

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870292

研究課題名(和文) 神経堤細胞の多分化能に対する神経分化抑制因子Restの機能

研究課題名(英文) the functions of the Rest gene in neural crest cells

研究代表者

青木 仁美 (AOKI, Hitomi)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10550361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経分化抑制因子Restの非神経組織と神経組織における機能的役割の違いを、神経細胞と非神経細胞に分化する能力を有する神経堤細胞において解析した。Restは神経堤細胞の発生、分化、増殖には影響しないが、神経堤細胞由来の腸管神経節細胞の機能異常に寄与することを発見した。また、Restの発現の減少は未分化性維持に影響するため、Restの発現を制御することで、神経堤細胞の運命修飾や分化転換を試みた。細胞の運命を変えることはできなかったが、神経堤細胞からの派生する色素細胞前駆細胞の発生を障害する事を見出した。

研究成果の概要(英文)：RE1-silencing transcription factor (REST) is a transcriptional repressor of neural genes. Rest null mice have embryonic lethality which prevents further investigations of the functions of the Rest gene in vivo. I studied neonatal but not embryonic lethality that was characterized by gastrointestinal tract dilation in the neural crest cell (NCC)-specific Rest conditional knockout (CKO) mice. While no histological abnormalities except the thinning of the digestive tract as a consequence of the gas accumulation were found in the digestive tract of the mutant mice, they do not have proper gastric retention after oral dye administration and the reduction of acetylcholinesterase (AChE) activity in NCC-derived myenteric plexus in the stomach was detected. High CO₂ concentration in the dilated digestive tract of the Rest CKO mice indicates a failure of gut function by underdeveloped cholinergic transmission in the enteric nervous system.

研究分野：発生生物学、神経科学

キーワード：神経堤細胞 転写調節因子 神経分化制御 遺伝子組み換え コンディショナルノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

転写因子 “*Rest* (*RE-1-silencing transcription factor*)” は、無脊椎動物からヒトまで様々な動物に保存された master negative regulator で、神経分化抑制遺伝子として報告されている。

Rest は、RE-1 と呼ばれる 21塩基の DNA 配列に結合して転写を抑制する転写調節因子 (Cell 80, 949-957, 1995; Science 267, 1360-1363, 1995) として報告され、その標的遺伝子には神経分化に重要な遺伝子が多数含まれる。

Rest は未分化な ES 細胞から最終分化した神経に至る神経発生の全ての過程に関与し、*Rest* の発現は分化した神経細胞で失われるのに対し、非神経組織や未分化な神経前駆細胞では発現が維持されることから、神経幹細胞の可塑性消失にも関与していることが示唆されている。

しかしながら、*Rest* KO マウスは胎生 11.5 日目までに致死性を示す (Nat Genet 20, 136-142, 1998) ため、*Rest* の in vivo での役割や機能は明らかでない。

2. 研究の目的

Rest の非神経組織と神経組織における機能的役割の違いは、神経細胞と非神経細胞に分化する能力を有する神経堤細胞の分化過程においても発揮されることが期待される。

そこで本研究では、神経系と非神経系に分化する能力を有する神経堤細胞に注目し、

- ・ 神経堤細胞の分化決定機構における *Rest* の役割
- ・ 神経細胞、非神経細胞の分化における *Rest* の機能
- ・ *Rest* の発現制御による神経堤細胞の未分化性維持機構への影響

を *Rest* 遺伝子改変マウスを用いて解析し、*Rest* 遺伝子の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

Rest の機能を loss of function および gain of function の両面から調べるため、神経堤細胞特異的に発現する *Wnt1* プロモーターの下流で Cre recombinase を発現するマウスと *Rest* の機能部位である exon4 が loxP で挟まれたマウスを交配し、神経堤細胞特異的な *Rest* コンディショナルノックアウトマウス (CKO) マウスと、Doxycycline (Dox) の投与により *Rest* の発現を誘導できる、Dox 依存的な *Rest* 強制発現マウスを作製した。これらのマウスを用い

- ・ 神経堤細胞特異的な *Rest* 欠損による神経堤細胞の運命決定への影響

- ・ 全身性の *Rest* 発現制御が神経堤細胞の発生へ及ぼす影響

- ・ *Rest* の発現制御による神経堤細胞の未分化性維持機構への影響

を形態学的、および組織学的に解析し、**神経堤細胞の発生・分化における *Rest* の機能を明らかにする。**

4. 研究成果

(1) 神経堤細胞の分化決定機構における *Rest* の役割を、神経堤細胞特異的な *Rest* CKO マウスにより解析する。

神経組織とは異なり、非神経組織や非神経系の細胞では *Rest* 欠損により *Rest* によって抑制されていた神経関連遺伝子の発現が増加する。神経堤細胞からは神経系である感覚神経や交感神経と非神経系であるグリア細胞や色素細胞が発生する。そこで神経堤細胞特異的な *Rest* CKO マウスを用いて、*Rest* の欠損が神経堤細胞の分化へ与える影響を調べた。Cre の発現により遺伝子組換えが生じた神経堤細胞を追跡・識別できるように、レポーター遺伝子として *Rosa26R loxP-Stop-LoxP LacZ* を導入し、*Rest* を欠損した神経堤細胞を可視化した。

