

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23500438

研究課題名(和文) アストロサイト系譜細胞の代謝異常によって生じる神経病態メカニズムの解析

研究課題名(英文) Study of Neuropathology caused by defective amino acid metabolism in astrocyte lineage cells.

研究代表者

榎戸 靖 (Enokido, Yasushi)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・病理学部・室長

研究者番号：90263326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：メチオニン代謝経路において、ホモシステイン(Hcy)からシスタチオニンの合成に働くシスタチオニン - シンターゼ(CBS)の遺伝子欠損マウス(CBS-/-マウス)を用い、脳内のHcy代謝異常がもたらす神経病態メカニズムを解析した。その結果、アストロサイト特異的に発現するCBSの機能異常が細胞非自律的な神経細胞死を誘導することが示された。また、発達期においてCBSが神経幹細胞の分化・増殖に関与することがわかった。神経細胞死のメカニズムについてさらに詳しく調べた結果、アストロサイトから放出される Hcyの細胞毒性による酸化ストレス及びDNAダメージが深く関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cystathionine -synthase (CBS) is a key enzyme in the generation of cysteine from methionine, and occupies a crucial regulatory position between the methionine cycle and transsulfuration pathway. CBS deficiency causes homocystinuria, an inborn error of homocysteine (Hcy) metabolism associated with neuro-psychological disorders, such as mental retardation, seizure and depression. In this study, we used CBS deficient mice (CBS-/- mouse) and examined their neuropathology. CBS-/- mice exhibited brain malformation and neuronal apoptosis from early postnatal age. Using an in vitro co-culture system, we showed that Hcy released from astrocytes causes oxidative stress and DNA damage, which result in non-cell autonomous neurotoxicity. Our results suggest that complementary Hcy metabolism between neuron and astrocyte plays a critical role for normal development and highly organized functions of the brain.

研究分野：神経化学

キーワード：アストロサイト ホモシステイン 神経細胞死 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、ニューロンとグリア細胞の相互作用を介する脳機能制御やそれらの異常が惹起する精神・神経疾患に大きな関心が寄せられていた<sup>①, ②</sup>。一方、ニューロンとアストロサイトが行なう代謝を介した相互作用は、脳の恒常性維持やシナプス伝達制御と密接に関わることが古くから知られていたが、その分子基盤ならびに異常による病態メカニズムは明らかでなかった<sup>③</sup>。

我々は、脳萎縮や精神発達遅滞、てんかん、うつ病、人格障害等を症状とするアミノ酸代謝異常疾患であるホモシスチン尿症/高ホモシスチン血症の責任遺伝子、シスタチオンβ-シターゼ (CBS) に注目し、解析を行ってきた。CBSは、メチオニン回路の鍵酵素であり、葉酸代謝やグルタチオン、S-アデノシルメチオニンの生合成に深く関わることから、細胞増殖や酸化ストレス応答、DNAやヒストンメチル化によるエピジェネティックな遺伝子発現制御に必須の代謝酵素であることが示唆されていたが、脳神経系での働きは殆ど知られていなかった。また、当時我々は、(1) CBSがアストロサイト系譜細胞で特異的に発現し、脳の正常発達やニューロンの生存に重要な役割を演じていること<sup>④</sup>、(2) CBS<sup>-/-</sup>マウス脳では、正常マウスと比べ、メチオニンならびにホモシステイン (Hcy) の顕著な濃度上昇が確認されること、(3) アストロサイトに加え、生後マウスの側脳室下帯や海馬歯状回に存在する神経幹細胞において、CBSの高い発現が見られることを明らかにしていた (図1; 未発表データ)。

<引用文献>

- ① Allen NJ, Barres BA. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* (2009) 457: 675-677.
- ② Hamilton NB, Attwell D. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nature Rev. Neurosci.* (2010) 11:227-238.
- ③ Bolaños JP, Almeida A, Moncada S. Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends Biochem Sci* (2010) 35:145-149.
- ④ Enokido et al., Cystathionine β-synthase, a key enzyme for homocysteine metabolism, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage of developing mouse CNS. *FASEB J.* (2005) 19:1854-1856.

