

令和元年6月3日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06563

研究課題名(和文) 大脳皮質形成における環境ストレス応答下流カスケードの解析

研究課題名(英文) Analysis of environmental stress response downstream cascade in cerebral cortex formation

研究代表者

石井 聖二 (Ishii, Seiji)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任講師

研究者番号：50468493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質特異的に一次繊毛を欠損したマウス(Ift88 cKOマウス)を作製し、生後7日目のIft88 cKOマウスにアルコールを投与したところ、Ift88 cKOマウスでは、細胞質内に特異的な斑点状の活性型Caspase-3シグナルが多数散在する事を見出した。そこで、アルコール曝露下でのcKOマウス群における神経細胞の樹状突起の長さ、および分枝の複雑度を解析したところ、いずれも優位に減少することを見出した。以上の結果から、臨界期後に一次繊毛に依存して誘導されるストレス応答シグナルの存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一次繊毛の形成、機能異常に起因すると考えられている遺伝性疾患は総称して繊毛病(シリオパチー)と呼ばれ、網膜色素変性症、嚢胞腎、多指症、水頭症、不妊、肥満など、多岐にわたる症状を呈することが知られている。本研究において「環境ストレスに対する一次繊毛を介した臨界期中枢神経系の防御機構」の分子基盤を明らかにする事で、ストレス応答という新たな視点から一次繊毛に対する理解が深まるものと期待される。本研究において得られた知見は、今後、多岐にわたる繊毛病の発症メカニズムの理解や新たな治療法への応用に貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To test the roles of cilia in brain development under exposure to environmental insults, we utilized a conditional knockout (cKO) of intraflagellar transport 88 (Ift88). Ift88 floxed mice were crossed with mice carrying the transgene Emx1-IRES-Cre (Emx1-Cre) by which Cre is expressed specifically in the dorsal pallium-originated cortical cells. The number of activated caspase-3-positive neurons remained small 24 hours post exposure in conditional heterozygote (cHet) control mice, while the number was significantly larger in cKO mice. We next found that dendritic complexity was significantly decreased; Thy1-YFP-labeled layer V neurons in EtOH-exposed cKO mice exhibited fewer dendrites with fewer and shorter branches than those in other groups. These results suggest that there might be the primary cilia-dependent neuroprotective function activated by environmental stress.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：大脳皮質 樹状突起 環境ストレス応答 アルコール曝露

## 1. 研究開始当初の背景

高次脳機能の中心的な役割を担う大脳皮質は、特に胎生期においては X 線、アルコール、メチル水銀等の様々な環境ストレスに対して脆弱であり、胎生期における環境ストレスと精神疾患の発症との関連が注目されている。これまでの臨床研究および動物モデルを用いた研究から、これらの危険因子は、いずれも大脳皮質の構造異常や、てんかん発作等を引き起こすことが知られている。多様な環境ストレスが共通した表現型をもたらすことは、これらに共通した分子経路の存在を示唆する。様々なストレスにより発現が誘導され、微生物からヒトに至る細胞で働く普遍的な防御因子として熱ショックタンパク質(HSP)があるが、興味深いことに、アルコール曝露により胎生期の大脳皮質では、HSP が活性化する(Hashimoto-Torii K. et al., PNAS (2011))。

申請者らは、HSP の発現を誘導する転写因子のヒートショックファクター(HSF1)の機能を解析するため、HSF1 機能欠損マウスの胎生期に環境ストレスを与えると、細胞死が亢進されるとともに、生後マウスでてんかん発症率が上昇することを見出した(Hashimoto-Torii K. et al, Neuron (2014))。この結果、HSF1 は大脳皮質において環境ストレスから細胞を守ることに寄与することが明らかとなった。次に、HSF1 が結合する配列(HSE)を有するレポーターマウスを作製し、様々な胎生期の環境ストレスに応答する脳内の細胞を初めて検出することにも成功した。また、過度の環境ストレス応答がニューロンの移動を阻害することを明らかにした(Torii M. et al, PNAS (2017))。

