

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390276

研究課題名(和文) 神経前駆細胞の細胞周期恒常性維持にエピジェネティクス機構が果たす役割に関する研究

研究課題名(英文) ROLES OF EPIGENETIC MECHANISM IN HOMEOSTATIC CELL-CYCLE CONTROL IN NEURONAL STEM CELLS

研究代表者

高橋 孝雄 (TAKAHASHI, TAKAO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：80171495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：近年、遺伝子の塩基配列に依らない遺伝子発現調節機構(エピジェネティクス機構)が神経発生に重要な働きを持つことが、先天奇形症候群の原因遺伝子の解析から明らかとなってきた。また、特定の遺伝子の機能異常や環境汚染物質への曝露といった神経前駆細胞の細胞周期調節機構をかく乱する影響に対して、細胞周期を正しく進行させるための緩衝メカニズムにエピジェネティクス機構が関与している可能性が示唆されていた。そこで本研究では、神経前駆細胞の細胞周期調節の恒常性維持にエピジェネティクス機構が果たす役割について、クロマチン調節機構を中心に解明を目指し、ヒストンのアセチル化調節が関与している可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic mechanisms are considered to be a putative machinery for controlling cell cycle kinetics of neuronal progenitor cells (NPCs) that forms cerebral cortex in mammals. According to our previous results from specific gene overexpression/loss-of-function experiments and in utero exposure to dioxin analysis, we have observed buffering phenomena to maintain normal cell cycle length of the NPCs by adjusting lengths of each phase of the cell cycle. Taken together, we investigated roles of epigenetic mechanisms in cell cycle regulation in NPCs which forms cerebral cortex in vivo. Especially, the research focus was put upon the regulation of histone acetylation by histone deacetylase.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児神経学

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シナリオ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。胎児の側脳室周囲に存在す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(興奮性ニューロン[投射ニューロン]、抑制性ニューロン[介在ニューロン])とグリアについて、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、知的障害や高次脳機能障害、てんかんといった小児期に認められる中枢神経疾患の病態解明、予防・治療法開発に不可欠と考える。

近年、ゲノム上に記録されている DNA 塩基配列情報のみでは説明が困難である生命現象を説明するメカニズムとして、DNA 塩基配列に依存しない遺伝子発現調節機構(エピジェネティクス機構)の関与が重要視されている。具体的には、シトシン塩基へのメチル基付加による DNA メチル化、DNA の核内収縮に重要な働きを持つと考えられているヒストン蛋白質のリン酸化・アセチル化・糖鎖付与によるクロマチン構造の修飾などが、それらのメカニズムに関与している可能性が指摘されている。特にこれらのうち、ヒストン内リジン残基のアセチル化、脱アセチル化により、それぞれ転写が容易な euchromatin、転写が困難な heterochromatin 構造をとることが知られている。さらに、ヒト中枢神経疾患の病態への関与を示唆する重要な報告として、ヒストンアセチル基転移酵素である CREB 結合蛋白質(CBP)をコードする *CBP* 遺伝子のハプロ不全が、小頭症、精神発達遅滞、自閉症を発症することが報告されている(Rubinstein-Taybi 症候群)。以上の結果は、エピジェネティクス機構のうちヒストン内リジン残基のアセチル化、脱アセチル化の調節メカニズムが、神経発生へ重要な役割を持つことを強く示唆している。

これまでに我々は、大脳皮質内に存在するニューロンの大半を占める投射ニューロンが、前述の胎児側脳室を取り囲む神経前駆細胞から形成される過程をマウスで定量解析し、大脳皮質発生の数学モデルを確立した(高橋ら, *J Neurosci*, 1993, 1995, 1996)。具体的には、マウスでは神経前駆細胞が神経細胞産生過程において最大 11 回分裂し、その間に細胞周期の G1 期長が主に延長することで細胞分裂時間が約 8 時間から 18 時間に延長すること、分裂している細胞のうち分裂を終了してニューロンに分化する細胞の割合(分化誘導の確率、Q 値)が、細胞周期長の延長と相関しながら規則正しく増加する