神経堤細胞特異的な *Rest* CKO マウスは発生学的な異常を示さず、神経堤細胞由来

細胞の発生や分化、増殖及び分布に明確な異常も観察されなかったが、生後消化管中にガスが充満し、生後すぐに致死となることを観察した。また胃の幽門部の収縮が見られず、胃で食べたものを貯留する機能が崩壊していることを観察した。そこで、神経堤細胞由来の腸管神経節細胞の異常を想定し、出生児における細胞増殖や分化、分布、機能的解析を行った。腸管神経節細胞の細胞増殖や分化、分布に有意な差は観察されなかったが、アセチルコリンエステラーゼ活性を評価したところ、胃や小腸といった上位消化管でアセチルコリンエステラーゼ活性が失われていることを発見した。

(2) 神経細胞、非神経細胞の分化における Rest の機能を、Rest CKO マウスにより解析する。

胎児期から新生児期の様々な神経堤細胞の発生段階に Dox を投与し Rest の発現を修飾するため、Dox 依存的な Rest 強制発現マウスを作製した。Dox 依存的な Rest 強制発現マウスにおいて、胎児期からあるいは成体において Dox 投与により Rest を強制発現させても明確な形態的異常や致死性は観察していない。さらに、in vivo で神経幹細胞や神経堤細胞およびこれらに由来する細胞の分化、増殖、分布を解析したが、優位な違いは検出されなかった。

神経堤細胞特異的な Rest CKO マウスは、先に述べたように新生児致死となるが、神経堤細胞特異的なヘテロ欠損の Rest CKO マウスは、腹部に高頻度で白斑を形成することを発見した。神経細胞では分化と共に Rest の発現が減少し、神経関連遺伝子の発現が増加することで神経細胞の分化が促進される一方で、非神経細胞では Rest の発現が維持され神経への分化が抑制される。そのため、神経堤細胞での Rest 欠損は、色素細胞へ分化することが運命付けられた神経堤細胞由来の細胞で、神経関連遺伝子の発現を脱抑制し、色素細胞の発生が障害されたことを示唆する。これらの観察から、神経堤細胞に由来する非神経細胞の分化が Rest の欠損により修飾される可能性を示

した。

(3) Rest の発現制御による神経幹細胞及び神経堤細胞の未分化性維持機構への影響を、Rest 発現制御マウス及び細胞により解析する。

これまでの解析から、in vivo での中枢神経における Rest の欠損は遺伝子発現や表現型に変化を示さないが、in vitro での神経幹細胞における Rest の欠損は細胞分化を促進し、神経幹細胞は Rest の発現を失いながら分化する。神経幹細胞同様神経と非神経に分化する神経堤細胞においても Rest の発現の減少がその未分化性維持に関与することが予想される。

これまでに Rest が単独で分化した細胞の運命を修飾したり分化転換を誘導したりする事は報告されていないが、Rest の発現の減少が幹細胞の未分化性維持に関与するため、Rest の発現を制御することで、神経幹細胞および神経堤細胞の多分化能の喪失ないしは運命修飾や分化転換を試みた。in vitro では Rest の発現の有無により細胞の転写が変わったが、細胞を分化転換させるには至らなかった。

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 3 件)

1. Aoki H, Hara A, Kunisada T. White spotting phenotype induced by targeted REST disruption during neural crest specification to a melanocyte cell lineage. Genes Cells. 2015 in press. 査読有り
DOI: 10.1111/gtc.12235
2. Aoki H, Hara A, Oomori Y, Shimizu Y, Yamada Y, Kunisada T. Neonatal lethality of neural crest cell-specific Rest knockout mice is associated with gastrointestinal distension caused by aberrations of

myenteric plexus. Genes Cells. 2014

19(10):723-42. 査読有り

DOI: 10.1111/gtc.12172

3. Kunisada T, Tezuka KI, Aoki H,

Motohashi T. Birth Defects Res C Embryo

Today. The stemness of neural crest cells

and their derivatives. Birth Defects Res

C Embryo Today. 2014 102(3):251-62. 査

読有り

DOI: 10.1002/bdrc.21079

〔学会発表〕(計 1件)

1. Kunisada T, Yamada Y, Hara A, Aoki H.

Gastrointestinal distension of neural crest

cell specific Rest transcription factor CKO

mice caused by aberrations of myenteric

plexus. 47th Annual Meeting of JABS. May

27th – May 30th, 2014. Nagoya, Aichi,

JAPAN.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

青木 仁美 (AOKI, Hirotmi)

岐阜大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10550361

(2)研究分担者

()

研究者番号：