

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293248

研究課題名(和文) 先天奇形症候群の大脳皮質発生異常にエピジェネティクス機構が果たす役割に関する研究

研究課題名(英文) Roles of epigenetic mechanism on cerebral cortical histogenesis in congenital malformation syndrome

研究代表者

高橋 孝雄 (TAKAHASHI, TAKAO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：80171495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子配列に依存しない蛋白発現機構が神経発生に重要である点が近年注目されている。そこでその主なメカニズムに關与するヒストンアセチル化酵素の異常が大脳皮質発生に与える影響について、動物モデルでの検討を試みた。さらに本病態の治療薬候補であるヒストン脱アセチル化酵素阻害薬バルプロ酸が大脳皮質発生に与える影響について検討し、神経前駆細胞の細胞分裂動態の異常により大脳皮質を肥厚化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic mechanisms that are governed by histone acetylation are considered to have a critical role in neuronal differentiation. In this analysis, we have attempted to generate transgenic mice that would be capable of decreasing an expression level of CBP protein, a causative protein for Rubinstein-Taybi syndrome. In addition, we have analyzed effects of in utero exposure of valproate, a putative candidate for treating Rubinstein-Taybi syndrome, on cerebral cortical histogenesis. Valproate exposure in utero increased the thickness of cerebral cortex by affecting the cell cycle kinetics of neuronal progenitor cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：神経発生 大脳皮質 エピゲノム 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

高次脳機能の獲得はヒト中枢神経発達の中でも最重要項目である。高次脳機能の中核である大脳皮質の発生は、遺伝情報により規定されたシナリオに従って進行しつつ、遺伝要因や環境因子により直接的・間接的に影響を受けることが想定されている。胎児の側脳室周囲に存在する神経幹細胞から前駆細胞を経て幼若な神経細胞が産生される過程は、大脳皮質を構成するニューロン(興奮性ニューロン[投射ニューロン]、抑制性ニューロン[介在ニューロン])とグリアについて、それぞれ数のバランスや分布パターンがおおかた決定される極めて重要なステップである。この時期の正常発生メカニズムを解明し、さらに発生異常の原因となりうる種々の因子の関与様式について検討することは、知的障害や高次脳機能障害、てんかんといった小児期に認められる中枢神経疾患の病態解明、予防・治療法開発に不可欠と考える。

近年、ゲノム DNA 情報のみでは説明困難な生命現象を説明しうるメカニズムとして、DNA 塩基配列に依存しない遺伝子発現機構(エピジェネティクス機構)の関与が重要視されている。具体的には、シトシン塩基へのメチル基付加による DNA メチル化、DNA の核内収納に重要な働きを持つヒストン蛋白質のリン酸化・アセチル化・メチル化・糖鎖付与によるクロマチン構造の修飾などが知られている。さらに、中枢神経系の発生・発達異常に起因する病態の解明と予防法・治療法の開発のために、エピジェネティクス機構に主眼を置いた研究が不可欠であることを示す発見も相次いでいる。例えば、ヒストンアセチル化活性を持つ酵素をコードする *CBP* 遺伝子や *KAT5B* 遺伝子、*WHS1* 遺伝子の欠失によって Rubinstein-Taybi 症候群(小頭症、精神発達遅滞、自閉症) Young-Simpson 症候群(精神発達遅滞、小頭症) Wolf-Hirschhorn 症候群(胎児から持続する成長障害、小頭症、精神発達遅滞)といった中枢神経奇形を合併する先天奇形症候群を発症することを鑑みると、ヒストンアセチル化の調節メカニズムの破たんが大脳皮質発生へ悪影響を与える可能性が高い。またヒストン脱アセチル化酵素阻害作用を持つ抗てんかん薬バルプロ酸ナトリウム(以下バルプロ酸)が Rubinstein-Taybi 症候群の重要な治療薬候補となっているが、その詳細なメカニズムは現状不明となっている。