ことを明らかにした。これらの数学モデルから、細胞分裂回数の変動がない場合においても、分化誘導の確率が変動することで最終的に産生されるニューロン数が大きく変動することが予想されていた(高橋ら, *Dev Neurosci*, 1997)。さらに、G1 期の延長と分化誘導の確率の変動から予想されたことは、G1 期の調節メカニズムがこれらとともに調節する可能性であった。実際、神経細胞産生過程において神経前駆細胞の細胞周期調節遺伝子の発現パターンを *in situ* hybridization で解析した結果、細胞周期の G1 期進行を抑制する *p27Kip1* 遺伝子の発現変化が G1 期の延長と Q 値の変動に影響を与えている可能性が、共同研究者により示唆された(Dellalle ら, *Dev Neurosci*, 1999)。そこで本研究では、共同研究者とともに作成した神経前駆細胞特異的・時期特異的 *p27Kip1* 強制発現マウスと、供与を受けた *p27Kip1* ノックアウトマウスを用いて、神経前駆細胞の細胞分裂動態と大脳皮質構築異常を解析してきた(三橋ら, *PNAS*, 2001、Caviness ら, *Cereb Cortex*, 2003、後藤ら, *Dev Neurosci*, 2004、樽井ら, *Cereb Cortex*, 2005、三橋ら、投稿中)。

上記に加え、先行研究で *p27Kip1* 蛋白質の発現に影響を与えると指摘されていたダイオキシンの胎内曝露が神経発生に与える影響を解析し、分化誘導作用をもつ *p27Kip1* 蛋白質を介した神経前駆細胞の異常な分化亢進により投射ニューロン数の減少に伴う大脳皮質の菲薄化が生じること、さらに大脳皮質発生の数学モデルにより大脳皮質菲薄化の仮説を実証することが可能であることを報告した(三橋ら, *PNAS*, 2010)。

これらの一連の研究で明らかとなった点は、特定の遺伝子の強制発現・機能欠損や環境汚染物質への胎内曝露といった細胞周期調節機構をかく乱する影響が、正しい細胞分裂動態を維持するための緩衝メカニズム、すなわち細胞周期各相が正常な長さを維持し恒常性を保つ仕組みにより、増殖・分化調節に破たんをきたさないようにするメカニズムが内在的に機能している可能性であった。特定の遺伝子異常や有害な環境因子による影響が、他の遺伝子の発現調整や機能調整により一部代償されうるメカニズムの根本的背景に、エピジェネティクス機構が関与している可能性が高いことが近年の報告により想定されている。このような細胞周期調節の恒常性維持メカニズムにより、蛋白質機能異常や環境汚染物質などの有害事象から大脳皮質の正常発生プログラムが守られていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、神経前駆細胞の細胞周期調節における恒常性維持にエピジェネティクス機構が果たす役割について、クロマチン調節機構を中心に解明を目指した。特にクロマチ

ン構造を制御するヒストン脱アセチル化酵素が、神経前駆細胞の正常な細胞周期調節を緩衝する機構を解明することを目標とした。平成 20-22 年度基盤研究(B)において作成した、ヒストン脱アセチル化酵素を神経前駆細胞に特異的に、かつ発生時期特異的に強制発現させることのできるマウスを用いて、Sir2 強制発現により神経前駆細胞に惹起される細胞分裂動態の恒常性の維持メカニズムを中心に解析した。

3. 研究の方法

(1) ヒストン脱アセチル化酵素 Sir2 の神経前駆細胞特異的・時期特異的強制発現マウス胎児の準備

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 (TetR) を改変して作製された“逆 (reverse)” Tet リプレッサー (rTetR) を用いた融合体 rtTA (逆 tTA) は、ドキシサイクリン (DOX) 存在下で tet オペレーター配列 (tetO) に結合し、tetO 下流遺伝子の転写を促進する。本研究では、神経前駆細胞特異的発現が知られている中間径フィラメント nestin の転写調節領域 (イントロン II 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)。

TRE-Sir2 トランスジェニックマウス

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・DOX 共存下で目的遺伝子 Sir2 を発現する遺伝子断片 TRE-Sir2 を持つ (平成 20-22 年度科研費成果) TRE-Sir2 トランスジェニックマウスの雄を nestin-rtTA トランスジェニックマウスの雌と交配し、DOX を母親に投与すると、特定の時期に Sir2 蛋白質を神経前駆細胞にのみ強制発現することが可能である。これまでの実験で、母親マウスに DOX および対照としての PBS を投与、導入遺伝子由来の Sir2 を強制発現可能で、かつ PBS 投与時に遺伝子発現の「漏れ」が最小な系統を選別済みである。

上記方法で作成したダブルトランスジェニックマウス胎児を以下の実験に供した。

(2) クロマチン構造の修飾が神経前駆細胞の分裂・分化誘導に及ぼす影響についての解析

BrdU を用いた Cumulative Labeling 法による細胞周期各相の変動解析

ダブルトランスジェニックマウス胎児を孕む母マウスに、DOX と対照としてのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を胎生 14 日午前 9 時より 12 時間おきに経口投与した。妊娠 16 日目の母マウスに、午前 9 時から S 期特異的マーカーである BrdU を 3 時間おきに腹腔内投与した。胎児前脳を摘出、4% フォルマリンで固定後パラフィン包埋した。胎児体部より

