

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23680032

研究課題名(和文)細胞周期に着目した神経変性疾患と脳腫瘍発症機構の統合的理解

研究課題名(英文)Comprehensive understanding of neurodegeneration and brain tumor by focusing on cell cycle

研究代表者

味岡 逸樹(AJIOKA, Itsuki)

東京医科歯科大学・脳統合機能研究センター・准教授

研究者番号：10348790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円、(間接経費) 6,330,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質の神経前駆細胞でRbファミリー(Rb, p107, p130)を欠損させると神経分化を進めながら増殖し、神経分化を開始した幼若神経細胞でRbファミリーを欠損させると細胞死を起こすことを明らかにした。また、Rbファミリーを欠損した細胞が、神経分化を進めながら増殖するためには、DNA修復経路の活性化が必須であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We found that the acute inactivation of Rb family (Rb, p107, p130) in cortical progenitors leads differentiating neurons to undergo cell division, while that in differentiating neurons leads them to undergo cell death. We also found that the uncoupled neuronal differentiation and proliferation of Rb family-deficient cortical cells required the activation of DNA repair pathway.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：Rb 大脳皮質発生

### 1. 研究開始当初の背景

近年、神経変性疾患全般に適用できる発症メカニズムの基本概念も確立されつつある。その1つに、神経細胞が細胞周期を G0 期から S 期へ進めることが細胞死の第一段階になるという概念が挙げられる (Herrup et al. Nat Rev Neurosci 8, 368-378, 2007)。しかし、生体内の多くの細胞は S 期進行後に細胞死を起こさない場合が多いのにも関わらず、なぜ、神経変性疾患の原因となる神経細胞が S 期進行後に細胞死を起こすのだろうか。この問題は、神経科学領域にとどまらず、生物学全般において解決すべき重要課題である。例えば、腫瘍生物学領域では、なぜ、悪性腫瘍を形成する特定の細胞タイプが S 期進行後に増殖するのかという問題が、重要な研究課題となっている (Ajioka and Dyer, Cell Cycle 7, 735-740, 2008)。本研究課題は、細胞周期進行シグナルに対する応答能の違いに着目することで、この表裏の関係となっている2つの問題を統合的に理解し、病態を分子レベルで理解することを大きな目標として掲げた。

### 2. 研究の目的

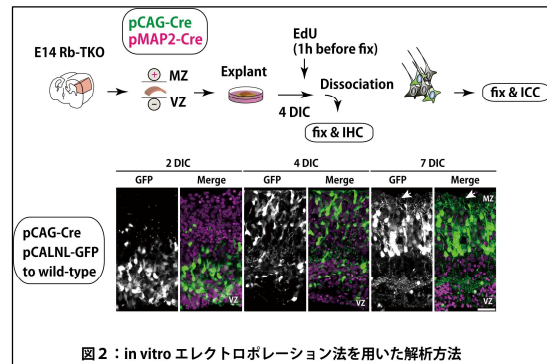
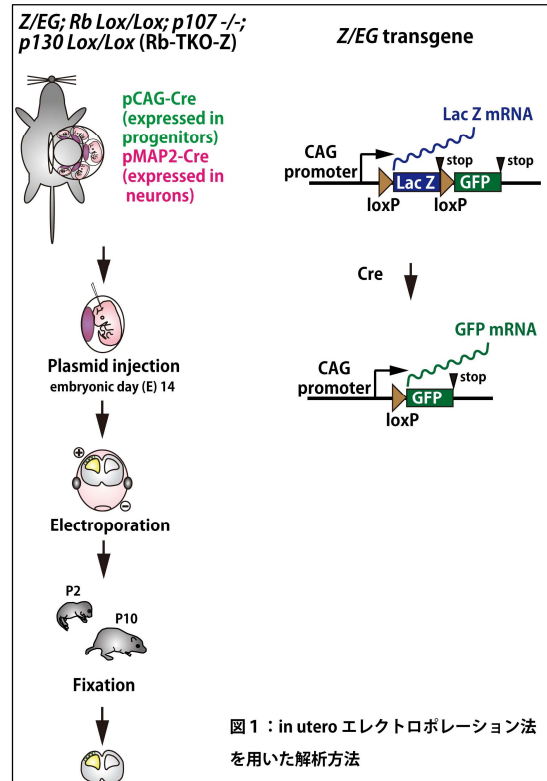
神経変性疾患の原因となる神経細胞は、強制的に細胞周期を進めると細胞死を起こし、癌の起源細胞となる細胞は過増殖する。アルツハイマー病で脱落する大脳皮質神経細胞は、強制的な細胞周期進行シグナルにより細胞死を起こすが、脳室上衣腫を形成する大脳前駆細胞は過増殖する。本研究では、大脳皮質神経細胞の分化過程で、「増殖する性質」から「細胞死を起こす性質」へと時空間的に変化するメカニズムを解明する。具体的には、癌抑制遺伝子 Rb とそのファミリー遺伝子 (p107, p130) に着目し、神経前駆細胞で Rb ファミリーを欠損させると幼若神経細胞が増殖し、幼若神経細胞で Rb ファミリーを欠損させると増殖しないという仮説を立てて検証した。

