

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10380

研究課題名(和文) マウスモデルを用いた水頭症発症機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms to develop hydrocephalus using mice model

研究代表者

磯貝 恵理子 (Isogai, Eriko)

千葉県がんセンター(研究所)・発がん研究グループ 実験動物研究室・上席研究員

研究者番号：40300917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経発生に重要なHES1の機能を修飾するLmo3 Hen2のダブルトランスジェニックマウス(Tg)では100%が水頭症を発症し、大脳皮質と神経幹細胞が存在す領域の厚みが減少し、神経細胞の前駆細胞(IPC)が胎生期の脳皮質で増加していた。胎仔脳室へのエレクトロポレーション法によるLmo3 Hen2両遺伝子の高発現ではIPCは増加するが神経細胞は増加せず、各遺伝子の高発現ではIPCが減少し神経細胞が増加した。従って、各遺伝子の高発現は未成熟な分化によるIPCの減少と幹細胞の枯渇を、両遺伝子の高発現は過剰なIPCの誘導による幹細胞の枯渇を惹起し異常な神経発生を誘導する事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：100% of double transgenic mice (Tg) of Lmo3 and Hen2 developed hydrocephalus. The cortex, ventricular and subventricular zone were thin and intermediate progenitor cells (IPC) were increased in cortex of embryo. Over-expression of both of Lmo3 and Hen2 by in utero electroporation increased IPC but not neuron and each of them decreased IPC and increased neuron. Therefore, over-expression of each gene might decrease IPC and deplete stem cells by premature neurogenesis. On the other hand, over-expression of both genes might deplete stem cells by induction of excess IPC. Both cases could lead to aberrant neuronal development and hydrocephalus.

研究分野：neuronal development

キーワード：神経発生 水頭症 モデル動物

1. 研究開始当初の背景

神経堤細胞は中枢神経系、末梢神経系、上皮色素細胞、副腎髄質細胞、甲状腺カルシトニン産生細胞等、多様な分化を示す。この分化は、多くの遺伝子の発現が、個体の発生過程において時間的、空間的に制御された結果起こると考えられる。一方、神経芽腫は代表的な交感神経系小児固形腫瘍のひとつであり、神経堤細胞の分化過程の異常により生じる腫瘍である。当研究所ではこれまでに、神経芽腫の予後の異なるサブセットから複数のcDNAライブラリーを作製し、5,400個の遺伝子を抽出して新規遺伝子を含む約400の予後に関連する遺伝子を同定した(Ohira M *et al.* Oncogene, 22:5525-36, 2003)。これらの遺伝子のうち、我々は神経発生関連遺伝子であるLMO3 (LIM-Only protein 3) とHEN2 (nescient helix loop helix 2: Nhlh2) が、神経幹細胞、神経発生に重要な働きをするHES1によるMASH1の転写制御に干渉して神経細胞の増殖を亢進させ、神経芽腫の発生あるいは悪性化に関与することを示した(Isogai E. *et al.*, PLoS ONE 6:e19297, 2011)。そこで、これらの神経幹細胞や神経発生に関連する遺伝子群の生体内での機能を検討するため、Lmo3、Hen2の各遺伝子を高発現させたトランスジェニック(Tg)

マウスを作製したところ、出生後早期に水頭症が起った(図1)。その発生頻度はバックグラウンド系統であるC57BL/6Jマウスの頻度(<0.01%)より高かった(表1)。水頭症は、脳室における脳脊髄液の蓄積と脳室の拡張を特徴とした主に乳幼児に起る疾患である。先天性の水頭症は脳の発生異常で引き起こされる。Lmo3、Hen2の水頭症Tgマウスでは、大脳皮質と神経幹細胞ニッチである

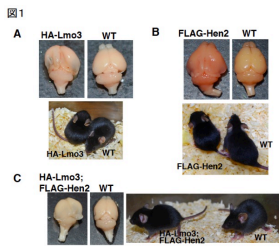
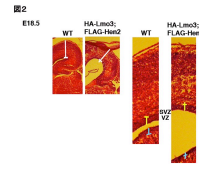