ゲノム DNA を DNeasy Kit (Qiagen) を用いて抽出した後、TRE-Sir2 および nestin-rtTA 特異的プライマーを用いて PCR 反応を各胎児ごとに実施、ダブルトランスジェニック胎児を特定した。厚さ 4 μm の冠状断切片を作成し、BrdU 抗体 (Beckton Dickinson) を用いた免疫組織化学的染色後、神経前駆細胞のうち BrdU 陽性細胞の割合 (Labeling Index, LI) を BrdU 曝露 2、4、8、12、15、18 時間後に計測した。LI の上昇率から神経前駆細胞の細胞周期各相の長さを胎児前脳において計算した。

2 時間コホート法による Q 値 (娘細胞が分化を開始する確率) の測定

ダブルトランスジェニックマウス胎児を孕む母マウスに、DOX と対照としてのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を胎生 14 日午前 9 時より 12 時間おきに経口投与した。妊娠 16 日目に神経前駆細胞を以下の方法で標識した: S 期特異的マーカーである IrdU および BrdU を 2 時間の時間差をもって腹注し、その後、BrdU を連続投与する群と、BrdU の追加投与を行わない群に分けた。2 時間の間に S 期を終了した前駆細胞群が IrdU のみで標識され、この細胞群を 2 時間コホートとした。BrdU 連続投与群と単回投与群との間の 2 時間コホート細胞数の比から Q 値を算出可能である。

具体的には、胎仔頭部をフォルマリン固定後、パラフィン包埋し、4 μm の連続切片を作製した。キシレンで脱パラフィン後、IrdU および BrdU に対する二重免疫組織染色 (anti-IrdU/BrdU [Becton Dickinson], anti-BrdU [AbD Serotec]) を行った。IrdU 陽性細胞の数、分布パターンを光学顕微鏡強拡大下で測定し、分裂を終了し分化を開始したニューロンの実数、分布パターンを計測した。

(3) 出生後 21 日における 2 時間コホートの脳皮質内分布

TRE-Sir2 トランスジェニックマウスと、nestin-rtTA トランスジェニックマウスとを交配し、両遺伝子を持つダブルトランスジェニック胎児を持つ母親マウスにドキシサイクリンと対照としての PBS を胎生 14 日午前 9 時より 12 時間おきに投与した。胎生 16 日目のマウス胎児に、S 期特異的トレーサーである IrdU を午前 7 時に一回母親経路で曝露し、その後 BrdU を午前 9 時より 2、5、8、12、17 時間、3 時間おきに連続曝露した。出生 21 日目の仔マウス大脳を 4% パラフォルムアルデヒド固定し、IrdU および BrdU に対する二重免疫組織染色を行うことによって、IrdU と初回 BrdU 投与の間の 2 時間に分化を開始した細胞群 (2 時間コホート) を IrdU のみで標識された細胞として大脳皮質内に同定した。

(4) G1・S 期の恒常性維持に関わるエピジェ

ネティック機構の解析

これまでの研究により、p27Kip1 ノックアウトマウスや p27Kip1 強制発現マウス、ダイオキシン (TCDD) 胎内曝露マウス、Sir2 強制発現マウスの神経前駆細胞においては、G1 期の長さを生じる変動を S 期の長さの代償的調整により補い、生理的な細胞周期の長さと比較して大きな変化を生じないような恒常性維持機構が機能することが判明していた (後藤ら, Dev Neurosci, 2004、三橋ら, PNAS, 2001, 2010)。以上から、S 期の長さを決定するメカニズムが G1 期の長さを調節するメカニズムとリンクし、恒常性維持に重要な役割を果たしている可能性が強く予想された。そこで、エピジェネティクス機構が G1・S 期の進行に重要な遺伝子群の発現・機能に与える影響について、以下の実験を実施した。

ダブルトランスジェニックマウス胎児を孕む母マウスに、DOX と対照としてのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を胎生 14 日午前 9 時より 12 時間おきに経口投与した。妊娠 16 日目の母親マウスにペントバルビタールを腹注、深麻酔下で胎児を摘出した。実体顕微鏡下で胎児前脳背内側の組織を眼科用剪刀で切断、神経前駆細胞が存在する脳室層を分離した。分離した神経前駆細胞の細胞数を調整後、蛋白を抽出し、サンプルを SDS-PAGE により分離した。その後 supported nitrocellulose 膜にプロットし、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) である CDK2、CDK4、CDK 抑制因子 (CDK1) である p21Cip1、p27Kip1、p57Kip2、p15INK4b 各蛋白に対する一次抗体を使った immunoblot 解析を行った。

