

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04232

研究課題名(和文) 胎児脳・未熟脳における星状グリアの産生メカニズムの解明と治療応用にむけた機能解析

研究課題名(英文) Mechanisms underlying gliogenesis of astrocytes in premature brain

研究代表者

高橋 孝雄 (Takahashi, Takao)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：80171495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまでに定量解析されていなかった星状グリアの大脳皮質構築異常に果たす役割を検討したうえで、未熟脳の脳障害に星状グリアが果たす役割の解明を目指し実施した。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(VPA)を胎内曝露することで大脳皮質内の星状グリア数が増加し、エピジェネティックな遺伝子発現異常が生後の星状グリア内においても継続して観察される点を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は、VPA胎内曝露が生後早期の大脳皮質に分布する星状グリアの遺伝子発現を変動させるとともに星状グリア数を増加させることを示した。遺伝子発現解析とGO解析の結果から、VPAに胎内曝露されたマウスの星状グリアではATPase量が増加すると推測された。ATPaseはATPを加水分解しエネルギー産生を行う酵素であるため、VPA胎内曝露群の星状グリアでは生体活動によるエネルギー需要が増加していると考えられた。VPA胎内曝露が仔の高次脳機能を障害することは多数の先行研究が報告しており、本研究結果は星状グリアの数の増加や生体活動の変動が高次脳機能障害の一因となり得る可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Recent reports have shown that the astrocyte have multiple roles in maintaining structure of neocortices and behavioral brain functions in mammals. The goal of this analysis was to investigate the role of astrocyte in neocortical histogenesis. We show here that in utero exposure of histone deacetylase inhibitor valproate (VPA) increased the number of astrocyte in neocortices in young adult mice. In addition, specific genes that were critical for ADP biosynthetic process were increased in the neocortical astrocytes by VPA exposure in utero.

研究分野：医歯薬学

キーワード：神経発生 大脳皮質 細胞周期 アストロサイト

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、胎内・生後環境により直接的・間接的に影響を受ける。これまでに我々は、大脳皮質内の投射神経細胞が神経幹・前駆細胞から形成される過程をマウスで解析し、大脳皮質発生の数学モデルを確立した (Takahashi et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, *J Neurosci* 1993, 1995, 1996a, 1996b, 1999, 図1)。それらをもとに、細胞周期のG1期進行を抑制する蛋白質 $p27^{Kip1}$ が神経幹・前駆細胞の増殖・分化誘導に極めて重要な役割を果たしていることを、 $p27^{Kip1}$ ノックアウトマウス ($p27^{KO}$) や神経幹・前駆細胞特異的・時期特異的 $p27^{Kip1}$ 強制発現マウス、ダイオキシシン胎内曝露マウス、バルプロ酸 (VPA) 胎内曝露を使った研究で明らかにしてきた (Mitsuhashi et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, Goto et al., *Dev Neurosci* 2004, Mitsuhashi et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, Fujimura et al., *J Neurosci* 2016)。また、ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 を神経幹・前駆細胞でのみ強制発現させた結果、神経幹・前駆細胞の細胞分裂動態に変動を来たすことで神経細胞産生数が増加し、その結果大脳皮質が肥厚化することを明らかにした。

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は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)、特にヒストンのアセチル化・メ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予想された。特に、ヒストンアセチル化活性を持つCBP蛋白質や、ヒストンメチル化活性を持つNSD1蛋白質の異常でRubinstein-Taybi症候群 (小頭症、精神発達遅滞、自閉症)、Sotos症候群 (精神発達遅滞、大頭症) といった発達障害・知的障害を合併する先天奇形症候群をそれぞれ発症することを鑑みると、大脳皮質の菲薄化・肥厚化がそれぞれの病態発現に重要な役割を果たしている可能性が高いことが予想される。当研究室で解析してきたバルプロ酸もヒストン脱アセチル化阻害薬であり、SIRT1はヒストン脱アセチル化酵素自体である点もこれらの仮説を強く示唆する。さらに、バルプロ酸を胎内曝露したマウスの行動解析実験では、他マウスとコミュニケーションを取りにくい傾向を認めており、大脳皮質形成異常がこれら自閉傾向に関与している可能性が高い (未発表)。

一方、大脳皮質の肥厚化は主に表層の投射神経数の増加が原因であったが、表層細胞の多くを占める星状グリアについてはこれまで定量解析されておらず、その大脳皮質機能へ果たす役割は不明であった。

