

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700314

研究課題名(和文) 転写因子Nfil3による神経変性の抑止機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of Nfil3-mediated suppression of neurodegeneration

研究代表者

倉林 伸博 (Kurabayashi, Nobuhiro)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40581658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、運動神経が変性し、脱落することによって引き起こされる神経変性疾患である。本研究では、筋萎縮性側索硬化症のモデルマウスを用いた解析により、転写因子Nfil3が神経保護システムにおいて重要な役割を果たすことを見出した。さらに、Nfil3によって制御を受けているであろう因子を探索し、それらのALS細胞モデルにおける保護機能を解析した結果、神経細胞の防御機構に関する新規因子を発見した。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by the loss of motor neurons. In this study, by using an ALS mouse model, we found that transcription factor Nfil3 is a neuroprotective molecule intrinsic to the neuronal defense mechanism. In addition, we searched for the molecule(s) which may acts downstream of Nfil3 and affects neuroprotective systems in cell-based ALS model. We identified a novel molecule which may constitute a cell defense mechanism in neurons.

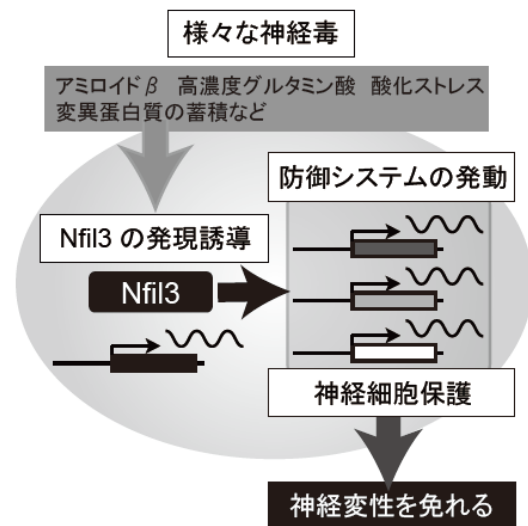
研究分野：発生神経科学

キーワード：神経変性 筋萎縮性側索硬化症 Nfil3

1. 研究開始当初の背景

認知・記憶・運動系の制御などの高次脳機能は、中枢神経系の神経細胞によって担われている。そのため、神経変性疾患によって神経細胞の変性や神経細胞死が引き起こされると、高次脳機能の障害が認められる。したがって、生涯にわたって神経細胞が健全に維持されることは、高次脳機能の維持に必要な不可欠である。神経細胞は基本的には自己複製しないため、神経細胞が機能的・構造的に維持されるには、細胞傷害性のストレス刺激から自己を保護する防御システムが重要な役割を果たすと考えられる。この防御システムの理解は、神経変性疾患の治療法の開発につながると共に、神経変性疾患に伴う神経変性を予防するという観点からも極めて重要である。それにもかかわらず、神経細胞に内在する防御システムの理解は進んでいない。

これまでに申請者らは、Nfil3 と呼ばれる bZIP 型の転写因子が神経細胞の自己防御システムに重要な役割を果たすことを見出した。すなわち、培養した大脳系神経細胞を細胞ストレスとなる種々の神経毒（高濃度グルタミン酸やアミロイド β）によって刺激すると、Nfil3 の発現量が顕著に増加した。重要なことに、Nfil3 の発現を抑制すると、神経細胞は神経毒に対して脆弱になった。対照的に、Nfil3 を過剰発現させると、神経細胞が保護された。このことから、Nfil3 は様々な神経毒によって発現が誘導され、下流の遺伝子群の調節を介して神経細胞を保護する重要な分子であることが示された（図）。



図： Nfil3の役割モデル
様々な神経毒に神経細胞がさらされた場合、Nfil3の発現が亢進し、さらにNfil3によって様々な遺伝子の発現が誘導される。これら遺伝子群の神経保護作用によって、神経細胞は神経変性を免れて健全に維持される。

