

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19693

研究課題名(和文) ヒストンメチル化機構の異常が脳皮質発生に与える影響に関する研究

研究課題名(英文) Effects of abnormal histone methylation on cerebral cortical histogenesis

研究代表者

坂口 友理 (SAKAGUCHI, YURI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：40464888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では過成長をきたす先天奇形症候群の原因について、脳皮質を形成する神経幹細胞の細胞分裂動態および皮質構築を解析することを目標に実施した。具体的にはSotos症候群の原因でありヒストンメチル化酵素であるNSD1蛋白を神経幹細胞でのみ減少させることが可能なトランスジェニックマウスを作成し、解析を試みた。RNA干渉現象を応用したが有効に機能せず、再現性をもってNSD1蛋白を減少させうるマウスを作成することができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、知的障害の重要な原因としてエピジェネティックな異常、すなわち遺伝子の塩基配列変化を伴わない遺伝子発現メカニズムの異常が、中枢神経異常を合併する先天奇形症候群の病態メカニズムとして注目されている。事実、塩基配列を調べても異常を検出できない症例が半数以上存在する点が次世代シーケンサーによる研究で明らかになりつつある。本研究はこれら原因不明の病態メカニズムを解明することを目標に実施した。

研究成果の概要(英文)：We focused our research on roles of histone methylation on cell cycle kinetics of neuronal progenitor cells (NPCs). In detail, we have attempted to generate transgenic mice that would be capable of decreasing expression levels of NSD1 protein in the NPCs, by combining RNA interference strategy and tetracycline inducible system. NSD1 is a histone methyl transferase, a causative protein for overgrowth syndrome Sotos syndrome. However, we were unable to generate stable and functional transgenic mice lines.

研究分野：医歯薬学

キーワード：神経発生 細胞周期 エピジェネティクス

## 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プログラム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。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とグリアおよび興奮性ニューロンと抑制性ニューロンについて、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、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と考える。

近年、知的障害の重要な原因としてエピジェネティックな異常、すなわち DNA 塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現メカニズムの異常が、中枢神経異常を合併する先天奇形症候群の病態メカニズムとして注目されている。真核生物の核内においては、DNA はヒストン蛋白にまきつく形でクロマチン構造をとり、ヒストンの化学的修飾（アセチル化、メチル化、リン酸化）によりクロマチンの三次元構造が変化することで、クロマチンにまきついている DNA の転写活性に変化を生じると考えられている。これらの転写活性の変化は塩基配列に非依存的に生じることからエピジェネティクス機構の主要なメカニズムと想定されている。

本研究では過成長・悪性腫瘍の合併・知的障害・先天性心疾患や腎尿路の異常を特徴とする先天異常症候群の一つである Sotos 症候群に着目した。Sotos 症候群はヒストンメチル基転移酵素活性を持つ *NSD1* 遺伝子のヘテロ変異により発症することから、その発症にはメチル化ヒストンの異常な減少が関係していると考えられる。具体的には、*NSD1* はヒストン H3 の 36 番目リジン残基（H3K36）およびヒストン H4 の 20 番目リジン残基（H4K20）へメチル基を特異的に転位し、一方 H3K36 の脱メチル化は Jhd1b 型ヒストンリジン脱メチル酵素によって触媒される。Jhd1b は細胞周期の調節を担う重要分子であることから、*NSD1* 酵素活性の異常が細胞周期調節機構を破たんさせることで神経細胞数を異常に増加させる結果、大頭症や頭囲の過成長、生後の高い腫瘍発生率につながる可能性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究では、神経幹細胞特異的、かつ時期特異的に *NSD1* 蛋白発現量を減少させることで神経幹細胞の細胞分裂動態の異常とそれらから形成される大脳皮質構築異常を解析し、Sotos 症候群の病態メカニズムの解明を目指した。まず *NSD1* 蛋白量を減少可能な RNA 干渉配列をもとにトランスジェニックマウスを作成し、神経幹細胞の細胞分裂動態に与える影響を解析、その結果として大脳皮質構築にどのような異常を生じるのかについて検討を加え、Sotos 症候群に認められる大頭症、過成長の原因が神経幹細胞の分化誘導の異常で説明可能であるかについて研究を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) *NSD1* 遺伝子に対する RNA 干渉を生じるプラスミドの作成

理論上 *NSD1* 蛋白発現量を減少することが可能なマイクロ RNA (miRNA) を複数設計し、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。本プラスミドを培養細胞にトランスフェクトしその効果を確認した。

具体的にはオンラインの RNAi Designer (Life Technologies 社) を使い、*NSD1* 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検討した。それらをもとに相補的な DNA 配列を合成し、pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR プラスミドに挿入した (pcDNA-*NSD1*RNAi)。本プラスミドは CMV プロモータを持つことから哺乳類細胞において RNA を発現可能である。

pcDNA-*NSD1*RNAi プラスミドを培養細胞 (PC12) にトランスフェクトし、*NSD1* 蛋白の発現量が減少するかを *NSD1* に対する抗体を用いたウエスタンブロット法で確認した。