近年の細胞レベルの研究では、星状グリアが神経伝達物質のトランスポーターや受容体を有したり、シナプスの剪定や修飾、細胞栄養因子の合成など、多様な機能を持つ点が指摘されており (図2)、大脳皮質肥厚化によって生じる大脳皮質機能異常の原因を追究するためには星状グリアの解剖学的・機能的解析が不可欠と考えられた。

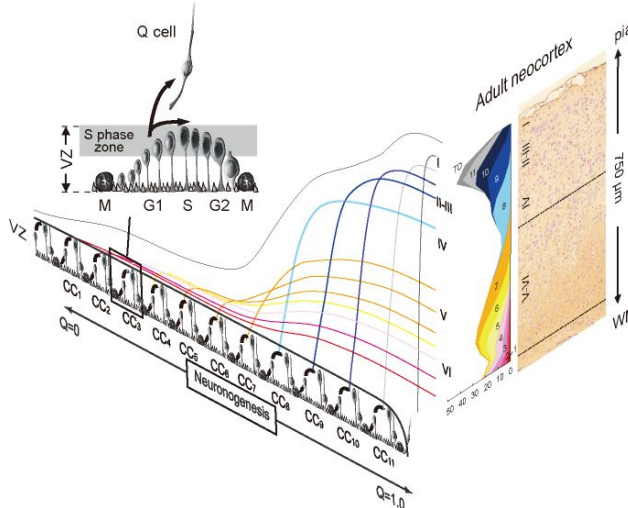


図1 大脳皮質の神経細胞産生過程 (三橋ら, *Congenit Anom (Kyoto)* 2016.)

マウス神経幹・前駆細胞は脳室帯 (ventricular zone; VZ, 左上パネル) において核の上下運動を生じつつ合計 11 回分裂し、各分裂において分化誘導を生じた神経細胞 (quiescent cell; Q cells) は大脳皮質の深層 (VI 層; 赤ライン) から表層 (I 層; グレーライン) に規則性をもって分布する。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに定量解析されたことがないグリア細胞の一種である星状グリア (アストロサイト) の大脳皮質構築異常に果たす役割を解明したうえで、未熟脳に対する低酸素状態が生じうる脳障害に星状グリアが果たす役割を解明し、未熟児や新生児のみならず胎児治療の開発を視野に入れた基盤技術の確立を目指した。具体的には、まず大脳皮質の正常発生後半に産生される星状グリアが発生時期に応じてどこで産生され、どのように大脳皮質内に分布しているのかについて、マウスを用いて解析を試みた。次に、本研究室でこれまでに蓄積してきた遺伝子異常や環境因子 (バルプロ酸曝露等) により形成された異常な大脳皮質内での星状グリア分布パターン、形態を定量解析し、特定遺伝子の異常にとどまらずエピジェネティックな異常が星状グリアの分布・産生に与える影響について解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 正常な大脳皮質内での星状グリア細胞の解析

幼若・成体マウスにおける星状グリアの大脳皮質内分布の解析

生後4日目・21日目のマウス大脳皮質において、グリア細胞の中から星状グリアを特異的マーカーで免疫組織染色することで識別し、星状グリアが大脳皮質内にどのように分布しているのかについての基礎な定量データを収集した。具体的には出生4、21日目の仔マウス大脳を4%パラフォルムアルデヒド(PF)で還流固定後、パラフィン包埋した。一次体性感覚野を含む厚さ4 μmの冠状断切片をロータリーマイクロトーム(HM355, Microm)で作成し、幼若星状グリア・放射状グリアのマーカーであるRC2、あるいは成熟星状グリアのマーカーであるGFAP、S100 等に対する一次抗体で免疫組織染色し、共焦点レーザー顕微鏡(LSM800, Carl Zeiss)で検出、ZENアプリケーション(Carl Zeiss)を用いて大脳皮質内分布を解析した。

胎児大脳壁内での星状グリア産生部位の解析

先行研究において、星状グリアが発生中の大脳壁内のどの部位で主に産生されるかについて各種議論があり結論が出ていなかった。申請者は、大脳壁内脳室側にある脳室帯内神経幹・前駆細胞(pseudostratified ventricular epithelium, 以下PVE)とは異なる二次性増殖細胞群(secondary proliferative population, 以下SPP)が大脳皮質発生過程の後半に出現し、星状グリアの産生母体である可能性を過去に指摘してきた(Takahashi et al., *J Neurosci* 1996b, 高橋ら, 脳と発達 2014, 図3)。そこで本研究ではSPPが星状グリアを主に産生しうるかについて、以下の方法で解析を試みた。PVEが消失したのちの妊娠17-18日目の母マウスにS期特異的マーカーであるBrdUを腹腔注射することで主にSPPを標識し、その後生後4、21日目まで母マウスに養育させた。前述同様に仔マウスを4%PFで固定後パラフィン包埋し、4 μmの連続切片を作製、BrdUおよび前述の星状グリアマーカーに対する蛍光二重免疫組織染色を行った。BrdUおよび前述の星状グリアマーカーがともに陽性である細胞の数、分布パターンを共焦点レーザー顕微鏡下で測定した。以上の実験から、SPPで増殖した神経幹細胞・前駆細胞がどの程度の割合で星状グリアを産生するかについての概要を把握することを目標とした。一方、神経細胞と異なりグリア細胞は発生後の大脳内で分裂増殖する可能性が高い点より、もしこれらの方法で検出が難しい場合は、出生後皮下埋め込み型 osmotic pump により持続的に BrdU に曝露することで星状グリアを標識することを検討した。