2. 研究の目的

これまでの申請者らの研究により、bZIP 型の転写因子 Nfil3 は様々な神経毒によって発

現誘導され、下流の遺伝子群の調節を介して神経細胞を保護する重要な分子であることが示された。本研究ではまず、神経防御システムにおける Nfil3 の生理的役割を調べる。この解析により、Nfil3 の発現が神経変性疾患の発症を抑止しうる可能性に迫る。

さらに、本研究で着目する転写因子 Nfil3 は、下流の遺伝子群の発現を調節することによって神経変性を抑止していると考えられる（図）。そこで本研究では、Nfil3 によって転写制御される分子を探索し、その中で神経変性の抑止に関わる因子を同定する。この因子の解析を通じて、Nfil3 を介した神経保護システムの全容に迫る。

Nfil3 の発現を人為的に活性化できれば、神経変性の進行を遅延・抑止することができる可能性がある。申請者らはこれまでに、低コレステロール状態において Nfil3 の転写が活性化される可能性を示した [Hatori et al., PNAS 2011]。また興味深いことに、低コレステロール状態はアルツハイマー病などの神経変性疾患の発症を遅延させる可能性が複数の論文によって示唆されている。これらの知見をもとに申請者は、『低コレステロール状態は、Nfil3 の転写を促進して神経細胞を保護する』という作業仮説を立てた。本研究ではこの仮説を検証し、低コレステロール状態が神経変性を抑止する際に Nfil3 が重要な役割を果たすことを示す。

3. 研究の方法

(1) Nfil3 の神経保護作用の解析

本研究計画においては、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) のモデルマウス (SOD1-G93A トランスジェニックマウス) を用いる。生体において Nfil3 の発現が神経変性を抑止しうるかを検証するため、申請者らは、Nfil3 を中枢神経系特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製した。本研究では、複数のトランスジェニックマウスのラインを用いて、二重変異マウスの疾患の発症時期を解析すると共に、その進行度に及ぼす影響を精査する。具体的には、組織染色などによる病理学的解析と並行して、運動神経の変性に伴う筋萎縮や運動障害の解析を行う。

(2) Nfil3 の下流分子群の同定

神経変性の抑止に関わる Nfil3 の下流因子を同定・解析するため、以下の 2 つの課題を実施する。

マイクロアレイによる Nfil3 下流分子群の同定

Nfil3 の下流で作用する遺伝子群を探索するため、Nfil3 トランスジェニックマウスの中脳神経系を用いたマイクロアレイ解析を行う。Nfil3 トランスジェニックマウスにおいて発現量が変化する遺伝子を Nfil3 の下流因子の

候補とし、その中から、神経変性を抑止する能力があるものを発掘する。

神経変性抑止における Nfil3-Per2 シグナリングの役割解析

以上の実験として並行して、Nfil3 の下流候補と考えられる Period2 (Per2) の解析を実施する。従来より、Nfil3 は哺乳類の概日時計システムにおいて重要な役割を果たすことが知られている。この時計システムにおいて Nfil3 は、Per2 と呼ばれる時計遺伝子の発現を抑制する。そこで、本研究では培養神経細胞を神経毒で刺激した際に、Nfil3 の発現誘導に伴って Per2 の発現レベルが下がるか否かを検証する。さらに、Per2 を過剰発現・ノックダウンした培養神経細胞における神経毒に対する耐性を調べる。さらに、神経保護システムにおける Per2 のシグナリングの生理的意義を解析する。そのためにまず、Per2 ノックアウトマウスと ALS モデルマウスを交配させて二重変異マウスを作製し、神経変性疾患の発症時期や進行度が遅延するかを精査する。一方で、Per2 のトランスジェニックマウスを用いた実験も実施し、神経変性疾患の発症時期や進行度が早くなる可能性を検証する。

