

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390299

研究課題名(和文)

時期特異的遺伝子強制発現マウスを用いた神経幹細胞のクロマチン調節機構に関する研究

研究課題名(英文) EPIGENETIC REGULATION OF CELL CYCLE KINETICS OF MURINE NEURONAL STEM CELLS BY HISTONE DEACETYLASE

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

研究成果の概要(和文): 近年、遺伝子の塩基配列に依らない遺伝子発現機構(エピジェネティクス機構)が神経発生に重要な働きを持つのではないかと考えられている。本研究ではエピジェネティクス機構を担うヒストン脱アセチル化酵素を神経幹細胞にのみ時期を限定して発現可能なマウスを作成した。ヒストン脱アセチル化酵素を神経幹細胞に強制的に発現させると、細胞分裂動態に変動を認めたことから、大脳皮質の組織に異常を生じる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): Epigenetic mechanisms is considered to be a putative machinery for controlling cell cycle kinetics of neuronal progenitor cells (NPCs). We investigated effects of overfunction of histone deacetylase in cell cycle regulation in NPCs which forms cerebral neocortex *in vivo*. Double-transgenic mice were generated that were capable of overexpressing histone deacetylase Sir2 proteins in NPCs in time dependent manner. We detected transient shortening of the length of the cell cycle on embryonic day (E) 16 as Sir2 were overexpressed in NPCs by doxycycline administration starting from E14 to E16. This result indicate that deacetylation of histone may play a critical role in production of projection neurons in neocortex as well as pathogenesis of cerebral cortical abnormality.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：神経発生学、小児神経学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：エピジェネティクス、大脳皮質発生、神経前駆細胞、マウス、細胞周期、ヒストン脱アセチル化

## 1. 研究開始当初の背景

高次脳機能の中枢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緻密に、かつダイナミックに進行する。皮質構造の複雑さと機能の多様性からみて、中枢神経系の発生における最大、最重要イベントである一方、いまだに神経科学領域の最大の謎でもある。大脳皮質発生過程の詳細

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、小児における高次脳機能障害の病態解明、予防・治療法開発に不可欠である。特に、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・グリアの総数、興奮性、抑制性ニューロンの数のバランスと分布などが

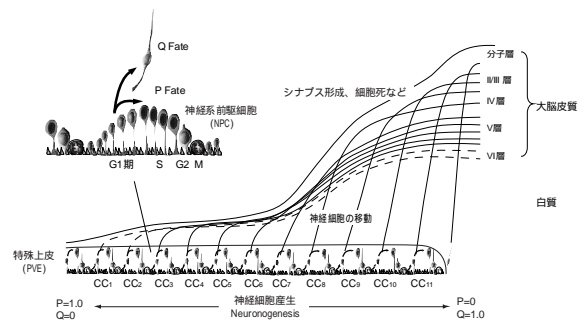
おおかた決定されるため、高次脳機能の獲得にとって最も重要な基礎が築かれる時期である。

近年、ゲノム DNA 情報のみでは説明困難な生命現象を説明するメカニズムとして、DNA 塩基配列に依存しない機構（エピジェネティクス機構）の関与が重要視されている。エピジェネティクス機構として、メチル基の付加などによる DNA の直接修飾や、ヒストン蛋白質のリン酸化・アセチル化・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。現在のところ、1) 発達遅滞をきたすレット症候群がメチル化 DNA 結合蛋白質 MECP2 遺伝子の変異によること (Amir ら、1999)、2) ダイオキシン曝露により遺伝子調節領域のメチル化が誘導されること (Wu ら、2004)、3) 細胞周期調節に重要な遺伝子 (RB、E2F 等) がヒストンアセチル化の影響を受けること、などが知られている。また、てんかんの治療薬として広く用いられ、神経発生毒性が临床上問題となるバルプロ酸ナトリウムはヒストン脱アセチル化酵素阻害作用を有しており (Rocchi ら、2005) その副作用発現にヒストン蛋白質の修飾が関与している可能性が高い。以上、神経系の正常発生とその障害、とりわけ未熟な前駆細胞の分裂・分化誘導に関わる病態解明のためには、また、有害物質による神経発生異常の機構解明のためには、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と考えられる。

