

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790744

研究課題名（和文）生体内神経前駆細胞における p27Kip1 の発現調節メカニズムに関する研究

研究課題名（英文）Expressional control of p27Kip1 in neuronal progenitor cells in vivo

研究代表者

三橋 隆行（MITSUHASHI TAKAYUKI）

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80338110

研究成果の概要（和文）：

細胞周期調節遺伝子 p27^{Kip1} は神経前駆細胞が神経細胞に分化する際重要な役割を果たす。本研究は p27^{Kip1} の発現を調節する転写因子を特定することを目的に実施した。マウス胎仔神経前駆細胞から細胞核成分を調整し、p27^{Kip1} 5'非翻訳領域プロモーター配列の DNA 断片ビオチン化プローブを反応させたところ、未同定のタンパク質と結合したプローブ由来シグナルを検出した。しかし抗体添加によるシグナルのシフトを認めず、未同定の結合タンパクは初期に想定していた FOXO1a、FOXO3a ではないことが判明した。

研究成果の概要（英文）：

p27^{Kip1}, cell cycle regulatory protein, play a critical role in differentiation of neuronal progenitor cells (NPCs). A purpose of this research was to identify transcriptional factors regulating p27^{Kip1} expression in NPCs during neocortical development. In binding assay, a signal was detected by using biotinylated oligonucleotides of p27^{Kip1} 5' UTR promoter sequence together with nuclear extract from NPCs, indicating that DNA binding factor(s) was bound to the probe. However, in the samples with anti-FOXO1a/3a antibodies, alteration of signal mobility was not observed. Taken together, DNA binding factor(s) is not identified as FOXO1a/3a as previously speculated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

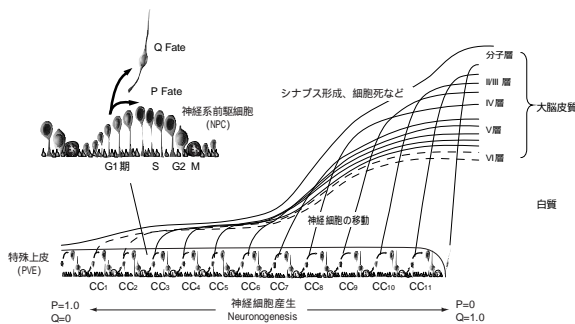
キーワード：小児神経学、神経前駆細胞、大脳皮質発生、分化誘導、細胞周期、p27Kip1、マウス

1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞・前駆細胞は、脳性麻痺などの胎生期脳障害、神経変性疾患、外傷による脊椎損傷、脳梗塞等の治療手段として期待されており、基礎、臨床を問わずきわめて重要な研究課題である。しかし、培養効率が低く細胞を効率よく集積できない点が、臨床応用への大きな障壁となっている。また、中絶胎児の神経組織を用いた治療的研究がベルギーなど海外で行われているが、拒絶反応により組織定着率が低いばかりでなく、倫理的問題に直面せざるを得ない。このような現状を打開するために、神経前駆細胞の分裂増殖、分化誘導メカニズムの生物学的特性の詳細を解明する必要がある。

神経前駆細胞は、胎生期の脳室を取り巻く特殊上皮内に存在し、増殖・分化により大脳皮質ニューロンの大半を占める投射ニューロンを産生する。マウスの神経細胞産生期間においては、神経前駆細胞は合計 11 回分裂する（図 1 中 CC1-CC11, Takahashi T, et al, J Neurosci, 1995）。この 11 回の神経前駆細胞の分裂過程において、1) 細胞周期の G1 期が延長すること、2) 神経細胞の分化誘導確率 (Q) が増加すること、の二点が明らかになった（図 2、3, Takahashi T, et al, J Neurosci, 1996）。これまでの研究により、G1 期の調節に重要なサイクリン依存性キナーゼ (CDK) 抑制因子 p27^{Kip1} タンパク質の発現が 11 回の細胞分裂の進行に伴い増加すること、p27^{Kip1} ノックア

図 1 大脳皮質の発生過程



ウトマウスでは発生後期に神経前駆細胞の G1 期が異常に短縮すること、大脳皮質表層において投射ニューロン数が増加すること（Goto T, et al, Dev Neurosci, 2004, 投稿準備中）、p27^{Kip1} タンパク質を神経前駆細胞特異的に強制発現すると G1 期が延長し、投射ニューロン数が減少し大脳皮質が菲薄化することを明らかにした (Mitsuhashi T, et al, PNAS, 2001, Caviness VS, et al, Cereb Cortex, 2003, Tarui T et al, Cereb Cortex, 2005)。さらに、Nguyen らは p27^{Kip1} が分化誘導のみならず、