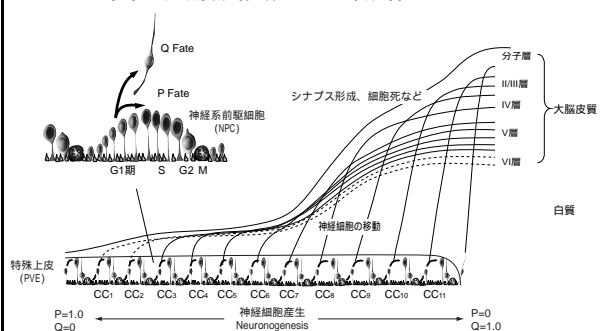
これまでに我々は、大脳皮質内に存在するニューロンの大半を占める投射ニューロンが、胎児側脳室を取り囲む神経前駆細胞から形成される過程をマウスで定量解析し、大脳皮質発生の数学モデルを確立した(図、高橋ら、*J Neurosci*, 1993, 1995, 1996)。具体的には、マウスでは神経前駆細胞が神経細胞産生過程において最大 11 回分裂し、その間に細胞周期の G1 期長が主に延長することで細胞分裂時間が約 8 時間から 18 時間に延長

すること、分裂している細胞のうち分裂を終了してニューロンに分化する細胞の割合(分化誘導の確率、Q 値)が、細胞周期長の延長と相関しながら規則正しく増加することを明らかにした。これらの数学モデルから、細胞分裂回数の変動がない場合においても、分化誘導の確率が変動することで最終的に産生されるニューロン数が大きく変動することが予想されていた(高橋ら、*Dev Neurosci*, 1997)。さらに、G1 期の延長と分化誘導の確率の変動から予想されたことは、G1 期の調節メカニズムがこれらとともに調節する可能性であった。実際、神経細胞産生過程において神経前駆細胞の細胞周期調節遺伝子の発現パターンを *in situ hybridization* で解析した結果、細胞周期の G1 期進行を抑制する *p27Kip1* 遺伝子の発現変化が G1 期の延長と Q 値の変動に影響を与えている可能性が、共同研究者により示唆された(DeLalle ら、*Dev Neurosci*, 1999)。そこで本研究室では、共同研究者とともに作成した神経前駆細胞特異的・時期特異的 *p27Kip1* 強制発現マウスと、供与を受けた *p27Kip1* ノックアウトマウスを用いて、神経前駆細胞の細胞分裂動態と大脳皮質構築異常を解析してきた(三橋ら、*PNAS*, 2001、Caviness ら、*Cereb Cortex*, 2003、後藤ら、*Dev Neurosci*, 2004、樽井ら、*Cereb Cortex*, 2005)。

上記に加え、先行研究で *p27Kip1* 蛋白質の発現に影響を与えると指摘されていたダイオキシンの胎内曝露が神経発生に与える影響を解析し、分化誘導作用をもつ *p27Kip1* 蛋白質を介した神経前駆細胞の異常な分化亢進により投射ニューロン数の減少に伴う大脳皮質の菲薄化が生じること、さらに大脳皮質発生の数学モデルにより大脳皮質菲薄化の仮説を実証することが可能であることを報告した(三橋ら、*PNAS*, 2010)。

これら一連の結果から、正常な細胞周期調節機構を正しく機能させるためにエピジェネティクス機構、特にヒストンのアセチル化を調節するメカニズムが関与している可能性が高いことが想定された。特に、前述のヒストンアセチル化酵素異常が原因で発症する先天奇形症候群に共通して認められる小頭症の病態発症メカニズムに大脳皮質の菲薄化が関与している可能性が高いと予想された。

図 大脳皮質発生の概略



2. 研究の目的

本研究では、遺伝子異常がすでに同定され、かつヒストンのアセチル化状態に関わる酵素異常がその発症に関与している可能性の高い先天奇形症候群に着目し、神経前駆細胞の細胞周期調節と大脳皮質構築へ与える影響について解明を目指した。ヒストンアセチル化調節機構のバランスが崩れた状態でどのような大脳皮質構築異常をきたすのか、さらにはその治療方法としてバランスを調節するような薬物治療、具体的には、ヒストンアセチル化酵素阻害薬であるバルプロ酸ナトリウム（以下バルプロ酸）による治療効果が期待できるかについて、神経前駆細胞の細胞分裂動態や大脳皮質構築異常のメカニズムを中心に解析した。