2. 研究の目的

上記の背景から、我々は CBS<sup>-/-</sup>マウスで観察される神経細胞死ならびに神経幹細胞障害のメカニズムを明らかにし、脳代謝を標的とする新たな精神・神経疾患治療戦略への足がかりを得ようと考えた。そこで以下の(1)から(3)について解析を行なうことにした。

(1) CBS<sup>-/-</sup>マウス脳で見られる神経細胞死が、アストロサイトの異常による細胞非自律的な神経障害を介しているか、マウス個体および初代培養系を用いて調べる。

(2) CBS<sup>-/-</sup>マウス脳で見られる神経幹細胞の分化ならびに増殖異常を、マウス個体および初代培養系を用いて調べる。

(3) CBS<sup>-/-</sup>マウス脳の病態時に見られるエピジェネティックな遺伝子及びタンパク質の発現変化をマウス個体および初代培養系を用いて調べる。

3. 研究の方法

(1) CBS<sup>-/-</sup>マウス脳における細胞非自律的な神経細胞死の病態解析。

正常あるいは CBS<sup>-/-</sup>マウス脳から調製したアストロサイトと正常マウス脳由来のニューロンをメチオニン存在及び非存在下で共培養した。次に、それぞれのアストロサイト上で生存しているニューロンを抗 MAP2抗体で染色し、その数を比較した。さらに、メチオニン代謝の異常によって Hcy が CBS<sup>-/-</sup>アストロサイトから放出されるか、上記濃度のメチオニンを初代培養した正常および CBS<sup>-/-</sup>アストロサイトに与えた時の培養上清を回収し、その中に含まれる Hcy の濃度をガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) で測定した。また、脳代謝異常が DNA ダメージ増加の原因となる可能性を探

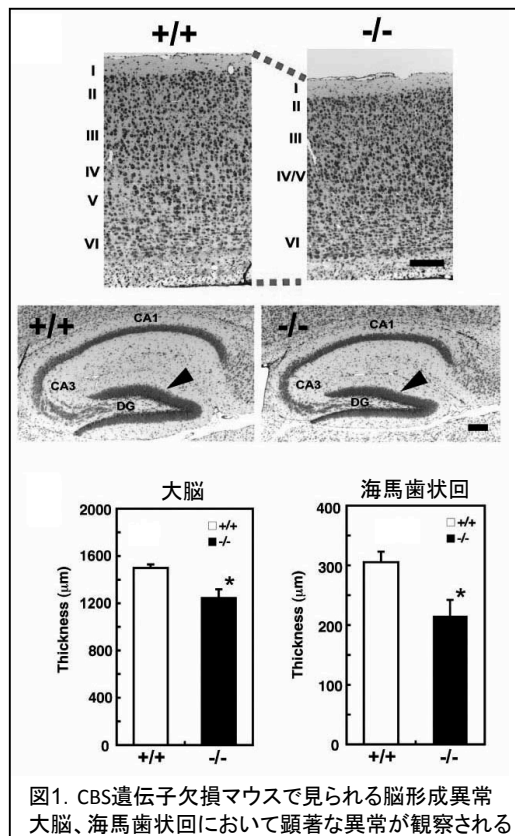


図1. CBS遺伝子欠損マウスで見られる脳形成異常  
大脳、海馬歯状回において顕著な異常が観察される

るため、正常ならびに CBS<sup>-/-</sup> マウス脳を DNA ダメージマーカー抗体で免疫組織染色し、それぞれの DNA ダメージ蓄積量を比較した。最後に、ヒト神経疾患への治療応用戦略への手がかりとして、ホモシスチン尿症患者の神経症状の一つであるてんかん発作の病態に細胞非自律的な神経細胞死や DNA ダメージが関与しているか否かを検討した。

(2) CBS<sup>-/-</sup> マウス脳における神経幹細胞障害の病態解析。

CBS<sup>-/-</sup> マウス神経幹細胞で見られる病態メカニズムを、神経幹細胞の分化ならびに増殖能を指標に初代培養系を用いて解析した。増殖能の解析は、生後 1 日齢の正常ならびに CBS<sup>-/-</sup> マウス由来の神経幹細胞を採取し、EGF と bFGF の存在下、メチオニンあるいは Hcy を含む DF/B27 培地中で初代培養を行った。次に、ディッシュ内に生存する神経幹細胞塊 (Neurosphere) の数と大きさを測定し、それぞれのジェノタイプ間で比較した。

(3) CBS<sup>-/-</sup> マウス脳におけるエピジェネティックな遺伝子およびタンパク質発現変化の解析

胎仔 14 日齢の正常および CBS<sup>-/-</sup> マウス神経上皮細胞を、メチオニン存在下、無血清培地 (DF/B27) あるいは LIF/BMP2 添加無血清培地によって、それぞれニューロンとアストロサイトに分化させた。次に、正常ならびに CBS<sup>-/-</sup> マウス脳組織内の種々の修飾ヒストンタンパク質の発現パターンを、それぞれに対する抗体を用いた免疫組織染色によって比較した。さらに、正常ならびに CBS<sup>-/-</sup> マウス神経幹細胞を初代培養し、細胞分化に伴うメチル化ヒストンの発現パターンを比較した。