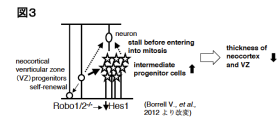
表1

	Hydrocephalus (%)
FLAG-Hen2 heterozygote	13.2
HA-Lmo3 heterozygote	9.5
FLAG-Hen2; HA-Lmo3	100

ventricular zone (VZ)の厚みが減少した(図2)。非常に似た形質がRobo1/2ダブルノックアウトマウスにおいて大脳発生時にVZ



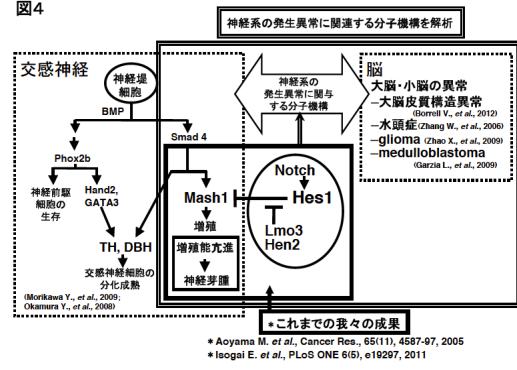
progenitorsのHes1発現量が減少した結果起こることが報告されている(図3)。



Notch signaling

とその下流で発現が誘導されるHes1、このHes1により発現が制御されるMash1は、神経堤細胞や交感神経系の発生のほか、中枢神経においても、神経幹細胞、脳の発生に関与することが知られており、この発生異常は水頭症、glioma、medulloblastoma等の神経疾患につながることを示されている。以上のことから、Hes1およびそれを取り巻く分子が機能的修飾を受け、交感神経以外に中枢神経系においても正常な神経発生が干渉され発生異常と疾患を引き起こす原因となることが考えられる(図4)。

図4



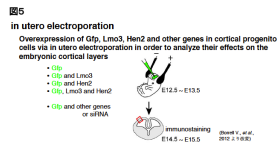
2. 研究の目的

上記の背景に基づき、神経幹細胞、神経発生の制御システムが、Lmo3やHen2等と関連してどのように神経発生異常、神経疾患の発症に関与するかについて検討する(図4)。

具体的には、水頭症の発生に関わる新規分子機構の同定を目的として、

- (1) 水頭症を発症するLmo3-Tg、Hen2-Tgマウスを解析し、神経発生異常や疾患発生との関連性をin vivoで検討した。

(2) マウス胎仔の脳室へのエレクトロポレーション法により、関連遺伝子を脳の幹細胞で発現させ、その効果を検討した (図5)。



### 3. 研究の方法

これまでに間脳中脳後脳、神経管背側と神経管から遊走してくる神経堤細胞に発現する Wnt1 promoter/enhancer (Joseph NM *et al*, 2004; Echelard Y *et al*, 1994) 下で HA-Lmo3 または FLAG-Hen2 を発現させた Tg マウスを作製した。これらのマウスでは出生後早期に水頭症が生じるが交配可能である。これらのマウスを用いて以下の解析を行った。

#### (1) 成体での解析

phenotype が見られたマウスは、脳について形態を検討し、関連遺伝子の発現と phenotype との関連性を解析した。Lmo3 と Hen2 の両 Tg マウスの hemizygote の掛け合わせにより相乗効果の解析をおこなった。

#### (2) 胎生期での解析

胎生期の脳について、構造、幹細胞、前駆細胞、神経細胞について、経時的に、HE染色や、マーカー分子 (Tbr2, Tuj1 等) に対する抗体による免疫染色で解析した。胎生期の場合、異常のあるマウスを必ずしも得ることは出来ないが、Lmo3-Tg と Hen2-Tg マウスの double Tg マウスの胎仔であれば高頻度で発生するので、double Tg マウスの胎仔を用いて解析した。

(3) エレクトロポレーション法による胎仔脳室への関連遺伝子の導入、幹細胞での発現と効果の検討

胎仔脳室へのエレクトロポレーション法により、Lmo3、Hen2 を脳の幹細胞で発現させ、効果を検討した。発現が確認されなかったり胎仔が死んでしまったりする場合は、インジェクション技術の練習と習得のほか、ベクターの種類、注入する DNA の純度や量、電流値、電圧値などを検討した。