さらに、申請者が HSF1 の機能を詳細に調べる中で、HSF1-HSP の応答レベルが細胞間ではばらつくことを発見した(Ishii S. et al., Nat Commun (2017))。また、胎生 14 日のマウス大脳皮質に電気穿孔法を用い遺伝子導入すると、活性型 HSF1(caHSF1) を発現するニューロンは、正常に移動できずに白質付近に留まり、詳細な電顕観察の結果、細胞接着が異常となることを明らかにした。これらの申請者の研究により、本来は細胞の保護に必要な HSF1 が過剰に働くと、大脳形成に異常を来すことが初めて示された。しかし、HSF1-HSP の下流で、いかに細胞接着や細胞移動が制御されているのかは全くわかっていなかった。

## 2. 研究の目的

これまで、HSF1 や HSP は、有用なモデル系として古くから培養細胞を中心に多くの研究室で盛んに研究されてきたが、申請者は、マウス個体の脳を用い、新しい視点と独自の実験系で HSF1 と HSP の下流カスケードを解明することを目的とした。具体的には下記の 4 つ (1) 胎生期の脳における HSF1-HSP 下流候補因子の同定、(2) smFISH による HSF1-HSP 下流候補因子の検定、(3) ストレス応答で発現が増大する遺伝子の脳内機能解析、(4) ストレス応答で発現が減少する遺伝子の脳内機能解析、を中心に進めることを計画した。

## 3. 研究の方法

### (1) HSF1-HSP 下流候補因子の同定

HSE-RFP レポーターマウスは高感度で、HSF1 活性化細胞を検出できる(Ishii S. et al., Nat Commun (2017))。そこで、HSE-RFP レポーターマウスを有する母親マウスにアルコールを腹腔内投与し、胎生 14 日の大脳皮質背側の RFP 陽性領域を切り出し、RNA を精製し、RNA-Seq を実施する。対照として PBS 投与群およびアルコール投与群 RFP 陰性領域を用いる。RNA-Seq の結果から、発現が変動する HSF1-HSP 下流候補因子群のうち、発現が増大する群と発現が減少する群にグループ分けする。

### (2) smFISH による HSF1-HSP 下流候補因子群の絞り込み

申請者は、ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞培養系を用い、過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)やメチル水銀(MeHg)などの環境ストレスにより、HSP70 の mRNA の細胞間における発現量の不均一性が、顕著に異なることを見出している(Ishii S. et al., Nat Commun (2017))。この実験系を用い、HSF1-HSP 下流候補因子群のうち、アルコール曝露した胎生 14 日のマウス大脳皮質において smFISH を実施し、Hsp70 mRNA の転写産物数と正もしくは負の相関を示す因子に絞り込む。

### (3) ストレス応答で発現が増大する下流候補遺伝子の解析

アルコール曝露で発現が増大し、上記の(2)で正の相関を示した下流候補遺伝子の cDNA を理研バイオバンク等から入手し、恒常的プロモーター-CAG の下流に挿入した発現ベクターを作製する。電気穿孔法により胎生 14 日の大脳皮質に GFP と共に導入し、細胞移動を検討する。一方、胎生 14 日の大脳皮質に caHSF1 と下流候補遺伝子の siRNA を GFP と共に導入し、細胞の正常移動が回復するかどうかを検討する。接着の解析には N-cadherin やβ-catenin 等に対す

る抗体を用い、免疫染色法を用い詳細に調べる。

#### (4) ストレス応答で発現が減少する下流候補遺伝子の解析

アルコール曝露で発現が減少し、上記の(2)で負の相関を示した下流候補遺伝子の siRNA を GFP と共に導入し、電気穿孔法により胎生 14 日の大脳皮質にこれらの遺伝子をノックダウン後、細胞の移動や接着を caHSF1 の強制発現と比較する。一方、上記の(3)と同様に発現ベクターを作製し、胎生 14 日の大脳皮質に下流候補遺伝子を caHSF1 と共導入後、caHSF1 の表現型を抑えるかどうか検討する。接着の解析には N-cadherin や  $\beta$ -catenin 等に対する抗体を用い、免疫染色法を用い詳細に調べる。

