

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590303

研究課題名(和文) 神経堤細胞増殖・分化・死の分子機構とその異常

研究課題名(英文) Molecular mechanism of neural crest cell proliferation, differentiation and death

## 研究代表者

幡野 雅彦 (HATANO MASAHIKO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20208523

研究成果の概要(和文)：神経堤細胞の発生異常によりヒルシュスプルング病、神経芽細胞腫など主に小児に見られる先天異常や腫瘍性疾患を発症する。我々は神経堤細胞分化・増殖・細胞死制御にかかわる遺伝子 *Ncx* の標的遺伝子として同定した *Nczf* 遺伝子は発生期において *Cdk inhibitor* である *p27* の発現を抑制することにより細胞周期制御にかかわることを明らかにした。さらに同じく標的として同定した *Prickle2* は神経突起伸長を制御することを明らかにした。これら遺伝子のネットワークを明らかにする事で将来的に ES 細胞や iPS 細胞をマニピュレーションし再生医療への応用が可能となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Neural crest cells differentiate into diverse tissue types such as enteric neurons, sympathetic neurons, and melanocytes. Abnormal development of neural crest cells results in Hirschsprung's disease, neuroblastoma, and other anomaly syndrome in newborn. We have identified *Ncx* which is specifically expressed in neural crest derived cells and searched for its target genes. We found that *Nczf*, one of the target genes, controls cell proliferation during embryogenesis by negatively regulating *p27* expression. Another target gene, *Prickle 2*, regulates neurite extension in neuroblastoma cell line. Analysis of *Ncx* target gene network will contribute to the development of new therapeutic methods of neurocristopathy by degenerative medicine using ES or iPS cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：分子生物学・発生工学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：神経堤細胞、転写抑制因子、腸管神経、ノックアウトマウス、細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 神経堤細胞に特異的に発現しているホメオボックス遺伝子 *Ncx* (Neural crest homeobox) の KO マウスは神経細胞死の障害による腸管神経節神経細胞数の増加が認められ、病理組織学的にもヒトのヒルシュ

スプルング病類縁疾患の一つである Intestinal Neuronal Dysplasia (IND) と類似しており、そのモデルマウスとして位置づけられている。*Ncx* は神経堤細胞特異的転写因子としてその下流の標的遺伝子の発現を調節することにより機能していると

考えられる。本課題では Ncx を中心とした転写因子ネットワークを解析することで神経堤細胞分化・増殖・死の制御機構を明らかにすることにより、ヒルシュスブルグ病をはじめとした Neurocristopathy の病態解明と治療法を開発する。

(2) Ncx により発現調節をうけている遺伝子を同定した。本研究ではその1つである Krab-zinc finger 型転写因子 NCZF (Ncx downstream zinc finger protein) について細胞株およびノックアウトマウスを用いて *in vitro* および *in vivo* における機能解析をすすめる。また Nczf KO マウスは胎生致死のためコンディショナル KO マウスを作成し腸管神経および神経堤細胞におけるその役割を解析する。

## 2. 研究の目的

(1) 神経堤細胞特異的に発現する遺伝子 Ncx の標的遺伝子として同定された遺伝子 Nczf, Prickle 2, Ndl などの機能について *in vitro* および *in vivo* で解析する。

(2) 上記遺伝子と神経堤細胞の異常、特に腸管神経系とのかかわりについて明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) Nczf KO マウスの解析：KOマウス胎児はE9.5までは生存しているもののその大きさは小さく、正常マウスにおいてE8.5で認められる体位の屈曲がおこっていない。そこで胎生期における異常について主にE7.5~E9.5の組織標本を用いて細胞増殖および細胞死について組織学的に解析する。