## 4. 研究成果

(1) 中枢・末梢神経系の発生に重要な転写因子 HES1 の機能を修飾する Lmo3 と Hen2 を高発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを作製し解析したところ、中枢神経系の発生異常と水頭症が引き起こされた。従って、本 Tg マウスは水頭症モデルとして重要であり水頭症の発症機構の解明につながると思われる。水頭症の発生頻度は、Lmo3 と Hen2 の両 Tg マウスの hemizygote では野生型マウスに比較して有意に高く、両 Tg マウスの hemizygote を掛け合わせたダブル Tg マウスでは 100% が水頭症を発症した。発症した 3 週令マウスの脳の形態を検討したところ、大脳皮質の厚みが減少し脳室が拡大していた。両 Tg マウスの hemizygote では、水頭症の主要な原因である中脳水道の狭窄が観察されたが、ダブル Tg マウスでは観察されなかった。従って本 Tg マウスの水頭症の原因は中脳水道の狭窄だけではなく、大脳の発生異常の可能性が示唆された。ダブル Tg マウスの胎生 18.5 日では、大脳皮質および神経幹細胞が存在する脳室周辺の領域の厚みが減少していた。この大脳の異常は胎生 13.5 日では観察されなかった。胎生 13.5 日は幹細胞の増殖と神経発生が進行している時期なので、本 Tg マウスでは大脳皮質の発生異常が生じ、その後水頭症が起っていることが考えられた。脳室周辺領域の厚みの減少は、神経幹細胞の分裂様式が対称分裂から非対称分裂に変化することによっても起るので、胎生 13.5 日の大脳皮質を神経細胞特異的な抗体で免疫染色したところ、野生型と比較して Tg マウスで異常は観察されなかった。従って本 Tg マウスでは、Lmo3 と Hen2 が協調的に作用して神経前駆細胞の発生に干渉し、大脳における神経発生の異常を引き起こしていることが示唆された。

(2) 大脳の前駆細胞である radial glia cells が非対称分裂をして生じる、神経細胞の前段階の細胞である intermediate progenitor cells (IPC) について、そのマーカー蛋白質 Tbr2 に対する抗体で免疫染色して検討した。胎生 12.5 日と 13.5 日の大脳皮質では、野生型と比較してダブル Tg マウスで IPC の有意な増加が観察された。このことをさらに検証するために、胎生 13.5 日の胎仔脳室へのエレクトロポレーション法により Lmo3 と Hen2 を幹細胞で高発現させ、胎生 14.5 日の大脳皮質の IPC について検討した。コントロールの胎仔脳に比較して、Lmo3 と Hen2 を高発現させた胎仔脳では IPC の有意な増加が観察された。従って、本 Tg マウスでは、Lmo3 と Hen2 が協調的に作用して、神経前駆細胞から過剰な IPC を誘導し、神経幹細胞の枯渇と大脳における神経発生の異常を引き起こしていることが示唆された。

(3) Lmo3、Hen2 単独の効果を検討する為に各遺伝子を脳の幹細胞で高発現させたところ、IPC が減少し神経細胞が増加した。一方、両遺伝子を高発現させた胎仔脳では IPC が増加していたが神経細胞の増加は観察されなかった。従って、Lmo3、Hen2 各遺伝子単独の高発現は神経細胞への未成熟な分化の亢進による IPC の減少と幹細胞の枯渇を、両遺伝子の高発現は過剰な IPC の誘導による幹細胞の枯渇を起こすことを示唆した。いずれの場合も大脳皮質において異常な神経発生とひいては水頭症の発生を誘導するものと考えられ、本研究の結果から水頭症の発生機構の解明につながる事が期待される。

#### 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 4 件)

① The parathyroid hormone regulates skin tumour susceptibility in mice. Okumura K, Saito M, Yoshizawa Y, Munakata H, Isogai E, Miura I, Wakana S, Yamaguchi M, Shitara H, Taya C, Karaplis AC, Kominami R,

Wakabayashi Y. Sci Rep., 7(1):11208-11223 2017

② CENP-R acts bilaterally as a tumor suppressor and an oncogene in the two-stage skin carcinogenesis model. Okumura K, Kagawa N, Saito M, Yoshizawa Y, Munakata H, Isogai E, Fukagawa T, Wakabayashi Y. Cancer Sci., 108(11): 2142-2148 2017

③ *Meis1* is required for c-Met inhibition to suppress cell proliferation of skin squamous cell carcinoma cells. Saito M, Okumura K, Yoshizawa Y, Munakata H, Isogai E, Wakabayashi Y. Journal of Biosciences and Medicines., 4:53-65 2016

④ Oncogenic *Lmo3* cooperates with *Hen2* to induce hydrocephalus in mice. Isogai E, Okumura K, Saito M, Yoshizawa Y, Itoh K, Tando S, Ohira M, Haraguchi S, Nakagawara A, Fushiki S, Nagase H, Wakabayashi Y. Exp. Anim., 64(4):407-414 2015

[学会発表] (計 27 件)

① Identification and functional characterization of genetic modifiers of *Stmm3* locus controlling tumor progression, Saito M, Okumura K, Yoshizawa Y, Munakata H, Isogai E, Wakabayashi Y, 第 76 回日本癌学会学術総会、プログラム、96、2017

② Parathyroid hormone suppresses skin-tumorigenesis by increasing intracellular calcium in keratinocytes, Okumura K, Saito M, Yoshizawa Y, Munakata H, Isogai E, Kominami R, Wakabayashi Y, 第 76 回日本癌学会学術総会、プログラム、71、2017

③ 発がん抵抗性遺伝子座 *Stmm3* の原因遺伝子の同定と機能解析、齋藤 慈、奥村 和弘、吉澤 康博、宗形 春花、磯貝 恵理子、若林 雄一、第 30 回モロシヌス研究会、プログラム、19、2017

④ 神経芽腫関連遺伝子 *Lmo3* と *Hen2* は、協調的に機能してマウスにおける水頭症の発症に関与している、磯貝 恵理子、奥村 和弘、齋藤 慈、吉澤 康博、宗形 春花、伊藤 恭子、丹藤 創、大平 美紀、原口 精輝、中川原 章、伏木 信次、永瀬 浩喜、若林 雄一、第 39 回日本分子生物学会年会、プログラム、194、2016

⑤ マウス扁平上皮がん由来細胞を用いた c-Met 阻害における *Meis1* の機能解析、齋藤 慈、奥村 和弘、吉澤 康博、宗形 春花、磯貝 恵理子、若林 雄一、第 39 回日本分

子生物学会年会、プログラム、194、2016

⑥皮膚悪性腫瘍においてMeis1が制御する下流因子の探索、吉澤 康博、奥村 和弘、齋藤 慈、宗形 春花、青戸 良賢、磯貝 恵理子、榊原 康文、若林 雄一、第39回日本分子生物学会年会、プログラム、194、2016

⑦ChIP sequencing suggests that Meis1 regulate glucose metabolism in skin carcinoma induced by DMBA-TPA carcinogenesis、Yoshizawa Y、Okumura K、Saito M、Munakata H、Aoto Y、Isogai E、Sakakibara Y、Wakabayashi Y、第75回日本癌学会学術総会、プログラム、163、2016

⑧ChIP sequence をもちいた皮膚腫瘍におけるMeis1の機能解析、吉澤 康博、奥村 和弘、齋藤 慈、青戸 良賢、磯貝 恵理子、榊原 康文、若林 雄一、第63回日本実験動物学会総会、講演要旨集、43、2016

⑨副甲状腺ホルモンのマウス皮膚腫瘍形成における機能、奥村 和弘、齋藤 慈、磯貝 恵理子、三浦 郁生、若菜 茂晴、島貫 碧、設楽 浩志、多屋 長治、木南 凌、若林 雄一、第62回実験動物学会総会講演要旨集、171、2015

⑩マウス皮膚発がんモデルを用いたがん抵抗性/感受性遺伝子の同定、奥村 和弘、齋藤 慈、吉澤 康博、磯貝 恵理子、若林 雄一、日本遺伝学会第87回大会プログラム 2015

⑪マウス皮膚発がんにおける副甲状腺ホルモンの機能解析、奥村 和弘、齋藤 慈、吉澤 康博、磯貝 恵理子、木南 凌、若林 雄一、第74回日本癌学会学術総会 プログラム、103、2015

⑫腫瘍悪性化を制御するStmm3遺伝子座の遺伝学的解析、齋藤 慈、奥村 和弘、磯貝 恵理子、若菜茂晴、木南 凌、若林 雄一、第74回日本癌学会学術総会 プログラム、102、2015

〔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：  
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

磯貝 恵理子 (ISOGAI, Eriko)  
千葉県がんセンター研究所・実験動物研究室・研究員  
研究者番号：40300917

(2)研究分担者

若林 雄一 (WAKABAYASHI, Yuichi)  
千葉県がんセンター研究所・実験動物研究室・室長  
研究者番号：40303119

(3)連携研究者

大平 美紀 (OHIRA, Miki)  
千葉県がんセンター研究所・がんゲノム研究室・室長  
研究者番号：20311384

(4)連携研究者

長谷川 祐三 (HASEGAWA, Yuzo)  
千葉県がんセンター研究所・脳神経外科・医師  
研究者番号：60436409