4. 研究成果

(1) BrdU を用いた Cumulative Labeling 法による細胞周期各相の変動解析

TRE-Sir2 トランスジェニックマウスと、nestin-rtTA トランスジェニックマウスとを交配し、両遺伝子を持つダブルトランスジェニック胎児を持つ母親マウスに DOX と対照としての PBS を胎生 14 日午前 9 時より 12 時間おきに投与し、胎生 16 日目のマウス胎児において神経前駆細胞の細胞周期長の変化を S 期特異的トレーサー-BrdU による Cumulative Labeling 法で解析した。Sir2 を強制発現した場合、対照群と比較して細胞周期の G1 期が約 13%短縮し、一方細胞周期の全体の長さは 5.7%の変動にとどまることを明らかにした。

(2) 2 時間コホート法による Q 値 (娘細胞が分化を開始する確率) の測定

前述と同様の方法で Sir2 を強制発現し、胎生 16 日目のマウス胎児において神経前駆細胞の分化誘導の確率 (Q 値) を S 期特異的トレーサーである IdU と BrdU による 2 時間コホート法で解析した。TRE-Sir2 と nestin-rtTA 両遺伝子を持つダブルトランス

ジェニック胎児においては、対照群と比較して Q 値が約 15%減少することを明らかにした。

(3) 出生後 21 日における 2 時間コホートの脳皮質内分布

ダブルトランスジェニックマウス胎児を孕む母マウスに、DOX と対照としてのリン酸緩衝生理食塩水を胎生 14 日午前 9 時より 12 時間おきに経口投与した。胎生 16 日目のマウス胎児において、S 期特異的マーカーである IdU および BrdU を 2 時間の時間差をもって母マウスに腹注し、BrdU をさらに 16.5 時間投与した。その後出生させ、生後 21 日目の仔マウス大脳を 4%パラフォルムアルデヒドで固定後、IdU および BrdU に対する二重免疫組織染色を行い、IdU と初回 BrdU 投与の間の 2 時間に分化を開始した細胞群を IdU のみで標識された細胞として大脳皮質内に同定した。その結果、Sir2 を強制発現した場合対照群と比較してニューロンが表層で増加することが明らかになった。

以上から、Sir2 が神経前駆細胞の細胞分裂動態に重要な役割を持ち、その強制発現により大脳皮質構築に異常を生じることを明らかにした。

(4) G1・S 期の恒常性維持に関わるエピジェネティック機構の解析

G1・S 期の進行に重要な遺伝子群の発現・機能に Sir2 強制発現が与える影響を細胞周期調節蛋白質 (各 G1 期の調節に関わるサイクリン依存性キナーゼ (CDK)・CDK1 群) に対する immunoblot で解析した。その結果、DOX を曝露され Sir2 を強制発現されたダブルトランスジェニックマウス胎児由来神経幹細胞においては、対照群と比較し細胞周期調節蛋白質のひとつである p27Kip1 の発現減少を認めた。一方、その他の細胞周期調節蛋白質群についても解析したが、入手した抗体の範囲内では変化を検出することができなかった。

以上から、Sir2 が神経前駆細胞の細胞分裂動態に重要な役割を持つこと、さらに神経前駆細胞の細胞周期長の調節に重要な緩衝作用があることを明らかにした。一方、細胞周期長の緩衝メカニズムの分子機構については、蛋白発現量を解析するための実験 (immunoblot 解析) の感度が低いこと (抗体の性能等) に起因する技術的な問題があり、今後の実験手法に課題を残した。

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 1 件)

高橋 孝雄、三橋 隆行

大脳皮質の発生と難治性てんかん

脳と発達、査読無、46 巻、2014、187-190

<http://child-neuro-jp.org/gakaisi2/images/2014/2014Vol146No3.pdf>

〔学会発表〕(計2件)

Mitsuhashi T, Yonemoto J, Sone H, Kosuge Y, Kosaki K, Takahashi T.
In utero exposure to dioxin causes neocortical dysgenesis through the actions of p27Kip1.
The 41st annual meeting for Society for Neuroscience,
2011年11月14日, Washington, D.C., USA

三橋 隆行、高橋 孝雄

胎内でのダイオキシン曝露は大脳皮質深層の投射ニューロン産生を障害し皮質を菲薄化させる
第53回日本小児神経学会
2011年5月27日、横浜

〔図書〕(計1件)

三橋 隆行、吉井 聡、高橋 孝雄
東京大学出版会
発達科学入門2 胎児期～児童期
2012、3-19

〔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
<http://www.med.keio.ac.jp/rdb/med/view.php?i=32>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 孝雄 (TAKAHASHI TAKAO)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：80171495

(2)研究分担者

小崎 健次郎 (KOSAKI KENJIRO)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：30234743

三橋 隆行 (MITSUHASHI TAKAYUKI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：80338110