これまでに我々は、大脳皮質ニューロンの大半を占める投射ニューロンが神経前駆細胞から形成される過程について詳細に解析、大脳皮質発生の数学モデルを確立した (図 1)。マウスでは、神経前駆細胞が計 11 回分裂し (高橋ら、1995、図 1 横軸の CC1~CC11) その間、細胞周期 G1 期長、および分化誘導確率 (Q 値) が、相関しながら規則正しく増加することを明らかにした (高橋ら、1996)。さらに、G1 期調節遺伝子 p27<sup>Kip1</sup> ノックアウトマウス、および神経前駆細胞に限定して皮質発生の中期以降に p27<sup>Kip1</sup> を強制発現させたマウスを用いた研究により、神経前駆細胞の増殖・分化誘導に p27<sup>Kip1</sup> が極めて重要な役割を果たしていることを明らかにした (三橋ら、2001、Caviness ら、2003、後藤ら、2004、樽井ら、2005)。

環境汚染物質であるダイオキシン (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD) に胎内曝露したラットでは出生後に空間記憶能力が障害されるなど、ダイオキシン胎内曝露が高次脳機能発達障害の一因となる可能性が報告されている。これまで我々は、1) ダイオキシン胎内曝露により大脳皮質が菲薄化すること、2) 神経前駆細胞の異常な分化亢進 (Q

図 1 大脳皮質の発生過程



値の異常高値)が大脳皮質菲薄化の原因であること、3) TCDD 曝露による分化誘導障害が皮質深層の投射ニューロンに特異的な現象であること、4) 分化誘導作用を有する p27<sup>Kip1</sup> がこれらの現象に深く関与していることを示した (三橋ら、2010)。

大脳皮質の正常発生プログラムは、神経幹細胞・前駆細胞の分裂増殖、分化誘導を制御する比較的少数の遺伝子群から構成されると考えられている。一方、これまでの研究から、特定の遺伝子異常や有害な環境因子による影響が、他の遺伝子の発現調整や機能調整により一部代償されることが明らかとなった (後藤ら、2004、樽井ら、2005)。このような緩衝機構を獲得することにより、大脳皮質の正常発生プログラムは極めて堅牢なものとなり、環境汚染物質などの有害事象から守られていると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記緩衝機構においてエピジェネティクス機構が果たす役割について、クロマチン調節機構を中心に解明することを目的に実施した。具体的には、ヒストン脱アセチル化酵素を神経前駆細胞に特異的に、かつ発生時期特異的に強制発現させることのできるマウスを作成、ヒストン脱アセチル化酵素 Sir2 強制発現により神経前駆細胞に惹起される細胞分裂動態の変動、大脳皮質発生プログラムに生じる異常、結果として大脳皮質の組織学的構築に生じる異常を解析した。

## 3. 研究の方法

クロマチン構造の修飾はエピジェネティクス機構の主要メカニズムとして重要である。クロマチンはヒストン内リジン残基のアセチル化、脱アセチル化により、それぞれ転写が容易な euchromatin、転写が困難な heterochromatin 構造をとることが知られている。ヒストンのアセチル化状態は複数のヒストン脱アセチル化酵素により調節を受ける。これまでの研究により神経前駆細胞の分裂回数が増えるに従い、1) リジン残基 9 番目がアセチル化されたアセチル化ヒストン H3 lys9 が他のリジン残基と比較して増加す

ること、2)細胞分裂制御に重要なサイクリン依存性キナーゼインヒビター(CDKI)遺伝子群(p27<sup>Kip1</sup>, p57<sup>Kip2</sup>, p21<sup>Cip1</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p18<sup>INK4c</sup>)のプロモーター領域がヒストンH3 lys9のアセチル化により開放されること、

3)神経前駆細胞の核内脱アセチル化酵素Sir2のみが他の脱アセチル化酵素と比較し減少することを明らかにした(平成18年度基盤研究(B)科学研究費補助金実績報告書)。