### 3. 研究の方法

Rb ファミリー遺伝子を神経前駆細胞と誕生直後の幼若神経細胞で急性に欠損させるために Rb-TKO-Z マウス (*Z/EG; RbLox/Lox; p107<sup>-/-</sup>; p130Lox/Lox*) を利用し、エレクトロポレーション法により神経前駆細胞に Cre 発現プラスミドを遺伝子導入する方法を選択した。すべての細胞タイプで Cre を発現する CAG プロモーターと、神経細胞で特異的に Cre を発現する MAP2 プロモーターを利用することで、前駆細胞と神経細胞で Rb ファミリーを急性不活化した。急性不活化の方法は in utero エレクトロポレーション法 (図1) と in vitro エレクトロポレーション法 (図2) の両方で検討した。

なお、固定1時間前に EdU を投与し、S 期

の細胞を区別した。



### 4. 研究成果

in utero エレクトロポレーション法を用いた解析から、CAG-Rb-TKO 細胞と MAP2-Rb-TKO 細胞のどちらも細胞遊走の異常が認められ、Rb ファミリーが幼若神経細胞の遊走に必須であることが示唆された (図3)。また、CAG-Rb-TKO 細胞で Tuj1 陽性細胞が対照群と同程度存在し、また、Tuj1, Ki67 共陽性細胞の割合が顕著に増加していたことから、Rb ファミリーは神経前駆細胞の細胞周期離脱に必須であるが、細胞分化の開始を阻害しないことが示唆された (図3)。同様に、MAP2-Rb-TKO 細胞でも Tuj1, Ki67 共陽性細胞の割合が顕著に増加していたことから、Rb ファミリーは分化を開始した神経細胞の細胞周期再侵入阻止に必須であることが示唆された (図3)。

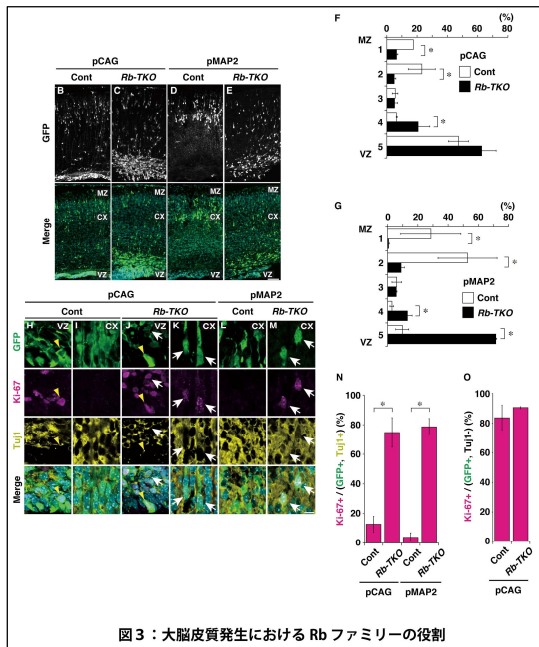


図3：大脳皮質発生におけるRbファミリーの役割

さらに細胞周期から離脱せずに分化を開始したCAG-Rb-TKO細胞が分化を進めるかどうかを検査するために、皮質層マーカーを用いて検査した。その解析の結果、異所的に配置されたCAG-Rb-TKO細胞は表層マーカーであるSatb2陽性で、深層マーカーのCtip1やTbr1陰性の傾向があったことから、CAG-Rb-TKO細胞は細胞周期から離脱せずに分化を進めることが示唆された。

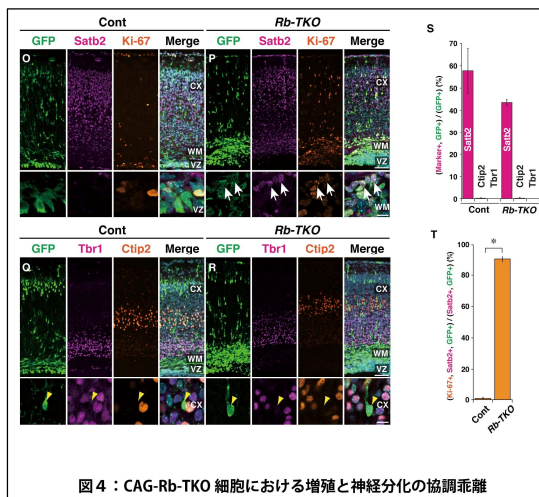


図4：CAG-Rb-TKO細胞における増殖と神経分化の協調乖離

次に、これらの細胞が実際に細胞周期を進めているかどうかを検査するために、in vitro エレクトロポレーション法を用いて検査した。その解析の結果、急性不活化4日後には、CAG-Rb-TKO幼若神経細胞とMAP2-Rb-TKO幼若神経細胞のどちらも細胞周期をS期へと進めることが示唆された。なお、Rbファミリーを欠損した前駆細胞自身の細胞周期は対照とほぼ同じであった。しかしながら、CAG-Rb-TKO幼若神経細胞、MAP2-Rb-TKO幼若神経細胞の両方とも細胞

