによって妊娠母体内で炎症が惹起されたとき、胎仔脳の発達異常をきたす。このとき、胎仔移行サイトカインとして、Th17 細胞が産生する IL17A が知られており、そのシグナルを胎仔脳において遮断できれば、母体環境悪化がもたらす仔の問題行動を緩和することが期待できる。

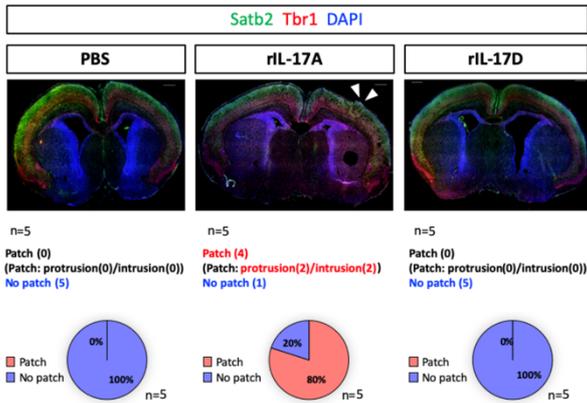
今回我々は、まず、IL17 ファミリーの一つである IL17D 遺伝子がマウス胎仔期に神経系細胞で発現が上昇するかを定量的 RT-PCR により調べた。また、IL17D 遺伝子のノックダウンにより、発達期のニューロンにおける IL17D タンパク質の機能を調べた。IL17D の下流シグナルの同定には、胎仔神経幹細胞の *in vitro* 培養系として妊娠 14 日目 (E14) の神経幹細胞を調整した。また、*in vivo* 実験には、炎症惹起のモデルである Poly (I:C) あるいは IL17A を投与した雌マウスを用い、PBS 投与群と IL17D 投与群を用意し、母体の炎症ストレスを IL17D により抑制できるかを調べた。投与効果の評価は E18 胎仔脳切片の病理像により行った。



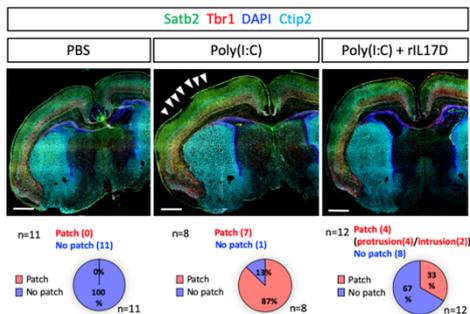
### 4. 研究成果

まず、IL17 ファミリーの一つである IL17D 遺伝子がマウス胎仔期に神経系細胞で発現が上昇すること、また、*in vitro/in vivo* ノックダウンにより、発達期のニューロンがアポトーシス (活性化型 Casp3 シグナルにて検出) することを見出した。例えば、左図に示したように、IL17D の shRNA を胎仔脳に注入すると、2 日後には注入できた細胞の 30% 程度がアポトーシスしていた。

IL17D が神経系細胞の発達を支えていることが明らかになったことから、炎症惹起性オーソログである IL17A 等による母体の炎症



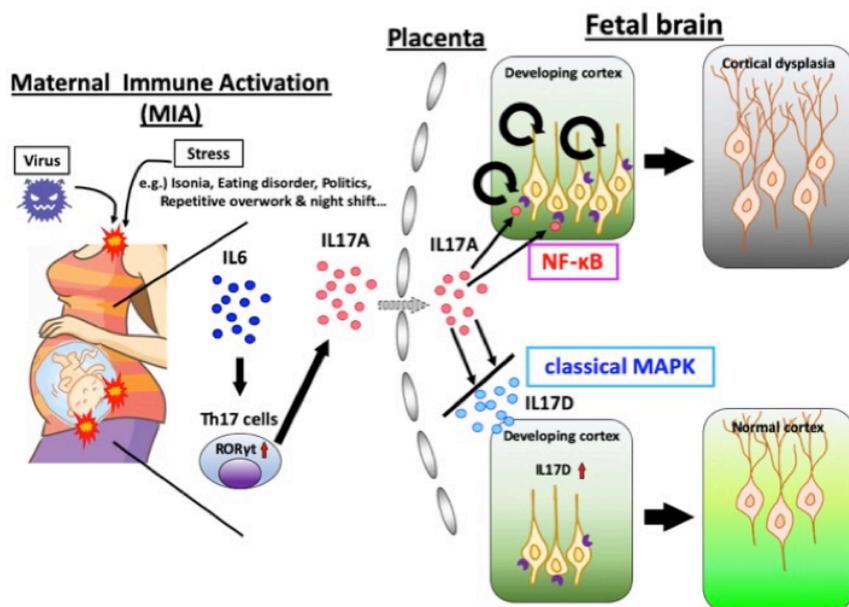
### Exogenous IL17D can protect from MIA-induced abnormal cortical layer formation