(3) 低コレステロールによる Nfil3 の発現誘導と神経変性の抑止

従来、細胞内のコレステロール含量の感知には、SREBP (sterol regulatory element-binding protein) という分子が重要な役割を果たすことが知られる。SREBP は低コレステロール状態になると活性化し、コレステロール合成に関わる遺伝子群の転写を誘導する。これまでの研究において申請者は、Nfil3 遺伝子の上流配列に SREBP の結合サイトが存在し、活性化型 SREBP の発現によって Nfil3 の発現が促進することを明らかにした。そこで、『低コレステロール状態が Nfil3 の転写を促進し、神経変性を抑止する』という作業仮説を検証する。そのため、細胞内のコレステロール含量を低下させることが知られるスタチン系薬剤や ACAT 酵素の阻害剤を培養神経細胞に投与し、これらの培養神経細胞において、SREBP の活性化に伴って Nfil3 の転写が促進するかを検証する。以上の実験と並行して、薬剤投与によって低コレステロール状態にしたマウスの中枢神経系において、SREBP が活性化し、Nfil3 の発現が促進するかを調べる。また、低コレステロール状態による神経保護システムにおいて Nfil3 が重要な役割を果たすならば、Nfil3 の発現量を低下させると低コレステロールによる神経保護効果が減弱または消失すると期待できる。そこで、Nfil3 をノックダウンした培養神経細胞において薬剤の効果が減弱または消失するかを調べ、低コレステロールと神経保護をつなぐ分子

基盤に迫る。

4. 研究成果

(1) Nfil3 の神経保護作用の解析

これまでの申請者らの研究により、bZIP 型の転写因子 Nfil3 は様々な神経毒によって発現が誘導され、下流の遺伝子群の調節を介して神経細胞を保護する重要な分子であることが示された。神経防御システムにおける Nfil3 の生理的役割を調べるため、Nfil3 を神経系特異的に発現するトランスジェニックマウスと筋萎縮性側索硬化症モデルマウスを交配させた二重変異マウスを作製し、疾患の発症や進行の解析を行った。その結果、Nfil3 を過剰発現するマウスにおいては、疾患の進行に伴って起こる体重減少の開始時期が遅延していることが明らかになった。また、脊髄における運動神経の軸索の数を調べることで、運動神経の脱落への影響をより直接的に検証した。具体的には、脊髄の凍結切片を作製し、免疫組織染色に供した。このような病理学的解析を行ったところ、Nfil3 の過剰発現によって運動神経の脱落が抑制されていることを見出した。つまり、Nfil3 の発現は神経細胞を保護し、神経変性疾患の発症抑止に大きく寄与すると考えられた[Tamai et al., JBC 2014]。

(2) Nfil3 の下流分子群の同定

Nfil3 トランスジェニックマウスの中枢神経系 (脊髄および大脳新皮質) を用いたマイクロアレイ解析を行った。その結果、野生型のマウスと比較して発現量が顕著に変化する遺伝子を複数同定した。さらに、Nfil3 の下流候補である Per2 に着目した実験から、培養神経細胞への細胞毒刺激により Per2 の発現レベルが低下することを明らかにした。そこで次に、Per2 の発現レベルが神経毒に対する抵抗性に影響を及ぼすかを解析した。培養神経細胞において Per2 を過剰発現させると、神経細胞は神経毒に対して脆弱になった。対照的に、Per2 の発現を shRNA によって抑制すると、神経細胞が保護された。これらの傾向は、神経培養細胞において変異型 SOD1 を発現させた、ALS の細胞モデルにおいても認められた。以上の結果は、Per2 の発現制御が神経保護システムに重要な役割を果たす可能性を示すものである。さらに、神経保護システムにおける Per2 のシグナリングの生理的意義を解析するため、Per2 ノックアウトマウスと ALS モデルマウスを交配させて二重変異マウスを作製した。このマウスにおける神経変性疾患の発症時期や進行度を、体重測定・ロータロッドテスト・ならびに脊髄の凍結切片を用いた病理学的解析によって精査した。一方で、Per2 を過剰発現するトランスジェニックマウスと ALS モデルマウスを交

