

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：35408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500440

研究課題名(和文)小胞体シグナリングの破綻による脳障害の解明

研究課題名(英文)The analysis of brain damage by dysfunction of the endoplasmic reticulum signaling

研究代表者

近藤 慎一 (Kondo, Shinichi)

安田女子大学・薬学部・准教授

研究者番号：20404395

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)：脳の発生における小胞体ストレス応答の関与を解明するために、我々はPERK遺伝子欠損マウスの脳を検討した。その結果、PERK遺伝子欠損マウスにおいて、脳の全体及び嗅球が委縮していることが明らかとなった。また、脳の成長段階において、サブプレートニューロンの小胞体ストレス応答が亢進していた。これらの結果は、小胞体ストレス応答が、脳の発生に重要な役割を担うことを示唆する。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of endoplasmic reticulum stress signaling in brain development, we examined the brain of PERK-deficient mice. We showed that the size of whole brain and olfactory bulb were smaller in PERK-deficient mice. In addition, the endoplasmic reticulum stress occurs in mouse subplate neurons at developmental stage. These results suggest that ER stress response have the important role in brain development.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞生物学 神経科学

1. 研究開始当初の背景

小胞体において構造異常を起こしたタンパク質、いわゆるミスフォールディングタンパク質(異常タンパク質)が過剰に蓄積した状態を、小胞体ストレス(ER stress)とよぶ。この小胞体ストレスからの防御機構として、小胞体ストレス応答(ER stress response)またはunfolded protein response (UPR)と呼ばれる応答機構が細胞には存在する。

小胞体ストレス応答は、酵母から哺乳細胞に至るまで真核細胞に広く保存されている細胞の防御システムである。小胞体ストレスセンサーは、小胞体内腔に蓄積した異常タンパク質を感知し、シグナルを核や細胞質に伝えるタンパク質で、哺乳細胞では3種のセンサーIRE1 (inositol-requiring enzyme-1)、PERK (protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase)、ATF6 (activating transcription factor-6)が存在する。

最近になって、小胞体ストレス応答の不全が、糖尿病や癌など、様々な疾患に関与することが明らかとなってきた。また、生理的な小胞体ストレス応答が、軟骨細胞や形質細胞など細胞の分化・増殖に大きな役割を担っていることが明らかにされた。

脳の大脳皮質の発生および進化には、脳室下帯(subventricular zone: SVZ)にある中間前駆細胞(intermediate progenitor cells)の分化・増殖が重要であることが明らかとなっている。しかしながら、脳の発生時における神経細胞の分化・増殖と小胞体ストレス応答の関与については、ほとんどわかっていない。また、神経細胞の分化や脳高次機能に対して、小胞体ストレス応答不全マウス(遺伝子改変マウス)を解析した *in vivo* レベルの報告は少なく、未解明の部分が多い。

小胞体ストレスセンサーPERKのノックアウトマウスは、膵臓細胞において細胞死が見られること、骨芽細胞において骨基質であるコラーゲンI型の分泌が低下していることなどが報告されていたが、神経細胞に関する報告はなかった。一方、ヒトPERK遺伝子は、Wolcott-Rallison syndrome (WRS)の原因遺伝子であることが報告されており、骨端形成異常、成長遅延、肝臓・腎臓不全などの他に、精神遅滞を呈する。これらのことから、小胞体ストレス応答が、神経細胞の分化・増殖にも関与することが示唆されていた。

2. 研究の目的

小胞体ストレス応答の研究は、今まで *in vitro* が中心であった。最近になって遺伝子改変マウスの解析により、小胞体ストレス応答の不全は、糖尿病・肥満・骨代謝・癌・神経変性といった疾患の発症に関与することが明らかになってきた。しかしながら、神経発生異常や精神疾患への関与については、ほとんどわかっていない。また、神経前駆細胞から神経細胞への分化制御は、外部からのシグナル伝達や転写因子の非対称分配、クロマチン修飾によるエピジェネティクス等の関与は多数報告されているが、「小胞体の状態」に注目した研究については、ほとんど報告されていない。

そこで、本研究においては、神経細胞の分化・増殖における小胞体ストレス応答の関与を *in vivo* レベルで解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PERK ノックアウトマウスの脳の解剖学的・組織学的解析:

PERK ノックアウトマウスの脳を解剖学的・組織学的に解析した。小胞体ストレス応答について、小胞体ストレスのマーカー遺伝子の発現を、以下の抗体を用いた免疫組織化学により検討した。anti-KDEL 抗体、anti-BiP 抗体、anti-XBP1 抗体、anti-phospho-eIF2 抗体、anti-CHOP 抗体、anti-spliced XBP-1 抗体。また、*in situ* hybridization 法を用いて、小胞体ストレスマーカー分子(spliced XBP1)の発現を検討した。