3. 研究の方法

(1) ヒストンアセチル化酵素 CBP の神経前駆細胞特異的・時期特異的発現減少マウス胎児の準備

nestin-rtTA トランスジェニックマウス大腸菌の Tet リプレッサー蛋白質 (TetR) を改変して作製された“逆 (reverse)” Tet リプレッサー (rTetR) を用いた融合体 rtTA (逆 tTA) は、ドキシサイクリン存在下で tet オペレーター配列 (tetO) に結合し、tetO 下流遺伝子の転写を促進する。本研究では、神経前駆細胞特異的発現が知られている中間径フィラメント nestin の転写調節領域 (イントロン II プロモーター) 制御下で rtTA を発現する nestin-rtTA トランスジェニックマウスを使用した (青木ら, FASEB J, 2000, 三橋ら, PNAS, 2001)。

CBP 遺伝子に対する RNA 干渉を生じる配列同定

理論上 CBP 蛋白発現量を減少させるマイクロ RNA を設計し、それをもとに哺乳類細胞で産生できるプラスミドを作成した。具体的には RNAi Designer (Life Technologies 社) で CBP 遺伝子のコーディング配列特異的に RNA 干渉を起こすことが想定される配列を同定し、相補的な DNA 配列を合成したうえで pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR プラスミドに挿入した (pcDNA-CBPRNAi), pcDNA-CBPRNAi プラスミドを培養細胞 (PC12 細胞) にトランスフェクトし、CBP 蛋白量の減少をウエスタンブロット法で確認した。

TRE-CBPRNAi トランスジェニックマウス
慶應義塾大学医学部動物実験センターの協力を得て TRE-CBPRNAi トランスジェニックマウスを作成した。本トランスジェニックマウスは、tetO を含むテトラサイクリン応答エレメント (TRE) の制御下で、rtTA・ドキシサイクリン共存下で前述の CBPRNAi 転写産物を発現する。TRE-CBPRNAi トランスジェニックマウスの雄を nestin-rtTA トランスジェニ

ックマウスの雌と交配し、ドキシサイクリンを母親に投与すると、特定の時期に CBP 蛋白を神経前駆細胞にのみ減少することが可能である。

これらの方法で作成したダブルトランスジェニックマウス胎児を使用して以下 (2) の実験を実施した。

(2) CBP 蛋白量の減少が神経前駆細胞の分裂・分化誘導に及ぼす影響についての解析
-BrdU を用いた Cumulative Labeling 法による細胞周期各相の変動解析

ダブルトランスジェニックマウス胎児を孕む母マウスに、ドキシサイクリンと対照としてのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を胎生 11 日午前 9 時より 12 時間おきに経口投与した。妊娠 14 日目の母マウスに、午前 9 時から S 期特異的マーカーである BrdU を 3 時間おきに腹腔内投与した。胎児前脳を摘出、4% フォルマリンで固定後パラフィン包埋した。胎児体部よりゲノム DNA を DNeasy Kit (Qiagen) を用いて抽出した後、TRE-CBPRNAi および nestin-rtTA 特異的プライマーを用いて PCR 反応を各胎児ごとに実施、ダブルトランスジェニック胎児を特定した。厚さ 4 μm の冠状断切片を作成し、BrdU 抗体 (Beckton Dickinson) を用いた免疫組織化学的染色後、神経前駆細胞のうち BrdU 陽性細胞の割合 (Labeling Index, LI) を BrdU 曝露 2 時間後に計測した。LI の上昇率から神経前駆細胞の細胞周期各相の長さを胎児前脳において計算した。

(3) バルプロ酸胎内曝露が大脳皮質構築に与える影響の解析

これまでの本研究室の実験結果から、ヒストン脱アセチル化酵素阻害作用を持つバルプロ酸を胎内曝露した場合、大脳皮質が肥厚化することが判明していた。以上の結果は、CBP 機能異常により発症する Rubinstein-Taybi 症候群に合併する小頭症から類推される大脳皮質の菲薄化と逆の関係にあり、CBP 蛋白量が減少した胎児にバルプロ酸を曝露することにより治療効果が得られる可能性が高いと予想された。そこで、ダブルトランスジェニックマウス胎児への治療効果について検討するための基礎的データを得る目的で、バルプロ酸胎内曝露モデルにおいて神経前駆細胞の細胞分裂動態への影響や大脳皮質構築異常に関するデータを以下の方法で収集した。