周期をS期へと進めるにも関わらず、CAG-Rb-TKO幼若神経細胞のみ分裂期のマーカーリン酸化ヒストン陽性細胞の割合が増加した。別の方法で、CAG-Rb-TKO細胞のみが分裂するかどうかを検査するために、我々の独自の解析による遺伝子発現アレイデータベースを用いて詳細なGene Ontology解析を行ったところ、CAG-Rb-TKO細胞とMAP2-Rb-TKO細胞の両方で発現上昇する遺伝子群はS期に関連する遺伝子が多く、CAG-Rb-TKO細胞でのみ発現上昇する遺伝子群は分裂期に関連する遺伝子が多いことが明らかとなった。これらの結果から、CAG-Rb-TKO幼若神経細胞は分裂し、MAP2-Rb-TKO幼若神経細胞は細胞周期をS期まで進めるものの、分裂しないことが示唆された。

このCAG-Rb-TKO細胞が分裂期に至る分子メカニズムを明らかにするために、Gene Ontology解析を詳細に進めたところ、DNA修復に関連する遺伝子群がCAG-Rb-TKO細胞で特異的に発現上昇していることが明らかとなった。そこで実際に、CAG-Rb-TKO細胞においてDNA修復経路が活性化しているかどうかをDNA二重鎖切断マーカーであるH2-AXの免疫組織染色で検査した。その解析の結果、CAG-Rb-TKO幼若神経細胞でのみH2-AX陽性細胞が顕著に認められたことから、Gene Ontology解析の結果と矛盾なく、CAG-Rb-TKO細胞でDNA修復経路が活性化していることが示唆された。このDNA修復経路の活性化がCAG-TKO細胞の分裂に必須かどうかを検査するために、DNA修復経路の中心的役割を担うATR/ATMの阻害剤を添加して検査した。その結果、ATR/ATMの阻害剤の添加により、CAG-Rb-TKO細胞のEdU陽性細胞の割合は減少せず、リン酸化ヒストン陽性細胞の割合が減少し、CAG-Rb-TKO細胞の増殖にはDNA修復経路の活性化が必須であることが示唆された。

以上の結果から、1)神経前駆細胞でRbファミリーを欠損させると幼若神経細胞が増殖し、幼若神経細胞でRbファミリーを欠損させると増殖しないことが判明し、2)CAG-Rb-TKO細胞の分裂メカニズムの一端が明らかとなり、3)MAP2-Rb-TKO細胞が分裂期に至らないメカニズムの一端が明らかとなった。

本研究成果は、神経細胞が非分裂細胞である仕組みの一端を明らかにしたことで、国際的な評価を得た。

今後は疾患モデルにおける細胞周期の役割解明へと展開することで、神経変性疾患発症と脳腫瘍発症の統合的理解をめざす。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Mio Oshikawa, Kei Okada, Kazunori Nakajima, and **Itsuki Ajioka**\*\* (\*\*責任著者)

“ Cortical excitatory neurons become protected from cell division during neurogenesis in an Rb family-dependent manner”

*Development* 140, 2310-2320 (2013)

(査読あり)

DOI: 10.1242/dev.095653.

**Itsuki Ajioka**\*\*, Shizuko Ichinose, Kazunori Nakajima, and Hidehiro Mizusawa (\*\*責任著者)

“ Basement membrane-like matrix sponge for the three-dimensional proliferation culture of differentiated retinal horizontal interneurons”

*Biomaterials*, 32, 5765-5772 (2011)

(査読あり)

DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.062.

〔学会発表〕(計2件)

**味岡逸樹** (シンポジスト)

「神経発生学の知見を活かした傷害脳再生への試み」

第12回日本再生医療学会総会：横浜：

2013年3月21日～23日

**Itsuki Ajioka** (シンポジウムオーガナイザー)

“ The role of Rb family for cell cycle exit and migration during cerebral cortical development”

*The 11th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry/ The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry*, Kobe, Japan, September 30- October 2, 2012

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/med/cbir/ajioka.html>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

味岡 逸樹 (AJIOKA, Itsuki)

東京医科歯科大学・

脳統合機能研究センター・准教授

研究者番号：10348790