Sir2はNAD依存性ヒストン脱アセチル化酵素であり、酵母のカロリー制限下での寿命延長に重要な役割を果たしていることが知られている(Imaiら,2000)。またSir2を欠損したマウスでは大脳発生に異常をきたす(Chengら2003)。我々が行った予備実験ではSir2をPC12細胞において強制発現すると、アセチル化ヒストンH3 lys9が減少することを確認した。以上から神経前駆細胞の分裂回数が増加するにつれてSir2蛋白の発現量が減少し、その結果アセチル化ヒストンH3 lys9が減少、CDKIのプロモーターが解放される可能性がある。

そこで、テトラサイクリン強制発現システムを用いた2種類のトランスジェニックマウス、すなわち神経前駆細胞特異的に発現するnestinのイントロンIIプロモーターを用いたnestin-rtTAとTRE-Sir2とを掛け合わせ、ドキシサイクリンを母マウスに投与することで、Sir2を神経前駆細胞特異的かつ時期特異的に強制発現させるダブルトランスジェニックマウスを作成した。

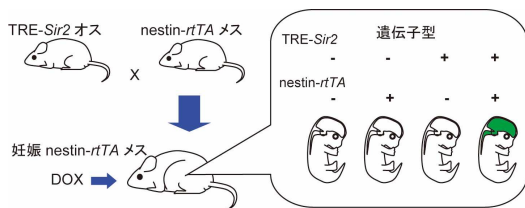


図2 神経前駆細胞特異的・時期特異的ダブルトランスジェニックマウス

TRE-Sir2とnestin-rtTA遺伝子を両方持つ胎児において、DOX投与によりSir2が強制発現される(緑色)。

### (1) ヒストン脱アセチル化酵素の神経前駆細胞特異的、時期特異的強制発現マウスの作成

#### nestin-rtTAトランスジェニックマウス

本研究で使用したテトラサイクリン強制発現システムの調節蛋白質は、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rtTA)である。rtTAはテトラサイクリン(TC)あるいはドキシサ

イクリン(DOX)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。すなわちrtTAを特定の細胞に局限して発現させ、DOXを曝露することで細胞特異的かつ時期特異的な遺伝子強制発現が可能である。

本研究では、神経前駆細胞特異的に発現する中間径フィラメントnestinの神経前駆細胞特異的発現に重要なイントロンIIプロモーター制御下でrtTAを発現するトランスジェニックマウスを使用した(nestin-rtTA)(図2、青木ら、2000、三橋ら、2001)。

#### TRE-Sir2トランスジェニックマウスの作成

pTRE-Tightプラスミド(Clontech)は、tetOを含むTC応答エレメント(TRE)の制御下で、rtTAおよびTC・DOX共存下でのみ、目的遺伝子を発現する。本研究では、目的遺伝子のSir2をTREの下流に挿入した遺伝子断片TRE-Sir2を以下の方法で作成した。

まずSir2alpha in pUSBamp(Upstate Biotechnologies)を制限酵素BstXIで切断後、Sir2遺伝子を含む2.3 kbの遺伝子断片をアガロースゲル電気泳動で切り出し、DNA末端をDNA polymerase(Klenow)でblunt end化した。一方、pTRE-Tightプラスミドを制限酵素EcoRVおよびSmaIで切断した。両者を結合しpTRE-Sir2を得た。2.3 kb断片の挿入方向を確認後、得られたプラスミドで大腸菌DH5alphaを形質転換し、プラスミドを大量に産生させた。EndoFree Plasmid Maxi Kit(Qiagen)でプラスミドを精製し、念のため、プラスミド内のSir2遺伝子を含む2.3 kbの遺伝子断片とTREの遺伝子配列をDNAシーケンサーで確認した。

pTRE-Sir2をXhoIで切断し、2.9 kb断片すなわちTRE-Sir2をアガロース電気泳動で切り出した。切り出したTRE-Sir2断片をQIAEXII(Qiagen)で精製し、さらにフェノール・クロロフォルム抽出によりendotoxinを除去した。

FVBマウスの受精卵に、上記精製したTRE-Sir2断片をマイクロインジェクション法により注入した。遺伝子を導入された受精卵は偽妊娠状態の母親マウス子宮に移植し、出産させた。出産後、仔マウスの尻尾を固体識別可能な形で切断し、体細胞DNAをDNeasy Tissue Kit(Qiagen)で抽出後、PCR法でTRE-Sir2遺伝子断片が導入されたトランスジェニックマウスを同定した。