神経前駆細胞の細胞分裂動態の解析

バルプロ酸胎内曝露が神経前駆細胞の細胞分裂動態へ与える影響について、DNA 合成期のトレーサーである BrdU を用いた Cumulative Labeling 法と、BrdU と IdU を併用した 2 時間コホート法で細胞周期長、分化誘導の確率をそれぞれ解析した。具体的には、

胎生 1 日目の胎児をはらむ母マウスに 0.4% バルプロ酸水溶液を飲水投与し、胎生 10、11、12、14、16 日目の時点で細胞周期長と分化誘導の確率の変動パターンについて計測した。

神経前駆細胞から産生された神経細胞の大脳皮質内分布の解析

バルプロ酸を経口投与した妊娠 16 日目の母マウスに、IdU と BrdU を 2 時間の時間差をもって腹注、以後 3 時間おきに BrdU を 17 時間連続腹注した。その後母マウスに出産させ、生後 21 日目の仔マウスを 4%パラフォルムアルデヒドで還流固定した。パラフィン包埋後 4 μ m の厚さで冠状断切片を作成、抗 IdU・BrdU 抗体、抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織化学的染色した。IdU でのみラベルされた神経細胞を大脳皮質内に同定した。

神経前駆細胞の細胞周期調節蛋白発現量の解析

バルプロ酸を経口投与した母マウスをペントバルビタールで深麻酔し、胎生 12 日の胎児を摘出した。実体顕微鏡下で胎児前脳背内側の組織を眼科用剪刀で切断、神経前駆細胞が存在する脳室層を分離した。分離した神経前駆細胞の細胞数を調整後、蛋白を抽出し、サンプルを SDS-PAGE により分離した。その後 supported nitrocellulose 膜にプロットし、アセチル化ヒストン H3、サイクリン D1、サイクリン依存性キナーゼ(cdk)である cdk2、cdk4、cdk 抑制因子(CDKI)である p21Cip1、p27Kip1、p57Kip2、p15INK4b 各蛋白に対する一次抗体を使用して immunoblot 解析を行った。

4. 研究成果

(1)ヒストンアセチル化酵素 CBP の神経前駆細胞特異的・時期特異的発現減少マウス胎児の準備

理論的に CBP タンパク発現量を減少することが可能な miRNA を RNAi Designer で設計し、5 個の特異的配列を同定した。それらをもとに相補的な DNA 配列を合成、pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR プラスミドに挿入した (pcDNA-CBPRNAi)。

pTRE-CBPRNAi プラスミドの当該配列を制限酵素で切断の上精製し、受精卵にマイクロインジェクションすることで TRE-CBPRNAi トランスジェニックマウスを 5 ライン得ることができた。得られたラインのオスマウスをメスの nestin-rtTA トランスジェニックマウスと交配し、胎生 12 日の胎児を孕む母マウスにドキシサイクリンを 2 日間経口投与、胎児を摘出の上大脳壁からタンパクを抽出して CBP に対するウエスタンブロット解析を行ったが、いずれのラインも CBP タンパクを減少させることができなかった。

上記実験を再度繰り返したが、何等かの理由で CBPRNAi 転写産物の発現量が少ない、あるいはドキシサイクリン投与により誘導さ

れなかった可能性が考えられた。

(2)神経前駆細胞の細胞分裂動態の解析

上記ダブルトランスジェニックマウス胎児を孕む母マウスにドキシサイクリンを投与し、胎生 14 日に Cumulative Labeling 法による細胞分裂動態の解析を実施したが、コントロールと比較して有意差を認めなかった。

(3)バルプロ酸胎内曝露が大脳皮質構築に与える影響の解析

神経前駆細胞の細胞分裂動態の解析

バルプロ酸胎内曝露は胎生 10 日から 16 日の神経前駆細胞の細胞周期各層の長さには有意な変化を生じなかったが、胎生 12、14 日の分化誘導の確率をコントロール群と比較して減少させた。

神経前駆細胞から産生された神経細胞の大脳皮質内分布の解析

バルプロ酸を胎内曝露された場合、胎生 16 日に産生された神経細胞は、生後 21 日目の大脳皮質表層(主に第 II 層)に分布し、その数はコントロールと比較して約 2 倍に増加していた。

神経前駆細胞の細胞周期調節蛋白発現量の解析

バルプロ酸を胎内曝露された胎生 12 日目の胎児では、cyclin D1、cdk2、cdk4、p27Kip1 がコントロールと比較して 20%から 40%増加した。またアセチル化ヒストン H3 は約 20%増加した。