#### 4. 研究成果

(1) アストロサイトにおける Hcy 代謝はニューロンの生存及び分化を細胞非自律的に制御する。

CBS<sup>-/-</sup> マウスが脳形成不全の表現型を示すことから、アストロサイトにおける Hcy 代謝がニューロンの分化・発達や生存維持に関わる事が予想された。そこで今回、正常ならびに CBS<sup>-/-</sup> マウス脳からアストロサイトを単離し、それぞれの支持細胞層上で正常マウス由来のニューロンを共培養した結果、培養液中のメチオニン濃度に依存して、ニューロンの生存ならびに神経突起伸展が阻害される様子が観察された (図 2)。この結果は、アストロサイトにおける Hcy 代謝がニューロンの生存及び発達を細胞非自律的に調節している可能性を示唆している。次に、CBS<sup>-/-</sup> マウス・アストロサイトから Hcy が実際に放出されているか確認した結果、培地に加えたメチオニンの濃度に依存して Hcy がアストロサイトから放出される様子が観察された。

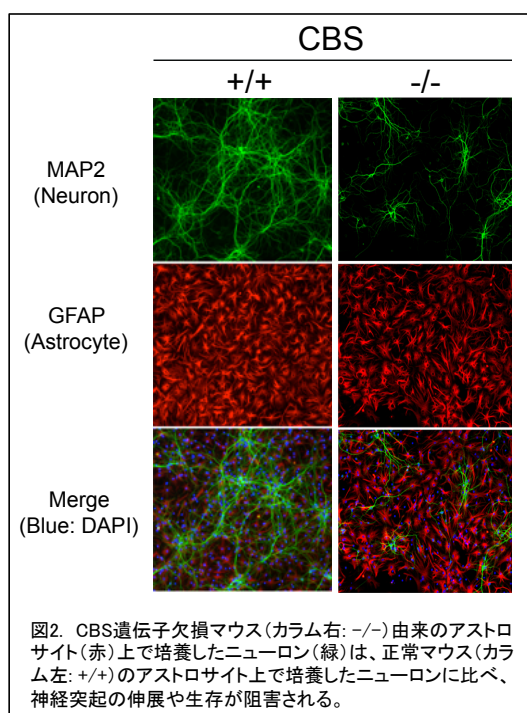


図2. CBS遺伝子欠損マウス(カラム右: -/-)由来のアストロサイト(赤)上で培養したニューロン(緑)は、正常マウス(カラム左: +/+)のアストロサイト上で培養したニューロンに比べ、神経突起の伸展や生存が阻害される。

(2) CBS<sup>-/-</sup> マウス脳では DNA 二重鎖切断が増加し、てんかん発作に対する感受性が亢進する。

相同組換え修復を除き、正常ならびに CBS<sup>-/-</sup> マウス脳組織において、様々な DNA 修復関連蛋白質が同様に発現していることが確認されたが、CBS<sup>-/-</sup> マウス脳では顕著な DNA 二重鎖切断の増加が観察された (図 3)。

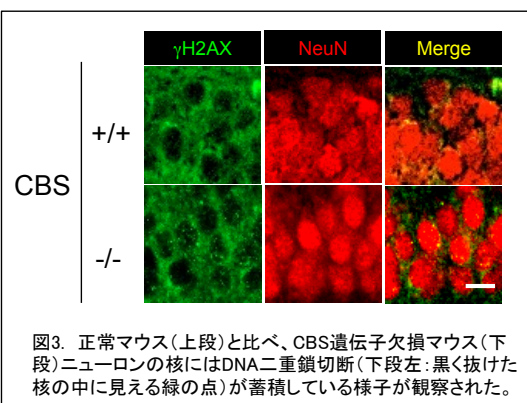


図3. 正常マウス(上段)と比べ、CBS遺伝子欠損マウス(下段)ニューロンの核にはDNA二重鎖切断(下段左:黒く抜けた核の中に見える緑の点)が蓄積している様子が観察された。

また、カイニン酸によるてんかん誘発刺激への感受性は CBS<sup>-/-</sup> マウスが最も高く、次いで CBS<sup>+/-</sup> マウス、CBS<sup>+/+</sup> マウスの順であった。さらにこれと正に相関する形で、てんかん病態の早期マーカーである DNA 二重鎖切断の増加が、それぞれのマウスの大脳皮質及び海馬で観察された。

(3) 脳 Hcy 代謝は神経幹細胞の増殖を制御する。

海馬歯状回に存在する神経幹細胞に CBS が高発現することから、生後 CBS<sup>-/-</sup> マウス脳に存在する神経幹細胞の増殖能を調べた。その結果、正常マウスに比べ著しく低下している様子が観察された (図 4)。また、初代培養