配させた二重変異マウスを作製し、同様の実験を実施した。

(3) 低コレステロールによる Nfil3 の発現誘導と神経変性の抑止

Nfil3 の発現を誘導するシグナルの解明においては、培養神経細胞を低コレステロール状態にすると Nfil3 が発現上昇することを見出した。以上の実験と並行して、薬剤投与によって低コレステロール状態にしたマウスの中枢神経系において、Nfil3 の発現が促進する可能性を見出した。これらの知見は、低コレステロール状態が Nfil3 を介して神経保護効果をもたらす可能性を示唆する。

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 5 件)

1. Hirano A, Kurabayashi N, Nakagawa T, Shioi G, Todo T, Hirota T and Fukada Y. (2014) *In vivo* role of phosphorylation of Cryptochrome2 in the mouse circadian clock. *Mol. Cell. Biol.*, 34, 4464-4473. doi: 10.1128/MCB.00711-14【査読有】
2. Tamai S, Imaizumi K, Kurabayashi N, Nguyen MD, Abe T, Inoue M, Fukada Y and Sanada K. (2014) Neuroprotective role of the basic leucine zipper transcription factor NFIL3 in models of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* 289, 1629-1638. doi: 10.1074/jbc.M113.524389【査読有】
3. Kurabayashi N and Sanada K. (2013) Increased dosage of DYRK1A and DSCR1 delays neuronal differentiation in neocortical progenitor cells. *Genes Dev.* 27, 2708-2721. doi: 10.1101/gad.226381.113. 【査読有】
4. Kurabayashi N, Nguyen MD and Sanada K. (2013) The G protein-coupled receptor GPRC5B contributes to neurogenesis in the developing neocortex. *Development* 140, 4335-4346. doi: 10.1242/dev.099754. 【査読有】
5. Koizumi H, Kurabayashi N, Watanabe Y and Sanada K. (2013) Increased Anxiety in Offspring Reared by Circadian Clock Mutant Mice. *PLoS One* 8, e66021. doi: 10.1371/journal.pone.0066021【査読有】

[学会発表](計 6 件)

1. 倉林伸博, Studies on molecular mechanism underlying abnormal differentiation of cortical

progenitor cells in Down's syndrome、第8回神経発生討論会、2015年3月19日、九州大学病院キャンパス(福岡県)

2. 武尾優、Role of GPCR in Fate-Determination of Cortical Neural Progenitor Cells、第8回神経発生討論会、2015年3月19日、九州大学病院キャンパス(福岡県)
3. 倉林伸博、ダウン症関連因子DYRK1AとDSCR1の過剰発現による神経幹細胞の神経分化抑制、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜(神奈川県)
4. 武尾優、大脳新皮質神経前駆細胞の運命決定における7TMの役割、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜(神奈川県)
5. 今泉景介、bZIP型転写因子Nfil3による筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの神経変性の抑止、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県)
6. 倉林伸博、筋萎縮性側索硬化症モデルにおけるNfil3の神経保護作用、第85回日本生化学会大会、2012年12月14日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

アウトリーチ活動の一環として、2012、2013、2014年度東京大学理学部オープンキャンパスにて、申請者が所属する施設の研究紹介を行った。

以下の研究室ホームページにて、申請者らの研究の目的や成果を掲載している。
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/mgrl/sanada/index.html>

また、以下のサイトにて、申請者らの発表した論文のプレスリリースを閲覧できる。
<http://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2013/48.html>

<http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/research-news/identification-of-novel-neuroprotective-molecule-effective-in-als-mouse-models/>

- ## 6 . 研究組織
- (1)研究代表者

倉林 伸博 (Kurabayashi Nobuhiro)
東京大学・大学院理学系研究科附属遺伝子
実験施設・助教
研究者番号：40581658

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし