

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590294

研究課題名(和文) 脱アセチル化酵素 SIRT1 を介した神経幹細胞の増殖における概日リズム形成機構解明

研究課題名(英文) Involvement of Sirt1 in the circadian proliferation of the neural stem cells

## 研究代表者

守屋 孝洋 (Moriya, Takahiro)

東北大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80298207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：記憶等に重要な役割を果たしている脳の海馬では、ニューロンを生み出す神経幹細胞が存在し、絶えず分裂して、自身の数を絶やさないようにしています。この海馬・神経幹細胞の細胞分裂は1日の中で特定の時間帯に起こることが実験動物を用いた研究により明らかになっております。ところが、その詳しいメカニズムは不明のままです。本研究では、神経幹細胞の細胞分裂がいつ起こるのかを自動で解析する実験系を構築しました。また、このシステムを用いてSirt1という脱アセチル化酵素が細胞分裂の日内リズムを生みだしていることが分かりました。この成果は抗がん剤の副作用を軽減する時間薬物療法の開発に応用できる可能性を秘めています。

研究成果の概要(英文)：In the hippocampus, it was reported that the cell division occurs during specific time-window in a day. However, its mechanism remains to be fully clarified. In this study, we tried to clarify how the molecular clock regulates the circadian proliferation of the neural stem cells. We found that Sirt1 is causally involved in the circadian proliferation of the neural stem cells using automatic real-time monitoring system for cell division.

研究分野：神経薬理学

キーワード：神経幹細胞 体内時計 時計遺伝子 Sirt1 脱アセチル化酵素

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 神経幹細胞の機能調節

神経幹細胞は増殖能と神経系細胞への多分化能を有する未分化細胞であり、神経系の発生だけでなく、成体脳におけるニューロン新生も担っている。特に海馬歯状回に存在する神経幹細胞はストレスや脳障害、薬物などに応答し、ニューロン新生を調節することによって様々な脳機能および薬物の効果に重要な役割を果たしていることがわかってきた。神経幹細胞の増殖活性やニューロン等への分化は様々な生理活性物質により制御されていることが報告されているが、これまで我々は、神経幹細胞の増殖能や分化能に対する生理活性物質の調節作用を解析し、メラトニン や  $J_2$  型プロスタグランジン が神経幹細胞の機能を調節していることを明らかにしてきた。

### (2) 神経幹細胞の増殖における日内リズム

ところで近年、海馬歯状回の神経幹細胞の増殖は特定の時刻に好発することが報告され、我々も夜行性のマウスでは神経幹細胞の DNA 合成 (S 期) は明期 (休息期) に活発になり、引き続く有糸分裂は暗期 (覚醒期) に多くみられることを観察しているが、細胞内外のどのようなメカニズムが海馬歯状回の神経幹細胞の増殖における概日リズムの形成に関与しているのかについては全く明らかになっていない。海馬歯状回における神経幹細胞の増殖リズム形成のメカニズムとして、「概日リズム形成を担う時計遺伝子が細胞自律的に増殖の概日リズムを作り出している」ことが予想される。我々はこの可能性を検証するため、生体から切り離れた培養下の神経幹細胞を用いて検討したところ、増殖因子 EGF の刺激により神経幹細胞の増殖に約 24 時間の周期性が認められ、これが時計遺伝子による周期的な制御によってもたらされることを報告した。また、国外のグループから時計遺伝子 *Per2* の変異マウスでは海馬歯状回の神経幹細胞の増殖が亢進していることが報告され、神経幹細胞の増殖リズムは時計遺伝子から構成される分子時計の制御によって形成されることが *in vivo* および *in vitro* の両面から明らかになった。我々はさらに解析を進めたところ、時計遺伝子制御分子であり、NAD<sup>+</sup>サルベージ経路の律速酵素である NAMPT の mRNA レベルが神経幹細胞において概日変動を示すことや、NAD<sup>+</sup>依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 の阻害薬処理が増殖の概日リズムを消失させることを見出した。最近、国内外の研究グループにより、SIRT1 は細胞内の酸化状態を感知し、*Hes1* などの転写調節因子や p53 などの細胞周期関連タンパク質と相互作用することによって、神経幹細胞の増殖やニューロン・アストロサイトへの分化を調整する重要な役割を果たすことが報告された。以上のような背景から、我々は時計遺伝子・転写ネ

ットワークが細胞内の NAD<sup>+</sup>レベルにおける概日リズムを形成することによって SIRT1 活性における概日リズムを惹起し、これが神経幹細胞の増殖における概日リズム形成に関与しているのではないかと作業仮説を考へるに至った。この仮説を証明するためには、神経幹細胞の増殖をリアルタイムでイメージング解析する技術 (細胞周期特異的蛍光レポーター発現神経幹細胞、細胞周期特異的蛍光タンパク質トランスジェニックマウス由来神経幹細胞) を駆使し、時計遺伝子・転写ネットワーク、NAD<sup>+</sup>-SIRT1 経路、および増殖といった 3 つのシステム間の相互作用を詳細に解析するとともに、これらのシステムが生体内の海馬歯状回・神経幹細胞の増殖リズム形成においてどのような役割を果たしているのかを検討する必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、脱アセチル化酵素 SIRT1 による神経幹細胞の増殖における概日リズム形成の分子基盤を明らかにし、海馬歯状回における神経幹細胞の増殖リズム形成の全容を明らかにすることである。この目的を達成するために次の 4 つの項目について検討を行うこととした。

### (1) 神経幹細胞における NAD<sup>+</sup>サルベージ経路 / NAD<sup>+</sup>量 / SIRT1 活性の概日リズムの解析

すでに培養神経幹細胞において増殖因子 EGF の刺激により NAD<sup>+</sup>サルベージ経路の律速酵素である NAMPT mRNA の発現が概日変動を示すという予備的知見を得ているため、これを再確認するとともに、NAMPT タンパク質量および細胞内 NAD<sup>+</sup>量の概日リズム (周期とピーク位相) をそれぞれウェスタンブロットおよび LC-MS 解析によって明らかにする。また、SIRT1 活性の概日リズムを SIRT1 蛍光基質アッセイによって解析する。

### (2) 単細胞レベルのリアルタイム増殖イメージング法の確立

増殖リズムを高精度で解析するためには、単細胞レベルの空間解像度を有する増殖イメージング技術が必要となるが、以下の 2 種類の細胞を用いてこれを確立する。CCNB1-dGluc 発現神経幹細胞、細胞周期特異的蛍光タンパク質 Tg マウス由来神経幹細胞。

### (3) 神経幹細胞の増殖リズムにおける NAD<sup>+</sup>サルベージ経路 / SIRT1 の制御機構の解析

2) で確立する増殖イメージング技術を用い、SIRT1 阻害薬、NAMPT 阻害薬の処理が培養神経幹細胞の増殖の概日リズムに与える影響を検討し、神経幹細胞の増殖リズム形

成における NAD<sup>+</sup>サルベージ経路 / SIRT1 の制御機構を明らかにする。

(4) 神経幹細胞の増殖リズム形成に關与する SIRT1 基質の同定および生体の海馬齒状回・神経幹細胞の増殖リズムにおける SIRT1 の役割解明

神経幹細胞における SIRT1 結合タンパク質を同定し、得られたタンパク質のノックダウン等を行うことによって、増殖リズム形成に關与する SIRT1 下流分子を同定する。

### 3. 研究の方法

(1) 神経幹細胞における mRNA 発現における日内リズムの解析

マウス海馬より神経幹細胞をニューロスフェア法によって分離培養し、EGF 20 mg/mL で刺激し、その後、4 時間毎に 72 時間にわたってサンプリングし、RT-qPCR によって当該遺伝子の mRNA 発現の概日リズムを解析した。

(2) 単細胞レベルのリアルタイム増殖イメージング法

培養神経幹細胞に CCNB1-dGluc を発現させ、(1)と同様に分子時計を同調させ、その後、高感度 CCD カメラ搭載の微弱生物発光連続測定システムによってタイムラプス撮像を行い、有糸分裂イベントの時間分布を解析した。また、Fucci マウス海馬由来の神経幹細胞を分離培養し、生細胞発光連続測定システム(セロミクスアレイスキャン)を用いて、Fucci 蛍光のタイムラプス撮像を行い、細胞周期の G1 S イベントの時間分布を解析した。

(3) BrdU 免疫染色

マウスに BrdU を投与し (50 mg/kg i.p.) 一定時間後に 4%PFA によって還流固定し、海馬齒状回を含む脳スライスを作成し、抗 BrdU 抗体を用いて、海馬齒状回顆粒細胞下層における BrdU 標識細胞を可視化し、その数を定量した。

### 4. 研究成果

(1) 神経幹細胞における NAD<sup>+</sup>サルベージ経路 / NAD<sup>+</sup>量 / SIRT1 活性の概日リズムの解析

すでに胎生マウス海馬よりニューロスフェア法によって分離培養した神経幹細胞において増殖因子 EGF の刺激により NAD<sup>+</sup>サルベージ経路の律速酵素である NAMPT mRNA の発現が概日変動を示すという予備的知見を得ているため、これを再確認したところ、時計遺伝子 Per2 mRNA と同位相で NAMPT mRNA が概日変動することを明らかにした。また、NAMPT タンパク質レベルや SIRT1 活性も EGF 刺激により概日変動することを見出した。

(2) 単細胞レベルのリアルタイム増殖イメージング法の確立

単細胞レベルのリアルタイム増殖イメージング法の確立については、2 種類の細胞分裂可視化技術を用い、培養神経幹細胞の細胞分裂を 15~30 分の時間分解能で解析する方法を確立でき、ほぼ当初の目的を達成することができた。すなわち、CCNB1-dGluc は分裂 (M) 期特異的に発現する CyclinB1 の遺伝子プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を融合させた発光レポーターであるが、これを神経幹細胞に発現させる方法を確立し、研究分担者が作製した生物発光イメージングシステムで可視化できることを確認できた。また、Fucci マウスは特定の細胞周期に特異的にユビキチン分解される細胞周期関連タンパク質と蛍光タンパク質の融合タンパク質をコードした 2 種類のレポーター遺伝子のダブル Tg マウスであり、細胞周期の進行を細胞核の緑色 (G1 期)・赤色蛍光 (S・G2・M 期) で観察できる。そこでまずはじめに Fucci マウスより、マウス胎児線維芽細胞 (MEF) を培養し、10% FCS 存在下における Fucci 蛍光をライブ撮像したところ、G1 S 期イベント (細胞核の赤から緑色への変化) を定量することができた。これを神経幹細胞に応用し、海馬から神経幹細胞を分離培養し、増殖因子 EGF で刺激し、Fucci 蛍光をライブ撮像したところ、G1 S 期イベント (細胞核の赤から緑色への変化) の時間分布が概日リズムを示すことが明らかになり、単細胞レベルのリアルタイム増殖イメージング法を確立することに成功した。

(3) 神経幹細胞の増殖リズムにおける NAD<sup>+</sup>サルベージ経路 / SIRT1 の制御機構の解析

2) で確立した増殖イメージング技術を用い、SIRT1 阻害薬、NAMPT 阻害薬の処理が培養神経幹細胞の増殖の概日リズムに与える影響を検討し、神経幹細胞の増殖リズム形成における NAD<sup>+</sup>サルベージ経路 / SIRT1 の制御機構を明らかにした。すなわち、リアルタイム増殖イメージング技術を用い、G1 S 期および G2 M 期の概日リズムを指標にして、NAD<sup>+</sup>サルベージ経路 / SIRT1 の制御機構の解析を行ったところ、EGF 刺激と同時に SIRT1 阻害薬 (sirtinol 5 μM、splitomicin 5 μM) あるいは NAMPT 非競合的阻害薬 (FK-866 10 nM) を処置した場合、神経幹細胞の増殖における概日リズムが乱れることが観察された。さらにこれらの薬物が神経幹細胞に対して顕著な毒性を示さないことを WST-8 アッセイ、TUNNEL 染色、LDH 遊離アッセイなどで確認した。

(4) 神経幹細胞の増殖リズム形成に關与する SIRT1 基質の同定および生体の海馬齒状回・神経幹細胞の増殖リズムにおける SIRT1 の役割解明

生体の海馬歯状回・神経幹細胞の増殖リズムにおける SIRT1 の役割の解明に挑戦した。その結果、海馬歯状回の神経幹細胞における NAMPT タンパク質の発現リズムを免疫染色によって明らかにした。海馬歯状回の増殖リズムは特に歯状回上側の Type2b 細胞において明瞭に観察されるため、Type2b 細胞マーカーの doublecortin との二重染色によって解析したところ、Type2b 細胞において NAMPT タンパク質レベルが日内リズムを示すことを確認できた。これらのリズムは視交叉上核破壊マウスでは消失することから中枢時計の制御下にあることが明らかになった。今後はレトロウイルスベクターを用いてマウス海馬歯状回の神経幹細胞に NAMPT または SIRT1 の過剰発現体または siRNA を導入し、明暗環境下でマウス脳をサンプリングし、リン酸化ヒストン H3 抗体および BrdU 抗体を用いた免疫染色法によって海馬歯状回の増殖リズムを解析し、生体内における SIRT1 の役割を明らかにする必要がある。

#### <引用文献>

Moriya T, Horie N, Mitome M, Shinohara K, Melatonin influences the proliferative and differentiative activity of neural stem cell, *J Pineal Res*, 2007, 42, 411-418

Katura T, Moriya T, Nakahata N, 15-Deoxy-delta<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> biphasically regulates the proliferation of mouse hippocampal neural progenitor cells by modulating the redox state, *Mol Pharmacol*, 2010, 77, 601-611

Moriya T, Hiraishi K, Horie N, Mitome M, Shinohara K, Correlative association between circadian expression of mouse Per2 gene and the proliferation of the neural stem cells, *Neuroscience*, 2007, 146, 494-498

Borgs L, Beukelaers P, Vandenbosch R, Nguyen L, Moonen G, Maquet P, Albrecht U, Belachew S, Malgrange B, Period 2 regulates neural stem/progenitor cell proliferation in the adult hippocampus, *BMC Neurosci*, 2009, 27, 10-30

Nakahata Y, Sahar S, Astarita G, Kaluzova M, Sassone-Corsi P, Circadian control of the NAD<sup>+</sup> salvage pathway by CLOCK-SIRT1, *Science*, 2009, 324, 654-657

Prozorovski T, Schulze-Topphoff U, Glumm R, Baumgart J, Schröter F, Ninnemann O, Siegert E, Bendix I, Brüstle O, Nitsch R, Zipp F, Aktas O, Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors, *Nat Cell Biol*, 2008, 10, 385-394

#### 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3件)

Ando K, Fukuhara S, Moriya T, Obara Y, Nakahata N, Mochizuki N, Rap1 potentiates endothelial cell junctions by spatially controlling myosin II activity and actin organization, *J Cell Biol*, 査読有, 202, 2013, 901-916  
DOI: 10.1083/jcb.201301115.

Nusuetrong P, Saito M, Kikuchi H, Oshima Y, Moriya T, Nakahata N, Apoptotic effects of satratoxin H is mediated through DNA double-stranded break in PC12 cells, *The Journal of Toxicological Sciences*, 査読有, 37, 2012, 803-812

URL:

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/37/4/37\\_803/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/37/4/37_803/_article)

Goto S, Saito M, Obara, Moriya T, Nakahata N, Involvement of lipid rafts in multiple signal transductions mediated by two isoforms of thromboxane A<sub>2</sub> receptor: dependency on receptor isoforms and downstream signaling types, *European Journal of Pharmacology*, 査読有, 693, 2012, 15-24

DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.07.046.

[学会発表](計16件)

茂木明日香、前川知子、小野塚 寛、竹生田 淳、太田英伸、程 肇、鈴木登紀子、守屋孝洋、上皮成長因子 (EGF) 受容体刺激による神経幹細胞の分子時計の同調機構、日本薬学会第 135 年会、2015 年 03 月 27 日、神戸学院大学 (兵庫県・神戸市)

佐々木崇志、谷本和也、原 弥生、茂木明日香、太田英伸、程 肇、小林正樹、柴田重信、鈴木登紀子、守屋孝洋、概日時計の細胞間シンクロ機構における細胞外ヌクレオチド-受容体シグナルの役割の解明、第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 03 月 20 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

Jun Takoda, Shiori Sudo, Asuka Mogi, Hiromu Fukuzawa, Masatake Kurita, Tokiko Suzuki, Shigenobu Shibata, Takahiro Moriya, ROLE OF CLOCK GENE IN THE HIPPOCAMPAL NEUROGENESIS, *The 2nd Taiwan-Tohoku university Neuroscience Workshop for Young Scientists*, 2014 年 12 月 08 日、宮城蔵王ロイヤルホテル (宮城県蔵王町)

Asuka Mogi、Tomoko Maekawa、Hiroshi Onozuka、Jun Takoda、Tokiko Suzuki、Takahiro Moriya、EGFR stimulation-induced entrainment of the molecular clock in the neural stem cells、The 2nd Taiwan-Tohoku university Neuroscience Workshop for Young Scientists、2014年12月10日、宮城蔵王ロイヤルホテル(宮城県蔵王町)

茂木明日香、前川知子、小野塚寛、竹生田淳、太田英伸、程肇、小林正樹、鈴木登紀子、守屋孝洋、EGF 受容体刺激による神経幹細胞の分子時計の同調機構、第21回日本時間生物学学会学術大会、2014年11月08日、九州大学医学部百年講堂(福岡県・福岡市)

佐々木崇志、谷本和也、原 弥生、太田英伸、程肇、小林正樹、柴田重信、鈴木登紀子、守屋孝洋、細胞外ヌクレオチド-受容体シグナルによる中枢および末梢時計の同調機構の解析、第21回日本時間生物学学会学術大会、2014年11月08日、九州大学医学部百年講堂(福岡県・福岡市)

藤井梨沙、前川知子、竹生田淳、茂木明日香、鈴木登紀子、守屋孝洋、神経幹細胞のオリゴデンドロサイト分化における cAMP-PKA シグナルおよび Doublecortin の関与について、第65回日本薬理学会北部会、2014年09月26日、コラッセ福島(福島県・福島市)

守屋孝洋、竹生田淳、福澤啓睦、鈴木登紀子、柴田重信、Clock 遺伝子変異による海馬ニューロン新生異常と気分障害様行動変化、第87回日本薬理学会年会、2014年03月19日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

守屋孝洋、中島伸吾、小野塚寛、鈴木登紀子、齋藤陽平、小林智徳、山本文彦、大田英伸、程肇、大久保恭仁、中畑則道、加齢に伴う肝臓時計同調障害における 1 受容体シグナル低下の関与、第20回日本時間生物学学会学術大会、2013年11月09日、近畿大学東大阪キャンパス(大阪府・東大阪市)

竹生田淳、福澤啓睦、鈴木登紀子、柴田重信、守屋孝洋、海馬歯状回のニューロン新生における Clock 遺伝子の役割の解明、第52回日本薬学会東北支部大会、2013年10月20日、東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

守屋孝洋、前川知子、竹生田淳、藤井梨沙、及川茉佑子、針生彩、鈴木登紀子、中畑則道、神経幹細胞の細胞分裂における日内リズム形成機構~時計遺伝子およびグルココルチコイドの関与~、新薬理学セミナー2013~時間生物学は創薬や機能性食品の開発に寄与する のか?~(招待講演) 2013年07月13日、早稲田大学国際会議場(東京都)

守屋孝洋、針生彩、竹生田淳、鈴木登紀子、八百板富紀枝、丹野孝一、中畑則道、断眠によるマウス海馬歯状回・神経幹細胞の増殖抑制機構、日本睡眠学会第38回定期学術集会、2013年06月27日、にぎわい交流館(秋田県・秋田市)

守屋孝洋、前川知子、竹生田淳、藤井梨、及川茉佑子、針生彩、鈴木登紀子、中畑則道、Cellomics 細胞イメージ解析装置を用いた神経幹細胞機能のライブ解析、サーモフィッシュャーサイエンティフィック Thermo Scientific High Content Products User Meeting 2013 プログラム(招待講演)、2013年05月27日日、サーモフィッシュャーサイエンティフィック東京オフィス(東京都)

守屋孝洋、前川知子、鈴木登紀子、大隅典子、中畑則道、成体マウス海馬・神経前駆細胞の細胞分裂における日内リズム形成機構~グルココルチコイドの関与~、第86回日本薬理学会年会、2013年03月23日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

守屋孝洋、前川知子、針生彩、鈴木登紀子、中畑則道、神経幹細胞の日内リズム形成機構と時間治療、東北大学脳科学センター後援講演会「生物時計の発生と機能」(招待講演)、2012年12月10日、東北大学医学部(宮城県・仙台市)

守屋孝洋、前川知子、鈴木登紀子、大隅典子、中畑則道、マウス海馬・神経前駆細胞の細胞分裂における日内リズム形成機構、第35回日本神経科学大会、2012年09月21日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

〔図書〕(計1件)

守屋孝洋、医薬ジャーナル社、時間薬理学による最新の治療戦略、2013、pp182-204

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~saibou/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

守屋 孝洋(MORIYA, Takahiro)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号: 8 0 2 9 8 2 0 7

(2)研究分担者

小林 正樹 (KOBAYASHI, Masaki)

東北工業大学・工学部・教授

研究者番号：9 0 3 3 2 9 8 1