①細胞増殖についてはBrdUとりこみ、PCNA, Ki67など増殖細胞のマーカーで染色を行う。また、TUNEL法を用いて細胞死について解析する。

②Nczfヘテロマウス交配後2.5日胚を採取し*in vitro*で胚盤胞へ分化後、内細胞塊(ICM)を無血清培地で培養しES細胞株を作製する。樹立したES細胞株の遺伝子型を決定する。得られたNczf KO ES細胞を用いて細胞の増殖、分化、細胞死について解析する。細胞周期関連蛋白(p21, p27, p16, p53, cyclin等)、細胞死関連蛋白(Bcl2 family, caspase family)等について発現を調べる。また、E8.5~9.5の胎児RNAを抽出しRT-PCRで細胞周期、細胞死関連蛋白の発現を解析する。

③Nczf KO ES細胞を*in vitro*で神経系細胞への分化を試みる。これにより神経系分化における細胞周期の停止および分化の進行について細胞周期関連蛋白、各種分化マーカーを指標にNczfの機能と関連して解析を行う。

④マウス胎児繊維芽細胞(MEF)を用いてNczfをノックダウンし細胞周期関連蛋白の発現について解析する。またノックダウン細胞の細胞増殖について解析する。

(2) Nczf ヘテロマウスにおける腸管神経の解析：Nczf ヘテロマウスの腸管を固定し、NADPH diaphorase 染色により腸管神経細胞を染色し腸管各部位における神経細胞数について野生型と比較し検討する。さらにこれらマウスにバリウムを経口投与し消化管造影を行い、バリウム排泄までの時間を調べる事により腸管運動について検討を行う。

(3) Ncx の標的遺伝子の1つPrickle2の機能解析：Prickle2は細胞内平面極性タンパクであり神経系細胞に発現が認められるがその機能は不明であった。神経芽細胞腫細胞株C1300を用いてPrickleを過剰発現させたりあるいはsiRNAでノックダウンする事により*in vitro*での機能を明らかにする。また他の細胞内平面極性制御タンパクとの関連についても生化学的に調べる。さらにPrickle2 KOマウスを作製しその表現型について解析する。

## 4. 研究成果

(1) Nczf KO マウス胎児を病理組織学的に解析した。KO マウスでは E8.5 で通常認められる体位の屈曲が見られず大きさも小さい。HE 染色では神経板の発育不良、細胞増殖の障害および核の凝縮が認められた。Ki67 染色にて陽性の細胞は野生型に比較して減少しており、さらに apoptosis 細胞が増加している事も確認された。

(2) Nczf ヘテロマウスを交配して得た胚盤胞内部細胞塊より Nczf KO ES 細胞を樹立した(3ライン)。KO ES 細胞の増殖は野生型 ES 細胞と同等で差は認められなかった。また p21, p27, p53, p57, p16 等の mRNA 発現、cyclin D, E 等の発現も野生型と比較して差は認められなかった。これらの結果より ES 細胞においては Nczf がなくとも細胞周期には影響を及ぼさない事が明らかとなった。

(3) Nczf KO ES 細胞より embryoid body を作製しさらに *in vitro* で神経系細胞への分化誘導を試みた。Embryoid body の数、大きさは野生型と差がなくまた神経系への分化誘導効率も差が認められなかった。

(4) MEF に Nczf をターゲットとした siRNA をウイルスベクターを用いて導入し Nczf ノックダウン細胞を作製した。ノックダウン細胞は増殖が遅く Ki67 陽性細胞が減少していた。また Real time PCR により細胞周期関連制御遺伝子の発現を調べたところ p27 の発現が野生型の 5~10 倍に増加していた。一方 p21, p53, p57, p16 の発現は野生型と比較して変化がなかった。また塩基配列の解析から p27 遺伝子 5' 領域に Nczf の結合配列が 2 個同定された。これらの結果より MEF においては Nczf は転写抑制因子と

して p27 発現を制御している事が示唆された。

以上の結果より Nczf は発生初期あるいは分化誘導時においては細胞周期制御に影響を及ぼさないが、分化した細胞である MEF においては p27 発現を抑制する事により胎生期におけるきわめて早い細胞増殖を制御していることが示唆された。