が確かに標的となっていること、また、2) IL17 レセプターファミリー遺伝子の一つがコードするタンパク質がこのシグナルの駆動に特異的に機能すること、を明らかにすることに成功した。

最後に、本研究の目標である、単純因子の投与による炎症の簡便制御に向けて、IL17D の投与法を脳内投与から変更し、さらに非侵襲性を高めることを試みた。その結果、IL17D の尾静脈投与でも脳の層構造異常を是正できた。これは本課題へ挑戦したことの意味を強く深めるものであり、成果が大きく発展する可能性が高いと考えられた。

以上の結果を下図に模式的にまとめた。本研究から、母体が感染症などによるストレスを受けた場合、IL17A が脳内に移行し胎子の発達異常を惹起してしまうリスクが高くなるが、近縁のタンパク質である IL17D の末梢投与により、細胞内 MAPK シグナルを介してゲノムを守ることができると明らかとなった。



ストレスに拮抗できるかを明らかにすることにした。炎症惹起モデルである Poly(I:C) あるいは IL17A タンパク質や IL17D タンパク質を投与した雌マウスを用い、脳内投与効果の評価を 18 日目胎仔脳切片の病理像により行った (左図)。その結果、Poly(I:C) あるいは IL17A の脳内投与では、大脳皮質の第 II 層から VI 層に構造異常が認められ、その影響として、脳の表層部にパッチ構造 (矢頭で表示) ができてしまう。一方で、IL17D タンパク質を投与した場合、このようなパッチ構造は認められなかった。この結果から、末梢における炎症は IL17A を介して脳に伝達されるが、このような危険からニューロンを守るために、ニューロン自身が IL17D を産生して、細胞死から身を守っている可能性が想定された。

そこで、Poly(I:C) あるいは IL17A タンパク質の脳内投与による炎症が、IL17D タンパク質により抑制できるかを調べた。その結果、左図に示した通り、確かに、母体の炎症ストレス軽減をできることが明らかになった。この母体の炎症ストレス軽減機能について、そのシグナル経路の同定を詳細化した。特に炎症とレトロトランスポゾン活性化の関連を MAPK・NF-κB シグナルのバランス崩壊の観点から精査し、1) MAPK シグナル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 MINABE Shiori, NAKAMURA Sho, FUKUSHIMA Eri, SATO Marimo, IKEGAMI Kana, GOTO Teppei, SANBO Makoto, HIRABAYASHI Masumi, TOMIKAWA Junko, IMAMURA Takuya, INOUE Naoko, UENOYAMA Yoshihisa, TSUKAMURA Hiroko, MAEDA Kei-Ichiro, MATSUDA Fuko	4. 巻 66
2. 論文標題 Inducible Kiss1 knockdown in the hypothalamic arcuate nucleus suppressed pulsatile secretion of luteinizing hormone in male mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 369 ~ 375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2019-164	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 Ryunosuke Kitajima, Risako Nakai, Takuya Imamura, Tomonori Kameda, Daiki Kozuka, Hirohisa Hirai, Haruka Ito, Hiroo Imai, Masanori Imamura	4. 巻 44
2. 論文標題 Modeling of early neural development in vitro by direct neurosphere formation culture of chimpanzee induced pluripotent stem cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2020.101749	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 IKEGAMI Kana, GOTO Teppei, NAKAMURA Sho, WATANABE Youki, SUGIMOTO Arisa, MAJARUNE Sutisa, HORIHATA Kei, NAGAE Mayuko, TOMIKAWA Junko, IMAMURA Takuya, SANBO Makoto, HIRABAYASHI Masumi, INOUE Naoko, MAEDA Kei-ichiro, TSUKAMURA Hiroko, UENOYAMA Yoshihisa	4. 巻 66
2. 論文標題 Conditional kisspeptin neuron-specific Kiss1 knockout with newly generated Kiss1-floxed and Kiss1-Cre mice replicates a hypogonadal phenotype of global Kiss1 knockout mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 359 ~ 367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2020-026	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 Takouda J, Katada S, Imamura T, Sanosaka T, Nakashima K	4. 巻 in press
2. 論文標題 SoxE group transcription factor Sox8 promotes astrocytic differentiation of neural stem/precursor cells downstream of Nfia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacol Res Perspect	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Nakashima H, Tsujimura K, Irie K, Imamura T, Trujillo CA, Ishizu M, Uesaka K, Pan M, Noguchi H, Andoh-Noda T, Okano H, Muotri AR, Nakashima K	4. 巻 35
2. 論文標題 MeCP2 controls neural stem cell fate specification through miR-199a-mediated inhibition of BMP-Smad signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 109124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109124	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

