

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07833

研究課題名(和文)培養系病態モデルを用いた神経管異常発症機構の解析

研究課題名(英文)Study for mechanism of neural tube defect with cell culture system

研究代表者

尾身 実(Omi, Minoru)

藤田医科大学・医学部・助教

研究者番号：00400416

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)：神経管異常は中枢神経の先天的形成異常であり、運動機能などに支障を来す疾患であるが、発症の仕組みはいまだ明らかでない。本研究では、神経管異常を引き起こすバルプロ酸を用い、神経管異常発症の仕組みの一端を解明することを目的とした。ES細胞由来の神経細胞にバルプロ酸を作用させると、細胞死の亢進が見られた。バルプロ酸により発現が上昇する遺伝子をRNA-Seqにより選び、強制発現すると細胞死が亢進した。shRNAで着目遺伝子の機能を阻害すると、細胞死抑制の傾向が見られた。したがってバルプロ酸は現在着目している遺伝子を介して神経細胞死を誘発していること、この細胞死が神経管異常に関わっていることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経管異常は中枢神経の先天的形成異常であり、脊椎二分症や脳ヘルニアといった中枢神経の奇形を引き起こし、運動機能などに支障を来す。重篤な場合には出生直後に死にいたる。神経管異常の発症率は0.1%から0.2%と極めて高く、生涯にわたって健康面に問題を抱え続けることになるため、その発症機構の解明および予防法や治療法の開発は医学的にも社会的にも重要な課題である。本研究では神経管異常を誘発するバルプロ酸を用い解析を行ったところ、バルプロ酸は神経細胞死を誘発している可能性が示唆された。また、その作用を介在する遺伝子が候補として挙げられた。これらの結果は神経管異常の仕組みの解明や予防に資すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neural tube defect is a congenital disease and causes serious problems like movement disorder. As its incidence rate is high, 0.1 - 0.2%, therapies for this disease have to be developed as soon as possible.

Valproic acid is a chemical which induces neural tube defect in embryos of human and mouse. To elucidate the mechanism of the neural tube defect, effects of valproic acid on neural cells were studied. When cultured neural cells derived from es cells were treated with valproic acid, cell death was increased. RNA-seq analysis indicated over one thousand genes that were affected by valproic acid. One of the gene was overexpressed, cell death was increase. On the other hand, downregulation of the gene with shRNA show tendency of cell death suppression. These results suggest that valproic acid may cause neural tube defect by inducing cell death and that the picked-up gene may mediate the effect of valproic acid.

研究分野：神経科学

キーワード：神経発生

1. 研究開始当初の背景

神経管異常は中枢神経組織の先天的な形成異常である。脊椎二分症や脳ヘルニアといった中枢神経の奇形を引き起こし、運動機能などに支障を来す疾患である。無脳症など重篤な場合には出生直後に死にいたる (Annu. Rev. Genet., 48, 583-611, 2014)。神経管異常は、胎児期における神経管の形態形成時の異常、とりわけ神経管の閉鎖不全によって引き起こされるが、発症する仕組みの全貌はいまだ明らかとなっていない。しかし、神経管異常の発症率は1000人あたり1~2人と極めて高いもので、生涯にわたって健康面に問題を抱え続けることになるため、その発症機構の解明および予防方法や治療方法の開発は医学的にも社会的にも重要な課題である。

バルプロ酸は抗てんかん薬および精神安定薬として使用されている薬剤である。一方でバルプロ酸は催奇性を有しており、妊娠初期での服用は胎児に神経管異常を誘発することが知られている。バルプロ酸が神経管異常を引き起こす仕組みについてはいまだ不明の部分が多いが、この催奇性はヒトのみならずマウスにも認められるため、マウスなどのモデル生物を用いてバルプロ酸の作用を解析することで、神経管異常発症の仕組みについて明らかにすることができると考えられる。バルプロ酸は生体内ではヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤として機能しているが、ヒストン脱アセチル化酵素はエピジェネティックな転写調節因子としてさまざまな遺伝子の発現制御に関わっていることから、バルプロ酸は神経管異常発症機構の中心的なシグナル経路に関与していると考えられる。

したがって神経管形成に対してのバルプロ酸の作用を解析することにより、神経管異常が起こる仕組みの解明に寄与できると考えられる。

2. 研究の目的

神経管異常は、その発症率が0.1~0.2%と最も頻繁に起こる先天異常のひとつであり、運動機能や排泄など、出生後の生活に多大な影響を及ぼし得る疾患である。また、無脳症など重篤な場合には出生直後に死にいたるため、その発症機構の解明と予防方法および治療法の開発が強く待たれる疾患である。

バルプロ酸はてんかんや躁うつ病などの治療薬として広く使われている薬剤である。しかし一方で催奇性があり、妊娠初期に服用した場合、胎児に神経管異常を誘発することも知られているため、妊婦の服用は禁止されている。バルプロ酸がこのような副作用を持つということは、バルプロ酸の神経細胞に与える作用を解析することで、神経管異常の起こる仕組みを調べることができると考える。そこで本研究では、神経細胞に与えるバルプロ酸の作用を解析することで、神経管異常の原因の一端を明らかにすることを目的とした。

神経細胞へのバルプロ酸の作用の解析に当たっては、マウス ES 細胞から分化誘導した神経前駆細胞を用いた。バルプロ酸はヒト以外にもマウスなどの哺乳類においても神経管異常を誘発する。また、ES 細胞は多分可能を維持したまま無限に増殖可能で、培養条件によって特定の細胞に分化誘導させることが可能であるため、神経細胞の入手が容易となる。これらの材料を用いてバルプロ酸の作用の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