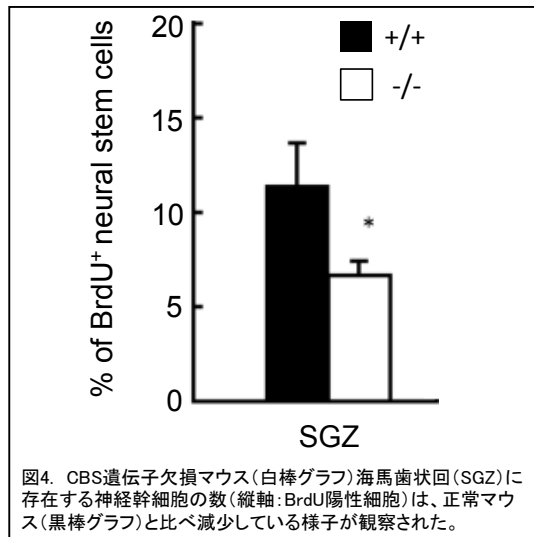


図4. CBS遺伝子欠損マウス(白棒グラフ)海馬歯状回(SGZ)に存在する神経幹細胞の数(縦軸:BrdU陽性細胞)は、正常マウス(黒棒グラフ)と比べ減少している様子が観察された。

した CBS<sup>-/-</sup> マウス由来の神経幹細胞の増殖は、正常マウスのそれに比べ、高濃度のメチオニン存在下で阻害される様子が観察された。これらの結果は、CBS を介する脳内のメチオニン/Hcy 代謝が神経幹細胞の増殖に重要な役割を果たしている事を示すとともに、これがホモシチン尿症の症状の一つである精神発達遅滞や精神異常の病態に関与している可能性を示唆している。

(4) CBS<sup>-/-</sup> マウス脳におけるエピジェネティックな遺伝子およびタンパク質の発現変化。

正常マウスに比べ、CBS<sup>-/-</sup> マウス由来の神経幹細胞はアストロサイトへの分化誘導が抑制され、GFAP の発現低下が観察された。しかし現在までのところ、それぞれのマウスの脳組織ならびに初代培養神経幹細胞で明らかな修飾ヒストンタンパク質の発現変動や DNA メチル化の差は検出されておらず、それらがエピジェネティックな遺伝子発現調節を受けているか否かについては、今後更なる解析が必要と考えられる。

## 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 3 件)

- ① 榎戸 靖、発達障害と神経変性に関わる新たな神経細胞死メカニズム、日本神経精神薬理学雑誌、査読無、32 巻、2012、31-35
- ② Enokido Y, Okazawa H, DNA repair in the nervous system: a new research for neurological disorders、In “DNA Research, Genetics and Cell Biology”、Nova Science、New York、査読無、3 巻、2012、79-105
- ③ 榎戸 靖、DNA ダメージを介したてんかん病態メカニズムの解明、てんかん治療研

究振興財団、研究年報、査読無、26 巻、2015、1-5

[学会発表] (計 6 件)

① 榎戸 靖、長谷川弘、河内 全、千葉陽一、島田厚良、細川昌則、アストロサイト系譜細胞の代謝異常によって生じる神経発達障害メカニズムの解析、第 84 回日本生化学会大会、2011. 9. 11、国立京都国際会館 (京都)

② 榎戸 靖、記憶・学習能力の向上に働く脳ホモシチン代謝メカニズムの解明、食と生命のサイエンスフォーラム・ネスレ栄養国際会議、2012. 9. 21、東京大学 (文京区)

③ 榎戸 靖、DNA 修復系の破綻による神経病態のメカニズム研究、第 90 回日本生理学会大会シンポジウム、2013. 3. 28、タワーホール船堀 (江戸川区)

④ 河内 全、岸宗一郎、細川昌則、榎戸 靖、モノアシルグリセロールリパーゼが制御するミクログリアの機能解析、第 86 回日本生化学会大会、2013. 9. 12、パシフィコ横浜 (横浜)

⑤ 榎戸 靖、放射線と脳の発達 -DNA 修復異常疾患からの知見-、第 57 回日本神経化学会大会・第 36 回日本生物学的精神医学会合同年会シンポジウム、2014. 9. 30、奈良県新公会堂 (奈良)

⑥ 榎戸 靖、DNA ダメージを介したてんかん病態メカニズムの解明、第 26 回てんかん治療研究振興財団研究報告会、2015. 3. 6、千里阪急ホテル (豊中)

[その他]

ホームページ等

<http://www.inst-hsc.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎戸 靖 (ENOKIDO, Yasushi)

愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所・室長

研究者番号：90263326

(2) 研究分担者

田村拓也 (TAMURA, Takuya)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教  
研究者番号：80396647

河内 全 (KOUCHI, Zen)

愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所・研究員

研究者番号：70322485