(2) 大脳皮質肥厚化を生じるエピジェネティックな異常が星状グリアの大脳皮質内分布に及ぼす影響についての解析 - バルプロ酸(VPA)胎内曝露による大脳皮質発生異常に星状グリアが果たす役割の解析

これまでに実施した当研究室の先行研究の結果から、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(VPA)を神経細胞産生課程の全期間胎内曝露した場合、神経幹・前駆細胞の異常な分化能低下により投射神経細胞の産生数が増加し、大脳皮質が肥厚化することが分かっていた(Fujimura et al., *J Neurosci* 2016, 図4B)。これらの異常には、エピジェネティックな変化により細胞周期調節遺伝子群がPVEにおいて無秩序に増加した結果と考えられた(Fujimura et al., *J Neurosci* 2016)。また神経幹・前駆細胞数が増加した形跡としてPax6陽性神経幹・前駆細胞数の増加を認めた。Pax6陽性細胞はグリア細胞の産生母体として知られている一方、核形態のみで識別したグリア細胞の数には変動を認めなかった(Fujimura et al., *J Neurosci* 2016)。そこで本研究では、前述の星状グリアに対する免疫組織染色をバルプロ酸に曝露された仔マウス脳においても実施し、バルプロ酸によるエピジェネティックな影響が星状グリア産生数に果たす影響について、正常マウスの定量データと比較検討した。またエピジェネティックな変化が残存している可能性を検討するため、成体内の星状グリアを精製し、RNAseqを実施した。

具体的には、胎生1日から仔の出生まで0.4% VPA水溶液または蒸留水を飲み水として母体マウスに与え、日齢7において深麻酔下の仔マウスから大脳を摘出し、実体顕微鏡下で大脳皮質を剥離した。Neural tissue dissociation kit (Miltenyi Biotec)を使用して神経系細胞を解離した。さ

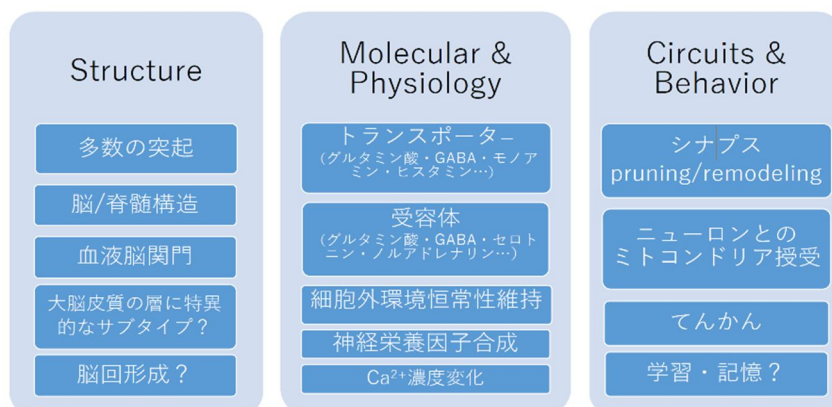


図2 星状グリアに認められる機能
(The Society for Neuroscience Virtual Conference - The Other Brain Cells: New Insights Into What Glial Cells Do, Sep. 9th, 2016, online より改変)

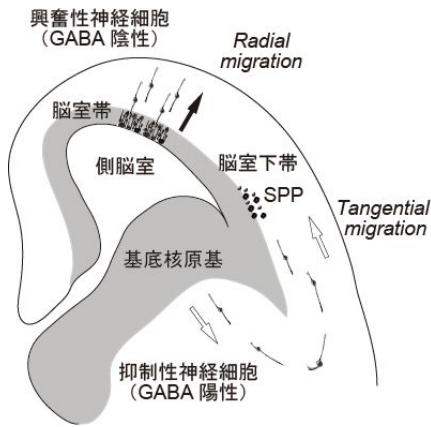


図3 大脳皮質内神経系細胞の産生部位
(高橋ら, 脳と発達 2014)