以上よりバルプロ酸が神経前駆細胞の分化誘導の確率を異常に減少させることで、大脳皮質表層の神経細胞数が増加、最終的に大脳皮質が肥厚化することを明らかにした。その背景には、神経前駆細胞のヒストンアセチル化状態の異常増加に伴う細胞周期調節蛋白の無秩序な増加が関与している可能性が高い点を明らかにした。

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 5 件)

Fujimura K, Mitsuhashi T, Takahashi T. Adverse effects of prenatal and early postnatal exposure to antiepileptic drugs: validation from clinical and basic researches. Brain & Development; in press. (査読有)

Fujimura K, Mitsuhashi T, Shibata S, Shimoizato S, Takahashi T. In utero exposure to valproic acid induces

neocortical dysgenesis via dysregulation of neural progenitor cell proliferation/differentiation. J Neurosci; 36(42):10908-10919, 2016. (査読有)

DOI : 10.1523/JNEUROSCI.0229-16.2016

Mitsuhashi T, Takahashi T. Proliferation and differentiation characteristics of neural stem cells during course of cerebral cortical histogenesis. Congenital Anomalies, 56, 2016, 6-11. (invited review, 査読無)
DOI : 10.1111/cga.12117

高橋孝雄, 三橋隆行. 脳幹・小脳の発生異常 小児疾患診療のための病態生理 小児内科, 48, 247-251, 2016. (invited review, 査読無)

高橋孝雄, 三橋隆行. [長期予後と成人後の医学的問題] 小児神経疾患 日本医師会雑誌, 143 巻, 10 号, 2015, 2135-8. (invited review, 査読無)

[学会発表](計4件)

藤村公乃, 三橋隆行, 芝田晋介, 下郷幸子, 高橋孝雄
バルプロ酸胎内曝露は神経前駆細胞の増殖/分化誘導を障害し大脳皮質構築に異常をきたす
第58回日本小児神経学会学術集会
2016年6月3日, 京王プラザホテル新宿(東京都新宿区)

Fujimura K, Mitsuhashi T, Shibata S, Shimozato S, Takahashi T. Valproic acid exposure in utero causes neocortical dysgenesis: altered proliferation/differentiation pattern of neural progenitor cells. Neuroscience 2015
2015年10月21日, シカゴ(アメリカ)

Fujimura K, Mitsuhashi T, Shibata S, Shimozato S, Takahashi T. In utero exposure to valproic acid causes cerebral cortical dysgenesis in mice. The 13th Asian and Oceania Congress of Child Neurology,
2015年5月15日, 台北(台湾)

藤村公乃, 三橋隆行, 芝田晋介, 下郷幸子, 高橋孝雄
バルプロ酸ナトリウム胎内曝露がマウス大脳皮質発生に与える影響
第49回慶應ニューロサイエンス研究会
2015年2月21日, 慶應義塾大学信濃町キャンパス(東京都新宿区)

[図書](計2件)

高橋孝雄, 藤村公乃, 三橋隆行. ガイドラインと最新文献で学ぶ小児科学レビュー 2016-17【疾患編】10. 神経・筋疾患, 精神疾患(精神行動異常, 心身症)44) 脳形成異常, 総合医学社, 東京, 542 (429-435), 2016.

三橋隆行, 高橋孝雄. 脳回形成メカニズムと大脳皮質内神経細胞数の変動について. 続・イメージからせまる小児神経疾患 50 症例から学ぶ 診断・治療プロセス, 診断と治療社, 東京, 138 (87-8), 2015.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.keio.ac.jp/rdb/med/view.php?i=32>

報道関係

日経産業新聞(平成28年11月9日): 妊娠中に抗てんかん薬、子供の脳に異常・慶大、マウスで解明

科学新聞(平成28年10月28日): 抗てんかん薬「バルプロ酸」妊婦服用で胎児脳に異常

慶應義塾プレスリリース(平成28年10月19日): 妊娠中に内服した抗てんかん薬によって赤ちゃんの脳の構造に異常を生じる仕組みを解明

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 孝雄 (TAKAHASHI Takao)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 80171495

(2)研究分担者

小崎 健次郎 (KOSAKI Kenjiro)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 30234743

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