マウスの ES 細胞の培養方法と神経細胞の分化誘導方法は Eiraku et al.の方法 (Cell Stem Cell, 2008) に従った。神経細胞の培養では、培養皿表面をリジンコートしたものをを用いた。培養液は Neurobasal(サーモフィッシュャー社)に B-27(サーモフィッシュャー社)を添加して用いた。バルプロ酸添加には、バルプロ酸ナトリウム(富士フィルム和光純薬社)を使用した。

(2) RNA 精製

RNA 抽出・精製には NucleoSpin RNA(タカラバイオ社)を用いた。RNA の品質は RNA6000 ナノキット(アジレント社)を使用し、RIN = 10 であることを確認した。

(3) RNA-Seq

抽出した RNA からのライブラリー作成には NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit、NEBNext Multiplex Oligos、NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module(NEB社)、Agencourt AMPure XP(ベックマン社)を使用した。ライブラリーの品質は DNA1000 キット(アジレント社)を使用した。RNA-Seq の実施には HiSeq1500(イルミナ社)を使用した。

(3) 定量リアルタイム PCR

定量リアルタイム PCR は 7900HT (アプライドバイオシステムズ社)を用いて行った。精製した RNA からの逆転写反応には ReverTra Ace qPCR RT Master Mix(東洋紡社)を、定量リアルタイム PCR の実施には THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(東洋紡社)を用いた。

(4) FACS

FACS は Astrios(ベックマン社)を用いて行った。

(5) LDH アッセイ

細胞死の定量方法として乳酸脱水素酵素(LDH)の活性を測定する方法で行った。実施には同

仁化学社のキットを使用した。

(6) 免疫染色

4%パラホルムアルデヒドで固定後、0.1% TritonX-100 で透過処理し、一次抗体を一晩作用させた。続いて蛍光標識した二次抗体を加えて反応させた。観察には蛍光顕微鏡（キーエンス社）を用いた。

(7) タンパク解析

細胞をRIPAバッファ（サンタクルズ社）で溶解し、タンパク質を抽出した。タンパク質解析はウェスタンブロットによって行った。泳動バッファ、転写バッファ、プレキャストゲル、ウェスタンブロット用の機械はバイオラッド社のものを用いた。

4. 研究成果

バルプロ酸の作用を解析するためにRNA-Seqにより遺伝子発現変動を調べた。発現量の変化が2倍以上に増加したのは711遺伝子、減少したのは715遺伝子であった。これらをウェブ上の複数のパスウェイ解析ツールを用いて細胞間および細胞内シグナルパスウェイについて解析し、神経細胞の生存および分化に関連するシグナルパスウェイの遺伝子群を見出した。この遺伝子群に属する遺伝子のうち、2遺伝子について解析を行った。

はじめに定量リアルタイムPCRを行い、RNA-Seqの結果が正しいことをあらためて確認した。また、さらにバルプロ酸の濃度の変化に応じて発現量が正比例して増減することを確認した。すなわち、着目遺伝子の発現はバルプロ酸の制御を受けていることが示された。

次に神経細胞の生存についての影響について調べた。バルプロ酸を添加したのち、神経細胞マーカーであるTuj1あるいはNeuNで免疫染色し、培養細胞全体に占める神経細胞の割合を計算したところ、神経細胞の減少率が高くなっている傾向が見られた。そこで神経細胞マーカー遺伝子の発現を調べたところ、バルプロ酸を投与により減少していることを見出した。この神経細胞の減少が細胞死によるものかどうかを調べるため、LDH(乳酸脱水素酵素)アッセイを行った。その結果、バルプロ酸濃度依存的に細胞死の割合が増加する傾向が見られた。したがって、バルプロ酸は細胞死を誘発していることを見出された。

つづいてこのようなバルプロ酸の作用を、着目した遺伝子が介在しているかどうかを調べた。強制発現を行い、細胞死についてLDHアッセイを行ったところ、強制発現により細胞死の割合が増加していた。つぎに、shRNAによる抑制実験を行った。バルプロ酸投与とshRNA導入を行ったところ、shRNAを導入した細胞では神経細胞死が抑制される傾向が見られた。したがって、これらのことから、現在着目している遺伝子がバルプロ酸の作用を担っている可能性が強く示唆された。

着目遺伝子を導入したの細胞死がアポトーシスであるかどうかを、カスパーゼタンパクを測定することにより調べた。ウェスタンブロットングを行ったところ切断型カスパーゼは検出されなかった。これは細胞死の形態がアポトーシスではない可能性を示唆している。

以上の結果は、バルプロ酸による神経管異常が神経細胞死によって起こることを示唆しており、また現在着目している遺伝子はその作用を担っている可能性を示唆している。今後は、細胞死の形態を含め、さらに着目遺伝子の機能についての解析を進め、バルプロ酸の作用の実体解明を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Lees Shepard John B., Flint Kaitlyn, Fisher Melanie, Omi Minoru, Richard Kelsey, Antony Michelle, Chen Po Jung, Yadav Sumit, Threadgill David, Maihle Nita J., Dealy Caroline N.	4. 巻 251
2. 論文標題 Cross talk between EGFR and BMP signals regulates chondrocyte maturation during endochondral ossification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 193 ~ 212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvdy.438	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iguchi Tokuichi, Oka Yuichiro, Yasumura Misato, Omi Minoru, Kuroda Kazuki, Yagi Hideshi, Xie Min-Jue, Taniguchi Manabu, Bastmeyer Martin, Sato Makoto	4. 巻 41
2. 論文標題 Mutually Repulsive EphA7-EfnA5 Organize Region-to-Region Corticopontine Projection by Inhibiting Collateral Extension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 4795 ~ 4808
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0367-20.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------