興奮性神経細胞(GABA 陰性)は側脳室を取り囲む脳室帯内に存在する神経幹・前駆細胞より産生され、放射状に移動(radial migration)し皮質内に分布する。一方抑制性神経細胞(GABA 陽性)は基底核原基より産生され、皮質内に接線方向に移動(tangential migration)し分布する。発生が進むに従い、脳室帯の軟膜側の脳室下帯にsecondary proliferative population(SPP、本文参照)が外側より出現する。

らにAnti-GLAST MicroBead kit (Miltenyi Biotec)を用いて、GLAST陽性星状グリア分画を抽出した。抽出したGLAST陽性星状グリア分画からTRIzol Plus RNA Purification Kit (Thermo Fisher)を用いてトータルRNAを精製した。抽出したRNAからcDNAを生成後、TaqMan Gene Expression Assay kit (Thermo Fisher)を用いてqPCRを実施した。GLAST陽性星状グリアから抽出したトータルRNAを用いて、NextSeq500 (Illumina)を使用してシーケンシング解析を行った。

(3) 仔マウス低酸素脳症(HIE)モデルの作成と星状グリア移植

仔マウスに対して外科的な処置(Rice-Vannucci法、Rice et al., *Ann Neurol* 1981)により低酸素脳症(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)を作成し、星状グリアの移植効果を以下の方法で試みた。生後10日目仔マウスを3種混合麻酔(メドミジン/ミダゾラム/ブトルファンール)の腹注で全身麻酔し、左総頸動脈を8-0絹糸で結紮、単縫合および動物用組織接着ボンド(VetBond, 3M)、もしくは埋没縫合で閉創した。麻酔拮抗薬を投与し1-2時間保温下で回復させ、低酸素チャンバーに100分間留置した。大気に戻した後母と同じケージに戻し、最大10日間程度飼育した。脳を4%PFで還流固定し、脳切片を作成、MAP2、GFAP、ミトコンドリア特異的抗体で免疫組織染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 正常な大脳皮質内での星状グリア細胞の解析

幼若・成体マウスにおける星状グリアの大脳皮質内分布の解析
胎児大脳壁内での星状グリア産生部位の解析

現在解析中である。

(2) 大脳皮質肥厚化を生じるエピジェネティックな異常が星状グリアの大脳皮質内分布に及ぼす影響についての解析 - バルプロ酸(VPA)胎内曝露による大脳皮質発生異常に星状グリアが果たす役割の解析

Anti-Glutamate aspartate transporter (GLAST) Microbead法により精製された星状グリア分画と精製前の神経系細胞分画についてGLASTをコードする*SLC1A3*の発現量をqPCRで比較したところ、星状グリア分画では精製前の神経系細胞分画と比較して*SLC1A3*発現量が5倍に増加した。このことは本手法が星状グリアを精製するために有効な方法であることを示した。

次に、VPA胎内曝露が生後星状グリアの遺伝子発現に与える影響を解析するため、星状グリア分画からトータルRNAを抽出し、RNAseqを実施した。VPA胎内曝露群と対照群間では1955遺伝子に発現量の差を認めた。具体的には、ヒストン結合タンパクであるretinoblastoma binding protein 4 (RBBP4)をコードする*Rbbp4*の発現増加($n = 3, p < 0.001$)、ATPaseをコードする*Atp1a4*($n = 3, p < 0.001$)、*Atp11c*($n = 3, p < 0.01$)などについて発現増加を

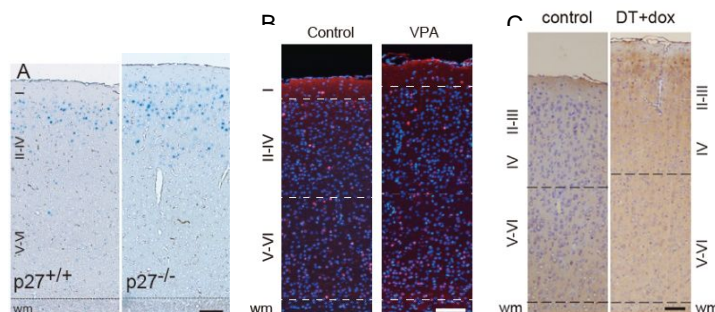


図4

A. p27KO (p27^{-/-})
B. バルプロ酸(VPA)胎内曝露
C. SIRT1 強制発現(DT+dox)による大脳皮質の肥厚化
wm: 白質

認めた。さらにこれらの発現変動についてgene ontology (GO)解析を行ったところ、VPA胎内曝露群では対照群と比較してADP合成経路が促進されるとの結果を得た (ADP biosynthetic process, GOid: 0006172, n = 3, p < 0.01)。