大脳皮質の層構造構築における小胞体ストレス応答の関与を検討するために、以下の抗体を用いた免疫組織化学を行った。anti-Cux1 抗体(Layer2-4のマーカー分子)、anti-Ctip2 抗体(Layer5のマーカー分子)、anti-ER81(Layer5のマーカー分子)、anti-Foxp2 抗体(Layer6のマーカー分子)、anti-Tbr1 抗体(Layer6のマーカー分子)、anti-Brn2 抗体(upper層のマーカー分子)、anti-Pax6 抗体(VZ層のマーカー分子)、anti-Tbr2 抗体(SVZ層のマーカー分子)、anti-CTGF(サブプレートニューロンのマーカー分子)抗体。

また、脳発生時における細胞分裂を検討するために、以下の遺伝子の mRNA の発現を in situ hybridization 法を用いて検討した。Pax6(NM_013627)、Brn2 (NM_008899)、Cux2 (NM_007804)、NeuroD6 (NM_009717)、Tbr2(NM_010136)。

さらに、細胞分裂については、ニッスル染色および Hematoxylin and eosin stain(HE)染色等の一般染色の他に、分裂マーカーとして分裂中期の細胞を特異的に認識するリン酸化ヒストン 3 (phosphorylated histone 3, Phospho H3) 抗体による脳の免疫組織化学を行い、PERK ノックアウトマウスにおける中間前駆細胞の細胞分裂を検討した。

(2) 野生型マウスの脳の解剖学的・組織学的解析:

大脳皮質の 6 層構造構築における神経細胞の分化・増殖・移動と小胞体ストレス応答の関係を明らかにするために、野生型マウスの解剖学的・組織学的解析を発生段階に応じて検討した。

PERK ノックアウトマウスと同様に、各種小胞体ストレス応答遺伝子の免疫組織化学や、大脳皮質の層構造のマーカー遺伝子の免疫組織化学および in situ hybridization 法、さらに細胞分裂の検討をリン酸化ヒストン 3 (phosphorylated histone 3, Phospho H3) 抗体による脳の免疫組織化学を行い、PERK ノックアウトマウスと比較検討した。

4. 研究成果

(1) PERK 欠損マウスでは、脳全体が委縮していた。組織レベルで検討すると、大脳皮質、大脳基底核、脳幹などにおいて層構造や位置に顕著な差は見いだせなかったが、全体的に委縮しており細胞数が減少していた。特に委縮が顕著であった部位は、嗅球であった。嗅上皮および嗅神経も委縮していた。

(2) PERK 欠損マウスの大脳皮質の層構造を検討するために、anti- Cux1 抗体 (Layer2-4 のマーカー分子)、anti-Ctip2 抗体 (Layer5 のマーカー分子)、anti-ER81(Layer5 のマーカー分子)、anti-Foxp2 抗体 (Layer6 のマーカー分子)、anti-Tbr1 抗体 (Layer6 のマーカー

分子)、anti- Brn2 抗体 (upper 層のマーカー分子)、anti-Pax6 抗体 (VZ 層のマーカー分子)、anti-Tbr2 抗体 (SVZ 層のマーカー分子)、anti-CTGF((サブプレートニューロンのマーカー分子)抗体を用いた免疫組織化学により検討したが、全体的には層構造の構築に、野生型との顕著な差をなかった。また、mRNA の発現パターンにおいても顕著な差を見出すことはできなかった。

ミュータントマウスのリーラー (reeler) では、Cajal-Retzius 細胞から特異的に分泌される Reelin が欠損していることにより、6 層構造が異常になることが報告されている (outside-in)。しかしながら、PERK ノックアウトマウスの脳では、そのような層構造の異常は観察されなかった。

(3) 野生型マウスの脳に対して解剖学的・組織学的解析を発生段階に応じて検討すると、大脳皮質の 6 層構造構築に重要な役割を担うサブプレートニューロンにおいて、顕著な小胞体ストレス応答の亢進が検出された。サブプレートニューロンは大脳皮質で最初に生まれる機能的な神経細胞であり、大脳皮質の領域分化などに関わるとされているが、未だよくわかっていない部分が多い。6 層構造の構築が終了した段階でサブプレートニューロンは細胞死により消失するとする報告もあるが、細胞死は見いだせず、逆に小胞体ストレス応答は亢進していた。

(4) PERK 欠損マウスにおいて、嗅球が顕著に委縮していた。細胞分裂は抑制され、小胞体ストレス応答は亢進していた。

これらの結果から、小胞体ストレス応答は、脳の発生に関与していることが示唆された。今後は、神経細胞の増殖・分化を制御している細胞内シグナルと小胞体ストレス応答の関係を明らかにし、発達障害などの発症メカニズムの解明を目指す。

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)

Kondo S, Al-Hasani H, Hoerder-Suabedissen A, Wang WZ, Molnár Z.: Secretory function in subplate neurons during cortical development. Front Neurosci.,

2015, 査読有

6 . 研究組織

(1)研究代表者

近藤 慎一 (KONDO, Shinichi)

安田女子大学・薬学部・准教授

研究者番号：20404395