上記トランスジェニックマウスは、慶應義塾大学医学部動物実験センターの下田耕治先生(動物実験センター専任講師)の協力を得て作成した。

#### Sir2強制発現可能なTRE-Sir2トランスジェニックマウス系統の検索

nestin-rtTAトランスジェニックマウスと

TRE-Sir2トランスジェニックマウスとを交配し、両遺伝子を持つダブルトランスジェニックマウスを得た(図2)。その際母親マウスにDOXおよび対照としてのPBSを投与、導入遺伝子由来のSir2を強制発現可能で、かつPBS投与時に遺伝子発現の「漏れ」が最小な系統をRT-PCR法により導入遺伝子由来の転写産物を検出することで検索した。

(2)クロマチン構造の修飾が神経前駆細胞の分裂・分化誘導および大脳皮質の構築に及ぼす影響

BrdUを用いたCumulative Labeling法による細胞周期各相の測定

妊娠14-16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%ホルマリンで固定後パラフィン包埋し、厚さ4 μmの冠状断切片を作成した。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、4、8、12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長を胎児前脳において計算した。

出生後21日における2時間コホートの  
大脳皮質内分布

Sir2強制発現により大脳皮質層構造にどのような異常が生じるかを検討した。胎生14-16日に、IrdUおよびBrdUを2時間の時間差をもって腹注し、BrdUをさらに13時間投与した。以上よりIrdUと初回BrdU投与の間の2時間に分化を開始した細胞群(2時間コホート)を、IrdUのみで標識された細胞として大脳皮質内に同定することが可能である。

#### 4. 研究成果

(1)TRE-Sir2トランスジェニックマウスの作成

方法に記載した2.9 kbのTRE-Sir2を得、FVBマウスの受精卵にマイクロインジェクション法により注入した。遺伝子を導入された受精卵は偽妊娠状態の母親マウス子宮に移植し出産させた。出産後、仔マウスの尻尾をから抽出した体細胞DNAを用いて、PCR法でTRE-Sir2遺伝子断片が導入されたトランスジェニックマウスを合計3ライン同定した。

(2)Sir2強制発現可能なTRE-Sir2トランスジェニックマウス系統の検索

上記TRE-Sir2トランスジェニックマウスと、nestin-rtTAトランスジェニックマウスとを交配し、両遺伝子を持つダブルトランスジェニックマウス胎児を得た。その際母親マウスにドキシサイクリンおよび対照としてのPBSを投与、導入遺伝子由来のSir2を強制発現可能で、かつPBS

投与時に遺伝子発現の「漏れ」が最小な系統を検索した。その結果、RT-PCR法により導入遺伝子由来の転写産物を2ラインより検出、さらに両ラインからはwestern blot法によりSir2蛋白の強制発現を確認した。

(3)BrdUを用いたCumulative Labeling法による細胞周期各相の測定

TRE-Sir2トランスジェニックマウスと、nestin-rtTAトランスジェニックマウスとを交配し、両遺伝子を持つダブルトランスジェニック胎児を持つ母親マウスにドキシサイクリンと対照としてのPBSを胎生14日午前9時より12時間おきに投与した。胎生16日目にS期特異的トレーサーであるBrdUを午前9時より2、5、8、12、17時間、3時間おきに連続曝露した。胎児脳室帯に存在する神経前駆細胞の内、BrdUを取り込んだ細胞の比率(BrdU labeling indices, LI)を計測した結果、2、5時間BrdU曝露群においてSir2強制発現群のLIが対照群と比較して増加していた。一方8、12、17時間BrdU曝露群では対照群と比較してLIに変化を認めなかった。以上から、Sir2強制発現により神経前駆細胞の細胞分裂動態に変動をきたしうることをin vivoで初めて示すことができた。また本トランスジェニックマウス系では、導入遺伝子の強制発現がドキシサイクリン投与後約8時間後に消失することが示唆された。