(5) Ncx KO マウスでは腸管神経細胞数の増加を伴い巨大結腸症をきたし、Ncx KO 腸管神経細胞における Nczf の発現は野生型の約 3 分の 1 に減少している。Nczf ヘテロマウス腸管神経細胞においては Nczf の発現が野生型の約 2 分の 1 ~ 3 分の 1 に低下している。そこで Nczf ヘテロマウスにおいて腸管神経細胞数を調べたところ、野生型マウスに比較して約 1.5=2 倍に腸管神経細胞の増加が認められ、特に結腸遠位部よりも近位部において強く認められることがわかった。腸管の運動能を X 線透視によるバリウム排泄時間を指標に解析したところコントロールとの差は認められなかった。また Nczf ヘテロマウスは 1 年以上経過しても巨大結腸症は発症しなかった。これらの結果より Nczf は腸管神経細胞数の制御に関与しているが病気の発症にはさらに複数の因子の関与が必要である事が示唆された。

(6) Prickle1 および Prickle2 の機能について in vitro で解析した。神経芽細胞腫細胞株 C1300 において Prickle2 はレチノイン酸により発現が誘導されるが Prickle1 の発現は誘導されなかった。一方 Prickle1, Prickle2 ともに C1300 に過剰発現させるとレチノイン酸の刺激がなくても神経様突起の伸長が認められた。Prickle1, 2 ともに同じく細胞内平面極性タンパクである Dishevelled と結合し Dishevelled の分解を促進した。また Dishevelled の過剰発現により Prickle 過剰発現による神経様突起の伸長が抑制された事から Prickle は Dishevelled を介して C1300 細胞における神経様突起伸長を制御していると考えられた。

Prickle2 は腸管神経細胞においても発現が認められ、Ncx KO マウス腸管神経細胞においては野生型の約 2 分の 1 に減少している。一方我々は Prickle2 KO マウスを作製したが通常通り生まれ生殖可能であり、腸管神経細胞数、腸管機能の解析を行ったがこれまでのところ野生型との相違は認められていない。

## 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 9 件)

① Yoshida N., Kitayama D., Arima M.,

Sakamoto A., Inamine A., Takano H., Hatano M., Koike T., and Tokuhisa T. CXCR4 expression on activated B cells is down-regulated by CD63 and IL-21. *J. Immunol.* 186:2800-2808. 2011., 査読有.

② Ohtsuka H., Sakamoto A., Pan J., Inage S., Horigome S., Ichii H., Arima M., Hatano M., Okada S., and Tokuhisa T. Bcl6 is required for the development of mouse CD4+ and CD8 $\alpha$ + dendritic cells. *J. Immunol.* 186: 255-263. 2011., 査読有.

③ Otaki JM., Hatano M., Matayoshi R., Tokuhisa T., and Yamamoto H. The proto-oncogene BCL6 promotes survival of olfactory sensory neurons. *Dev. Neurobiol.* 70: 424-435. 2010., 査読有.

④ Ohta Y., Fujimura L., Nishio S., Arima M., Sakamoto A., Shimada H., Ochiai T., Tokuhisa T., and Hatano M. A kelch family protein Ndl-L functions as a metastasis suppressor in cancer cells via Rho family proteins mediated mechanism. *Int. J. Oncol.* 36: 427-434. 2009. 査読有.

⑤ Fujimura L., Takano H., Sato Y., Tokuhisa T., and Hatano M. Prickle promotes neurite outgrowth via the Dishevelled dependent pathway in C1300 cells. *Neuroscience Letters* 467: 6-10. 2009. 査読有.

⑥ Wakashin H., Hirose K., Maezawa Y., Kagami S-I., Suto A., Watanabe N., Saito Y., Hatano M., Tokuhisa T., Iwakura Y., Puccetti P., Iwamoto I., and Nakajima H. IL-23 and Th17 cells enhance Th2 cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 178:1023-1032. 2008. 査読有.