〔学会発表〕 計13件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 亀田朋典、今村拓也、滝沢琢己、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一:
2. 発表標題 ニューロンは神経活性化により新規DNAメチル化を介してエンハンサー活性を調節し、興奮性シナプス形成に影響する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本雄一、亀田朋典、吉良潤一、中島欽一、今村拓也
2. 発表標題 母体由来の炎症シグナルは胎仔脳が発現するサイトカインIL17Dにより緩和できる
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本雄一、亀田朋典、吉良潤一、中島欽一、今村拓也
2. 発表標題 母体由来の炎症シグナルは胎仔脳が発現するサイトカインIL17Dにより緩和できる
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本雄一、亀田朋典、吉良潤一、中島欽一、今村拓也
2. 発表標題 母体由来の炎症シグナルは胎仔脳が発現するサイトカインIL17Dにより緩和できる
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村拓也、中嶋秀行、中島欽一
2. 発表標題 Mecp2ノックアウトマウス新生仔海馬のシングルセルRNA-seq解析
3. 学会等名 第13回エビジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomonori Kameda, Takuya Imamura, Takumi Takizawa, Fumihito Miura, Takashi Ito, Kinichi Nakashima
2. 発表標題 Neuronal activation can modulate enhancer activity through de novo DNA methylation
3. 学会等名 ISSCR/KSSCR International Symposium (韓国) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomonori Kameda, Takuya Imamura, Takumi Takizawa, Fumihito Miura, Takashi Ito, Kinichi Nakashima
2. 発表標題 Neuronal activation can modulate enhancer activity through de novo DNA methylation
3. 学会等名 The 10th IBRO World Congress of Neuroscience (韓国) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋秀行、辻村啓太、入江浩一郎、今村拓也、石津正崇、Pan Miao、中島欽一
2. 発表標題 Rett症候群原因因子MeCP2はmiR-199a介して神経幹細胞の分化運命決定を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹生田淳、堅田明子、今村拓也、中島欽一
2. 発表標題 転写因子SOX8はNFIAと協調的に胎生期神経幹細胞のアストロサイト分化を促進する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川拓海、今村拓也、堅田明子、中島欽一
2. 発表標題 胎生期神経幹細胞のアストロサイト分化能獲得における転写制御共役因子Trim28の機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村拓也、藤本雄一、亀田朋典、吉良潤一、中島欽一
2. 発表標題 母体由来炎症シグナルを胎仔脳由来ノンコーディングRNA制御により緩和する
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会、Web開催(シンポジウム)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今村拓也
2. 発表標題 神経活性化は新規DNAメチル化を介して興奮性シナプス形成に関わる遺伝子のエンハンサー活性を制御する
3. 学会等名 第14回神経発生討論会、Web開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 亀田朋典、中嶋秀行、滝沢琢己、三浦史仁、伊藤隆司、中島欽一、今村拓也
2. 発表標題 神経活性化による新規DNAメチル化を介した遺伝子エンハンサー活性制御は興奮性シナプス形成に寄与する
3. 学会等名 第14回エビジェネティクス研究会年会、Web開催
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐野坂司・今村拓也（分担）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 学研メディカル秀潤社	5. 総ページ数 384
3. 書名 次世代シーケンサーDRY解析教本 改訂第2版（清水厚志・坊農秀雅 編集）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>iPS細胞を使ってチンパンジーの初期神経発生を誘導 - ヒト脳進化の解明に向けたiPS細胞研究に道 -  <a href="http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2019/200228_2.html">http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2019/200228_2.html</a></p> <p>レット症候群原因因子による神経幹細胞の分化制御メカニズムが明らかに - 発達障害の発症メカニズムの解明と新たな治療法開発に期待 -  <a href="https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/603">https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/603</a></p>
---

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------