(4)出生後21日における2時間コホートの  
大脳皮質内分布

TRE-Sir2トランスジェニックマウスと、nestin-rtTAトランスジェニックマウスとを交配し、両遺伝子を持つダブルトランスジェニック胎児を持つ母親マウスにドキシサイクリンと対照としてのPBSを胎生14日午前9時より12時間おきに投与した。胎生16日目のマウス胎児に、S期特異的トレーサーであるIdUを午前7時に一回母親経由で曝露し、その後BrdUを午前9時より2、5、8、12、17時間、3時間おきに連続曝露した。当初の計画では、出生21日目の仔マウス大脳を4%パラホルムアルデヒド固定し、IdUおよびBrdUに対する二重免疫組織染色を行うことによって、IdUと初回BrdU投与の間の2時間に分化を開始した細胞群(2時間コホート)をIdUのみで標識された細胞として大脳皮質内に同定することを予定していた。しかし、母親にIdUとBrdUを反復して腹腔内投与した結果、出生した仔マウスを養育せず、出生21日目の胎児を得ることができなかった。原因として、妊娠時に腹注を頻回に実施することによりストレスが増強された結果と考えられ、今後の実験手法に課題を残した。



## 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6件)

Mitsuhashi T, Yonemoto J, Sone H, Kosuge Y, Kosaki K, Takahashi T.

In utero exposure to dioxin causes neocortical dysgenesis through the actions of p27<sup>Kip1</sup>.

*Proc Natl Acad Sci USA*, 2010;107(37):16331-5. 査読有

Mitsuhashi T, Takahashi T.

Genetic Regulation of Proliferation/Differentiation Characteristics of Neural Progenitor Cells in the Developing Neocortex.

*Brain & Development*, 2009; 31(7):553-7. 査読無

Naito Y, Kimura T, Aramaki M, Izumi K, Okada Y, Suzuki H, Takahashi T, Kosaki K.

Caudal regression and tracheoesophageal malformation induced by adriamycin: A novel chick model of VATER association.

*Pediatr Res*, 2009; 65:607-12. 査読有

Yagihashi T, Mizuno M, Chino B, Sato Y, Sakuma K, Takebayashi T, Takahashi T, Kosaki K.

Effects of the CYP2D6\*10 alleles and co-medication with CYP2D6-dependent drugs on risperidone metabolism in patients with schizophrenia.

*Hum Psychopharmacol*. 2009; 24:301-8. 査読有

Kosaki R, Migita O, Takahashi T, Kosaki K.

Two distinctive classic genetic syndromes, 22q11.2 deletion syndrome and Angelman syndrome, occurring within the same family.

*Am J Med Genet*, 2009; 149A:702-5. 査読有

Kosaki R, Naito Y, Torii C, Takahashi T, Nakajima T, Kosaki K.

Split hand foot malformation with whorl-like pigmentary pattern: Phenotypic expression of somatic mosaicism for the p63 mutation.

*Am J Med Genet*, 2008;146:2574-2577. 査読有

### [学会発表](計4件)

高橋 孝雄

「発達障害の克服を目指す脳研究の抱える問題点、困難さについて」

「精神・神経疾患の克服を目指す脳科学研究(健康脳)ワークショップ」

平成23年2月8日, 東京

三橋 隆行

ダイオキシン胎内曝露による p27Kip1 を介した大脳皮質構築異常: 数学モデルを用いた解析

第41回慶應ニューロサイエンス研究会  
平成22年11月6日, 東京

Takahashi T.

Genetics / Environment interactions for human development.

XIth World Congress of International Child Neurology Association,  
平成22年5月5日, Cairo, Egypt.

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,  
平成22年4月17日, Taipei, Taiwan

### [図書](計3件)

三橋 隆行、高橋 孝雄。

東京大学出版会

発達科学入門 第2巻 I部 1. 胎児の発達, 2011, 印刷中

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.

Takahashi T, Fukuyama Y (eds).

*Biology of Seizure Susceptibility in Developing Brain*.

Progress in Epileptic Disorders Series, Vol. 6. John Libbey Eurotext, Montrouge (Paris), 2008. 総ページ数 232.

### [その他]

ホームページ等

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

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・准教授  
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