⑦ Ouchida R., Yamasaki S., Hikida M., Masuda K., Kawamura K., Wada A., Mochizuki S., Tagawa M., Sakamoto A., Hatano M., Tokuhisa T., Koseki H., Saito T., Kurosaki T., and Wang Ji-Y. A lysosomal protein negatively regulates surface T cell antigen receptor expression by promoting CD3 $\zeta$  degradation. *Immunity* 29: 33-43. 2008. 査読有

⑧ Saito T., Kitayama D., Sakamoto A., Tsuruoka N., Arima M., Hatano M., Miyazaki M., and Tokuhisa T. A distinct role for IL-4 and IL-21 in their collaboration on proliferation and differentiation of activated B cells. *Immunobiol.* 213: 545-555. 2008. 査読有.

⑨ Kitayama D., Sakamoto A., Arima M., Hatano M., Miyazaki M., and Tokuhisa T. A role for Bcl6 in sequential class switch recombination to IgE in B cells stimulated

with IL-4 and IL-21. Mol. Immunol. 45: 1337-1345. 2008. 査読有.

[学会発表] (計 9 件)

- ① 渡邊-高野晴子、横山隆志、幡野雅彦、徳久剛史、高野和儀、遠藤剛 Ras-ERK カスケードのアンタゴニスト DA-Raf は肺形成を制御している 第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 10 日、神戸
- ② Inamine A., Sakamoto A., Yoshida N., Arima M., Ikari J., Hatano M., Okamoto Y., Tokuhisa T. IL-21 is essential for long-lived plasma cell differentiation. 14th International congress of Immunology, Aug. 26, 2010, Kobe
- ③ Arima M., Ogasawara T., Fujimura L., Sakamoto A., Hatano M., Tokuhisa T. A critical role of the IL-4 intron enhancer in chromatin remodeling of Th2 cytokine gene loci. 14th International congress of Immunology, Aug. 25, 2010, Kobe
- ④ Pan J., Sakamoto A., Yamashita K., Kouno M., Arima M., Hatano M., Tokuhisa T. A role of Bcl6 in differentiation of memory precursor CD8+ T cells. 14th International congress of Immunology, Aug. 25, 2010, Kobe
- ⑤ Sakamoto A., Pan J., Kohno M., Arima M., Hatano M., Tokuhisa T. Role of Bcl6 in the generation and maintenance of follicular helper T cells. 14th International congress of Immunology, Aug. 25, 2010, Kobe
- ⑥ Yoshida N., Sakamoto A., Kitayama D., Arima M., Inamine A., Hatano M., Koike T., Tokuhisa T. IL-4 and IL21 inversely regulate CXCR4 expression on activated B cells. 14th International congress of Immunology, Aug. 24, 2010, Kobe
- ⑦ Ikari J., Fujimura L., Sakamoto A., Hatano M., Tatsumi K., Tokuhisa T., Arima M. The role of PHF11 in activation of murine B cells. 14th International congress of Immunology, Aug. 24, 2010, Kobe
- ⑧ 長谷川勇太、小関千紗、寺竹洋一、藤村理紗、徳久剛史、幡野雅彦 Krab-zinc finger 蛋白 Nczf の個体発生における機能解析、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 12 日、横浜
- ⑨ 藤村理紗、高野晴子、坂本明美、有馬雅史、徳久剛史、幡野雅彦 神経突起伸長における細胞内平面極性タンパク Prickle の機能解析 第 31 回日本分子生物学会年会、2008 年 12 月 9 日、神戸

[図書] (計 1 件)

Fujimura L. and Hatano M. Role of Prickle1 and Prickle2 in neurite outgrowth in murine neuroblastoma cells. Panar cell polarity methods and protocols. in "Methods in Molecular Biology" Edited by Chen P. and Turksen K. Springer, In Press

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/biomedical/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

幡野 雅彦 (HATANO MASAHIKO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20208523

### (2) 研究分担者

藤村 理紗 (FUJIMURA LISA)

千葉大学・

バイオメディカル研究センター・助教

研究者番号：30376363

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：