生後21日の大脳皮質に分布するS100 陽性星状グリア数はVPA群で対照群と比較して18%増加した (VPA胎内曝露群 161.5 ± 1.5 vs. 対照群 136.6 ± 8.8 個; n = 6, p = 0.0325, 計測単位は横 $250 \mu\text{m}$ x 縦皮質厚)。

(3) 仔マウス低酸素脳症 (HIE) モデルの作成と星状グリア移植

Rice-Vannucci 法による HIE モデルマウスを作成したが、外科手技中の死亡例がみられたこと、また生存した場合でも覚醒に時間を要し、哺乳ができないなど衰弱する個体が多かったことから、本方法による HIE モデルマウスでは有意な結果を得られないと考え、モデル作成を中止した (表 1)。

本研究の結果は、VPA 胎内曝露が生後早期の大脳皮質に分布する星状グリアの遺伝子発現を変動させるとともに星状グリア数を増加させることを示した。遺伝子発現解析と GO 解析の結果から、VPA に胎内曝露されたマウスの星状グリアでは ATPase 量が増加すると推測された。ATPase は ATP を加水分解しエネルギー産生を行う酵素であるため、VPA 胎内曝露群の星状グリアでは生体活動によるエネルギー需要が増加していると考えられた。さらに *Rbbp4* の過剰発現がグリオプラストーマなどの腫瘍発生に与ることが報告されているため (Kitange et al., *Cell Reports* 2016)、VPA 胎内曝露による *Rbbp4* の発現増加が、細胞増殖機構の障害を介して星状グリア産生数を増加させた可能性が考えられた。VPA 胎内曝露が仔の高次脳機能を障害することは多数の先行研究が報告しており、本研究結果は星状グリアの数の増加や生体活動の変動が高次脳機能障害の一因となり得る可能性を示唆した。

マウスにおける VPA の血中半減期は 1 時間程度と短いため、VPA は生後直後にマウス体内から排泄されたと考えられるが、本研究の結果は、VPA 胎内曝露による星状グリアの産生および機能への影響は、VPA が排泄された後も続くことを示した。

本研究で認めた RNA レベルでの遺伝子発現の変動については、今後、タンパクレベルで解析を進めるための重要な基礎データと考えられた。

なお、HIE モデルマウスで十分な覚醒が得られなかった点については、主要血管を結紮するという侵襲性の高い介入を行ったこと、麻酔薬と拮抗薬に対する感受性に個体差が大きく安全投与量の設定が困難だったことが原因と考えられた。酸素欠乏下で生じる星状グリアの遺伝子発現の変化は、脳のエネルギー環境の恒常性維持機構を解明するために重要な点であるため、より安定したモデルを確立した上で今後の課題としたい。

表 1 HIE モデルマウスの麻酔薬・拮抗薬の投与量と転帰

個体	薬物投与量 (mg/kg)					転帰
	塩酸メドミジン	ミダゾラム	酒石酸ブトルファノール	塩酸アチパメゾール	塩酸アチパメゾール/塩酸メドミジン比	
#1	0.75	4	5	0.75	1	2 時間で覚醒
#2	0.75	4	5	1.5	2	1 時間で覚醒
#3	0.5	4	3.75	0.75	1.5	20 分で覚醒するが浅鎮静
#4	0.15	2	2.5	0.75	5	6 時間後も哺乳せず
#5	0.3	4	5	1.5	5	6 時間後も哺乳せず
#6	0.3	4	5	3	10	6 時間後も哺乳せず

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujimura K, Mitsunashi T, Takahashi T.	4. 巻 39
2. 論文標題 Adverse effects of prenatal and early postnatal exposure to antiepileptic drugs: Validation from clinical and basic researches.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain & Development	6. 最初と最後の頁 635-643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.braindev.2017.03.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shibata S, Iseda T, Mitsunashi T, Oka A, Otsubo S, Shindo T, Nagai T, Inoue T, Sasaki E, Takahashi T, Schalek R, Lichtman JW, Okano H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Large area fluorescence and electron microscopic correlative analysis with multi-beam scanning electron microscopy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuit	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） 10.3389/fncir.2019.00029	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	三橋 隆行 (Mitsunashi Takayuki) (80338110)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	
研究分担者	芝田 晋介 (Shibata Shinsuke) (70407089)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	武内 俊樹 (Takenouchi Toshiki) (60383741)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	