図 2 神経幹細胞の細胞周期長

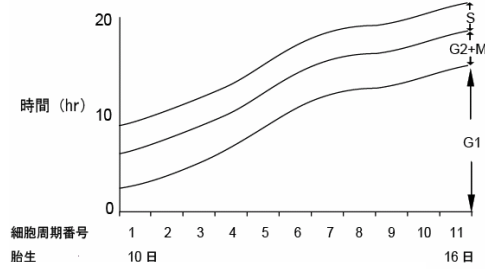
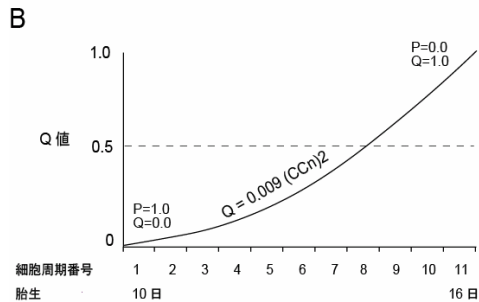


図 3 神経幹細胞の Q 値



神経細胞の移動 (migration) にも重要な役割を持つことを明らかにした (Nguyen L, et al, Genes Dev, 2006)。

これまでの研究でわれわれは、培養細胞で p27^{Kip1} の発現を誘導することが知られている環境汚染物質ダイオキシン (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD) が、胎内曝露により大脳皮質発生異常 (大脳皮質の菲薄化) の原因となること、p27^{Kip1} タンパク質の細胞内局在が変化することで神経前駆細胞の異常な分化誘導が亢進することがその原因であることを示した (Mitsuhashi T, et al, submitted for publication)。以上の研究成果から、p27^{Kip1} が G1 期調節メカニズムを介して、神経前駆細胞の分化誘導調節において極めて重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。

腫瘍関連領域においては、p27^{Kip1} の細胞周期調節のメカニズムが詳細に検討されているにもかかわらず、正常発生における神経前駆細胞の p27^{Kip1} 発現調節および細胞内局在調節のメカニズムについてはいまだ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、神経前駆細胞の分化誘導に重要な細胞周期調節遺伝子のひとつである、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 抑制因子 p27^{Kip1} タンパク質の発現調節に重要な転写因子を同定する。

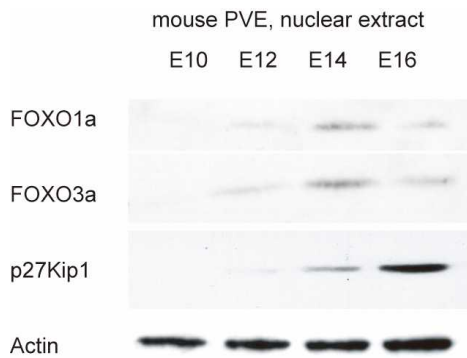


図4 神経前駆細胞核内 p27^{Kip1} タンパク質、転写因子 FOXO1a、FOXO3a の発現変化

3. 研究の方法

神経前駆細胞では、大脳皮質発生が進むに従い細胞核内の p27^{Kip1} タンパク質が増加し、分化した神経細胞で発現が高値であることが判明している(図4)。さらに、転写因子の候補として、forkhead transcription factor の FOXO1a および FOXO3a が、発生時期が進むにつれて増加することが予備実験で判明していた(図4)。FOXO1a および FOXO3a タンパク質の核内増加パターンは、これまでに報告された p27^{Kip1} mRNA の神経前駆細胞での発現パターンと一致する(Dellale I, et al, Dev Neurosci, 1999)。すなわち p27^{Kip1} の転写量は、p27^{Kip1} タンパク質の発現が最大になる胎生16日以降に最大になるのではなく、その2日前のE14でピークを迎えていた。そこで、大脳皮質発生各段階の神経前駆細胞および分化を完了した神経細胞の細胞抽出液を以下の方法で準備し、p27^{Kip1} 遺伝子 5'非翻訳領域プロモーター配列をプローブとした gel shift assay を行った。

(1) サンプルの準備

CD-1 マウスを交配し、膣栓の存在で受胎を確認、胎生0日とした。妊娠14日目の母親マウスにペントバルビタールを腹注後胎仔を摘出し、実体顕微鏡下で胎児前脳の頭頂部(dorsomedial cortical zone)を眼科用剪刀で切断、神経前駆細胞が存在する脳室帯を分離した。発生後期の脳壁には増殖を停止し分化した神経細胞、グリア細胞が混入するため、必要に応じて胎児脳を low melting agarose (Sigma) に包埋し、vibratome により冠状断切片を作成後、背側脳室帯を分離した。以上の操作は氷上で行った。

分離した組織をピペッターを用いて機械的に破碎し、組織内の細胞を一様に分離させた後、PBS で洗浄、界面活性剤を含まない lysis buffer A (10 mM HEPES-KOH, pH 7.8, 10 mM

KCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0, 1 mM DTT, protease inhibitor cocktail [Complete mini, Roche]) を加え、ペレットペッスルで機械的に緩徐に細胞膜を破壊した。その際細胞核を破壊しないよう、細胞核を染色可能なクレシルバイオレット染色液によりサンプルの一部を染色、顕微鏡下で細胞核成分が破壊されていないことを確認しながら行った。サンプルを遠心分離し細胞核成分と細胞質成分を用意した。

(2) Gel shift assay

p27^{Kip1} 遺伝子 5'非翻訳領域プロモーター配列 DNA 断片を合成し(Invitrogen) その3'末端を biotin 標識したプローブを準備した。プローブの配列は以下の通りであった。