#### 4 . 研究成果

これまでの研究代表者の研究により、ストレス応答して熱ショックシグナル経路が過剰に活性化したニューロンは、細胞の接着と移動が異常となることが初めて示された。しかし、ストレス応答から細胞の接着や移動の異常に至る経路は、全く不明であった。そこで、環境ストレスに応答する細胞内の現象をマウス個体の胎生期の脳内で調べることにより、環境ストレスと胎生期の脳の発生との関係を解明する予定であった。しかし、熱ショックシグナル経路と一次繊毛は、機能的相互作用があるという過去の報告があることから(Takaki E. et al., J. Biol. Chem., 2007)、一次繊毛が神経細胞において HSF1-HSP シグナル経路の活性を調節することが想定された。そこで、初めに研究代表者は一次繊毛が胎生期の神経細胞において熱ショックシグナル経路の活性を抑制することで、環境ストレスに対して脆弱になるという仮説を新たに立て、研究を開始した。興味深いことに、胎生期にはほぼ存在しない大脳皮質の神経細胞の一次繊毛は、生後 3 週目までに成熟するということが知られているため、神経細胞の環境ストレスに対する脆弱性が上昇する時期と、一次繊毛の成熟する時期に相関が見られるのではないかと考えた。また、哺乳動物細胞の一次繊毛は、細胞外のシグナルを感知するセンサーとして発生に必要なシグナル伝達に参与し、ヘッジホッグなどの細胞外シグナル依存的にその受容体を一次繊毛膜上に蓄積することにより、細胞外シグナルを増強することから、大脳皮質神経細胞は、生後 3 週目以降は、一次繊毛を起点としたストレス応答性を獲得するという仮説に修正し、研究を進めることにした。これまでに、大脳皮質特異的に一次繊毛を欠損したマウス(Ift88 cKO マウス)を作製し、生後 7 日目の Ift88 cKO マウスにアルコールを投与したところ、Ift88 cKO マウスでは、細胞質内に特異的な斑点状の活性型 Caspase-3 シグナルが多数散在する事を見出した。そこで、アルコール曝露下での cKO マウス群における神経細胞の樹状突起の長さ、および分枝の複雑度を解析したところ、いずれも優位に減少することを見出した。以上の結果から、臨界期後に一次繊毛に依存して誘導されるストレス応答シグナルの存在が示唆された。

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

- (1) Imaizumi K., Fujimori K., **Ishii S.**, Otomo A., Hosoi Y., Miyajima H., Warita H., Aoki M., Hadano S., Akamatsu W., Okano H. Rostrocaudal Areal Patterning of Human PSC-Derived Cortical Neurons by FGF8 Signaling. *eNeuro*. 2018 Apr 26;5(2) (DOI: <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0368-17.2018>) (査読有)
- (2) Son A.I., Opfermann J.D., McCue C., Ziobro J., Abrahams J.H. 3rd, Jones K., Morton P.D., **Ishii S.**, Oluigbo C., Krieger A., Liu J.S., Hashimoto-Torii K, Torii M. An Implantable Micro-Caged Device for Direct Local Delivery of Agents. *Sci Rep*. 2017 7(1):17624 (DOI: 10.1038/s41598-017-17912-y) (査読有)
- (3) **Ishii S.**, Torii M., Son A.I., Rajendraprasad M., Morozov Y.M., Kawasaki Y.I., Salzberg A.C., Fujimoto M., Brennand K., Nakai A., Mezger V., Gage F.H., Rakic P., Hashimoto-Torii K. Variations in brain defects result from cellular mosaicism in the activation of heat shock signaling. *Nature Commun*. 2017 8:15157 (DOI: 10.1038/ncomms15157) (査読有)
- (4) Torii M., Sasaki M., Chang Y.W., **Ishii S.**, Waxman S.G., Kocsis JD, Rakic P, Hashimoto-Torii K. Detection of vulnerable neurons damaged by environmental insults in utero. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017 Feb 28;114(9):2367-2372. (DOI: 10.1073/pnas.1620641114) (査読有)

[学会発表](計 1 件)

**Ishii S.**, Mohammad S., Sasaki T., Torii M., and Hashimoto-Torii K. IGFR-Akt signaling through primary cilia protects degeneration of developing neurons in exposure to environmental stress (学会名: 第 47 回北米神経科学学会 (国際学会)、発表年: 2017)

〔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

『NEWS & EVENTS (NIAAA)

<https://www.nih.gov/news-events/nih-funded-mouse-study-sheds-light-neural-risks-associated-prenatal-alcohol-exposure>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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。