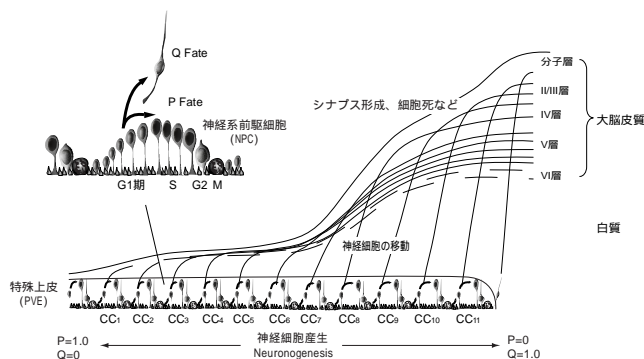
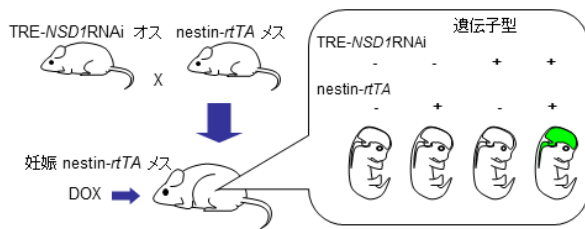


図1 大脳皮質の発生過程

大脳皮質を形成する神経幹細胞はマウスにおいて計 11 回分裂し、分裂回数前半の細胞は皮質深層に、後半の細胞は皮質表層に移動する。分化誘導の確率 Q 値は発生過程が進むにつれて 0 から 1 に増加する。



**図2 神経幹細胞特異的・時期特異的ダブルトランスジェニックマウス**  
ドキシサイクリン (DOX) 投与により TRE-*NSD1*RNAi と *nestin-rtTA* 遺伝子を両方持つ胎児において NSD1 蛋白量が減少する (灰色)。

次に pcDNA-*NSD1*RNAi より RNAi を生じる配列を pTRE-Tight プラスミドにクローニングし、pTRE-*NSD1*RNAi を作成した。

## (2) 神経幹細胞特異的に NSD1 蛋白量を減少させるトランスジェニックマウスの作成

### 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を改変した逆 Tet リプレッサー (rTetR) を用いた融合体 rtTA は、ドキシサイクリン存在下で tet オペレーター配列 (*tetO*) に結合しその下流遺伝子の転写を促進する。本研究では神経幹細胞に特異的な発現が知られている nestin 蛋白の転写調節領域 (イントロン I I 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, 本マウスは米国 Jackson 研究所より導入済みのラインを使用した)。

### TRE-*NSD1*RNAi 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、前述の pTRE-*NSD1*RNAi プラスミドを元に TRE-*NSD1*RNAi 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 *NSD1*RNAi 転写産物を発現する。TRE-*NSD1*RNAi トランスジェニックマウスのオスを nestin-rtTA トランスジェニックマウスのメスと交配し、ドキシサイクリンを母親に投与すると、特定の時期に NSD1 蛋白質を神経幹細胞にのみ減少させることが可能である (図 2)。

## (3) BrdU を用いた Cumulative Labeling 法による細胞分裂動態の解析

前述の方法で交配した胎生 14 日の胎仔を孕む母マウスに午前 9 時から DNA 合成 (S) 期のトレーサー BrdU を腹注した。2 時間後に母マウスをペントバルビタールで麻酔し、胎仔前脳を摘出、4%パラフォルムアルデヒド (PF) で固定後パラフィン包埋し、厚さ 4 μm の連続冠状断切片を作成した。胎仔の体部から体細胞遺伝子を抽出し、遺伝子型を PCR で解析した。抗 BrdU 抗体 (AbD Serotec 社) を用いた免疫組織化学染色後、共焦点レーザー顕微鏡で画像を取り込み、神経幹細胞のうち BrdU 陽性細胞の割合 (Labeling Index, LI) を計測した。

## 4. 研究成果

### (1) *NSD1* 遺伝子に対する RNA 干渉を生じるプラスミドの作成

上記方法に従い、RNAi Designer で NSD1 蛋白を減少させ得る配列を 5 個同定し、DNA 配列を合成して pcDNA-*NSD1*RNAi を作成した。これらを PC12 細胞にトランスフェクトし、NSD1 蛋白の発現量を確認したところ、2 種類において NSD1 蛋白が減少することを確認したが、複数回の実験において再現性が安定しなかった。

### (2) 神経幹細胞特異的に NSD1 蛋白量を減少させるトランスジェニックマウスの作成

(1) で同定した 2 種類の配列のうち、NSD1 蛋白発現量を減少させることが可能と思われる一つより pTRE-*NSD1*RNAi を作成、それらを元に TRE-*NSD1*RNAi トランスジェニックマウスを作成した。合計 2 ラインを得、それらのオスを nestin-rtTA トランスジェニックマウスのメスと交配し、胎生 12 日目より 2 日間、体重 g あたり 50 μg/day のドキシサイクリンを経口投与した。対照群にはリン酸緩衝生理食塩水を投与した。

胎生 14 日目の胎児を摘出し、大脳壁を実態顕微鏡下で分離したうえで蛋白を抽出した。同時に胎仔体部よりゲノムを抽出して遺伝子型を PCR で判定した。抗 NSD1 抗体を用いたウエスタンブロット法で NSD1 蛋白発現量を確認したが、再現性をもって NSD1 蛋白の減少を認めなかった。

(3) BrdU を用いた Cumulative Labeling 法による細胞分裂動態の解析

前述のウエスタンブロット法による NSD1 蛋白質量の検出感度が不十分な可能性を考慮し、生体内で細胞分裂動態への影響を解析した。胎生 12 日より 2 日間ドキシサイクリンを投与のうえ胎生 14 日目の 2 時間 BrdU LI を計測したが、変動を認めることができなかった。

NSD1 蛋白質を減少できなかった理由として、NSD1 に対する RNA 干渉が何等かの理由で安定しない、トランスジェニックマウスにおいて miRNA 発現量が不十分であった可能性が考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.keio.ac.jp/research/faculty/42/>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：高橋 孝雄

ローマ字氏名：TAKAHASHI, Takao

研究協力者氏名：三橋 隆行

ローマ字氏名：MITSUHASHI, Takayuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。