5'-AGCCTGGGCGGAGCGGCTCCCGGCGCC
GAGACCAATGGAGCT-3'

E14 マウス胎仔から調整した神経前駆細胞由来細胞核成分とプローブとを EMSA Kit (Panomics 社) の条件化で反応させ、プローブと蛋白質を結合させた。非変性ポリアクリルアミドゲルを作成し、100V、4 で予備電気泳動を行い、その後上記反応液をロードし、100V、4 で泳動した。一部のサンプルには FOXO1a、FOXO3a に対する抗体(Santa Cruz Biotechnology)を混合した。もし DNA 断片に結合した蛋白質が上記転写因子である場合はプローブ由来シグナルがシフトすることで同定可能である。

電気泳動後ゲル内のプローブをナイロン膜(PALL Biotodyne B)にプロットング装置(Semidry Blotting Apparatus, Biorad)を用いて転写した。その後、前述のビオチン化プローブを検出キット(Panomics 社)を使って化学蛍光で発光させ、フィルムに感光させた。

4. 研究成果

将来大脳皮質を形成する E14 マウス胎仔の神経前駆細胞から細胞核成分を調整し、p27^{Kip1} 5'非翻訳領域プロモーター配列の DNA 断片をビオチンで標識したプローブを反応させたところ、未同定の転写因子と結合したプローブ由来シグナルが非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で検出された(図5)。しかし、FOXO1a、FOXO3a に対する抗体を同サンプルに混合しても、上記シグナルの電気泳動距離の短縮(シフト)を認めなかった。以上から、未同定の転写因子は初期に想定された FOXO1a・FOXO3a ではないことが判明した。

本研究では未同定の転写因子を特定することができなかったが、p27^{Kip1} 発現調節に重

要な転写因子を同定することにより、それらと細胞分裂調節に関わるエピジェネティック機構構成分子とのリンクの発見につながる可能性が高いと考えている。今後は、今回同定できなかった転写因子をマトリックス支援レーザー脱離イオン化法・飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOFMS) 等の方法で特定可能かを検討する予定である。

神経前駆細胞の細胞周期調節機構を解明し、分化誘導との関連を明らかにすることにより、神経幹細胞を臨床応用目的で培養増殖する場合に重要な情報を提供することを期待している。

Extract	-	+	+	+	+	+
Biotin-probe	+	+	+	+	+	+
Cold-probe	-	-	+	-	-	-
Antisera	-	-	-	+	-	-
Anti-FOXO1a	-	-	-	-	+	-
Anti-FOXO3a	-	-	-	-	-	+

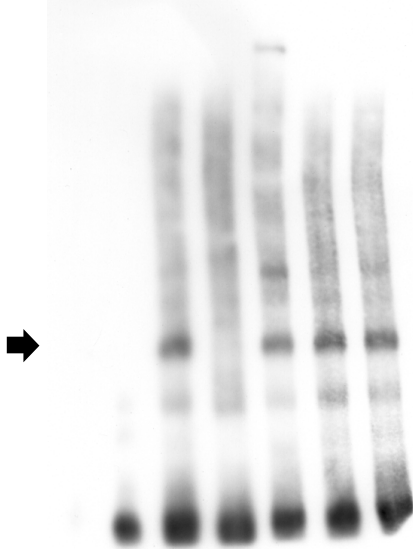


図 5
列をプローブとした gel shift assay。結合シグナルを認める (矢印) も、抗 FOXO1a、FOXO3a 抗体添加により電気泳動距離のシフトを認めなかった。
Extract: 神経前駆細胞由来核抽出液
Biotin-probe: ビオチン化プローブ
Cold-probe: 非ビオチン化プローブ
Antisera: ウサギ血清
Anti-FOXO1a: 抗 FOXO1a 抗体(ウサギポリクローナル抗体)
Anti-FOXO3a: 抗 FOXO3a 抗体(ウサギポリクローナル抗体)

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Mitsuhashi T, Takahashi T. Genetic Regulation of Proliferation/Differentiation Characteristics of Neural Progenitor Cells in the Developing Neocortex. *Brain & Development*, 2009; 31(7):553-557. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

Mitsuhashi T, Takahashi T. Developmental regulation of acetylation statuses of histone proteins in neural progenitor cells of murine cerebral wall. The 6th Congress of Asian Society for Pediatric Research, April 17, 2010, Taipei, Taiwan.

Mitsuhashi T, Goto T, Takahashi T. Coordinated regulation between cell cycle kinetics of neural progenitor cells and layer-specific phenotype of neocortical projection neuron. The 4th Congress of Asian Society for Pediatric Research, May 4, 2008, Honolulu, Hawaii, USA.

[図書] (計 1 件)

Mitsuhashi T, Takahashi T. Cell cycle. In *Encyclopedia of Neuroscience*. Volume III, pp. 588-591. Binder MD, Hirokawa N, Windhorst U, Hirsch MC (eds), Murakami F (section ed). Springer-Verlag, Berlin, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三橋 隆行 (MITSUHASHI TAKAYUKI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：80338110

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし