

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700355

研究課題名(和文) p73シグナルが関与する成体神経新生異常と抑うつ様行動発症機構の解明

研究課題名(英文) p73 signaling regulates mice depressive behavior thorough control of adult neurogenesis.

研究代表者

藤谷 昌司 (Fujitani, Masashi)

大阪大学・連合小児発達学研究所・助教

研究者番号：40376372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：低容量糖質コルチコイドをマウスに投与したが、ストレス状態を作成できなかった。p73遺伝子配列にLacZ発現カセットが挿入されたノックイン/ノックアウトマウスを作成して、ヘテロマウスを用いてp73の発現を確認したところ、p73の発現は、成体では海馬には認められなかった。そこで、拘束刺激を加える事により、うつ状態を惹起したが、海馬におけるp73の発現に変化は見られなかった。しかし、脳損傷後2日目の急性期において側脳室上衣細胞において、TAp73の発現が上昇するとともにBrdU 取り込み細胞数が低下した。p73ヘテロ型マウスでは損傷後の側脳室上衣細胞の増殖低下が抑制される傾向が認められた。

研究成果の概要(英文)：In order to establish animal model of depression, low dose glucocorticoid was administered to wild type mice as previous report, but it failed. Then we established p73 knock-in and knock-out mouse, and confirmed p73 has no expression in adult hippocampus. Even with restraint, p73 expression is not changed in hippocampus. However we have finally found that p73 regulates ependymal cell cycle. Brain injury induces TAp73 expression and it decreases ependymal cell proliferation via unknown humoral signaling.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：p73 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

I. p53 ファミリーについて

癌抑制遺伝子である p53 は細胞内外からの刺激を受けて、細胞死、細胞周期停止、DNA 修復など様々な細胞応答を惹起する。また、p53 には p63 と p73 という蛋白構造が類似するアイソフォームに加えて、アミノ末端を欠く Δ Np63, Δ Np73 というアイソフォームを持つ。これらは全長型の TAp63/TAp73 とは異なるプロモーターから転写され、細胞死に関しては p53 に対してドミナント・ネガティブとして働くことが分かっている。

II. p73 と海馬神経新生の関係

申請者は、更に神経細胞死のみならず、中枢神経系における p53 ファミリーの役割を TAp73 を中心として解明してきた。

特にこの研究の有力な根拠となる、

A) 全長型のみが欠損した、TAp73 ノックアウトマウスには海馬の歯状回の異常を呈すること。(Tomasini, Fujitani et al., Genes and development 2008 (共著))

B) また、全長型の TAp73 が bHLH 遺伝子である Hey2 を介して胎生 12~13 日の神経前駆細胞の分化を負に制御、成体に至るまで神経幹細胞プールの維持・正常な神経新生に必要であることを見いだした。(Fujitani M et al. Current biology 2010)

これらのことから、TAp73 が海馬の神経回路の形成に重要で、神経新生を介して、抑うつと密接な関係があるのではないかと考えられた。(仮説 1)

III 海馬における神経新生と抑うつの関係について

近年、うつ病患者と海馬の容積の低下、変性の可能性が報告されている。

また、動物モデルを用いて、成体海馬における神経新生が、抑うつ様行動と関係があることが様々な研究グループにより報告されている。特に、マウスにおいて抗うつ薬による神経新生の増加を特異的に阻害することにより、抗うつ薬が抑うつ様行動を抑制する反応が無くなる。(Santarelli L et al., Science 2003)、また、最近では海馬での神経新生を特異的に抑制することにより、抑うつ様行動を引き起こす糖質コルチコイドのマウスの血中濃度の上昇が認められる。(Snyder JS et al. Nature 2011)、このように、神経新生自体が抑うつ様行動を制御していることが多くの論文によって示されてきた。

IV. p73 とグルココルチコイドシグナルとの相互作用

一方、ストレスにより放出される、糖質コルチコイドのシグナル伝達機構は、p53 のシグナルと絡めて様々な細胞腫で検討されている。神経芽腫細胞では p53 ファミリーと糖質コルチコイド受容体(GR)が蛋白-蛋白相互

作用を介して、お互いのターゲット遺伝子のプロモーターに対して負に制御し合う。(Sangputa S et al., EMBO j.2000) また、神経前駆細胞株においては、p53 が糖質コルチコイドの下流のシグナルとして、細胞周期停止作用を担う。(Crochemore C et al., FASEB j 2002) 更に、TAp73 が GR と結合することも報告されている。(Zhang L et al., Mol Cancer 2006) 他方、糖質コルチコイドは細胞周期を停止させ、神経幹細胞から神経細胞への分化を促進することが多くの論文により証明されている。(Sundberg M et al., J neuroscience 2006 など)

2. 研究の目的

これらの基礎データと(仮説 1)とを合わせて、「TAp73 と糖質コルチコイドシグナルの相互作用が成体海馬における神経新生に作用し、抑うつ様行動を制御する」という仮説をたて、以下に示す具体的な項目に関して検討を行う。

TAp73 ノックアウトマウスを用いて、以下のことを解明する。

- (i) 種々のストレス負荷による抑うつ様行動に TAp73 が関与していることを行動学的に証明
- (ii) その原因となると考えられる海馬における神経新生への影響を証明
- (iii) 海馬の神経新生異常の原因と考えられる視床下部/下垂体/副腎系への影響を解析
- (iv) TAp73 による糖質コルチコイドシグナルに対する分子相互作用を解明し、抑うつ様行動を制御する分子機構を解明

3. 研究の方法

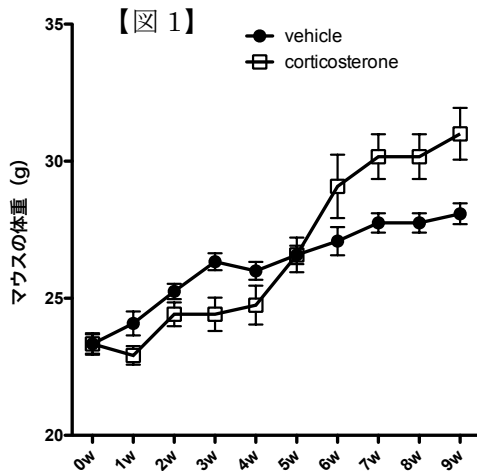
- i) 種々のストレス負荷による抑うつ様行動に p53 ファミリー分子が関与していることを行動学的に証明
- ii) 海馬における神経新生への影響を証明
- iii) マウスの視床下部-下垂体-副腎系への影響の解析
- iv) p53 ファミリーによる糖質コルチコイドシグナルに対する分子相互作用の解析

4. 研究成果

- i) 種々のストレス負荷による抑うつ様行動に TAp73 が関与していることを行動学的に証明するために、先行研究 (David DJ et al., neuron 2009) の方法と同様に、低容量糖質コルチコイド 35ug/ml 5mg/kg/day) を飲水内に混合し、経口的に投与することで、ストレス状態に近い状況を作り出すことを試みた。

(マウスの体重変化)

マウスの体重変化は、報告と同様の経過をたどり、有意にコルチコステロン投与群のほうが体重が増加し、肥満傾向を示すことがわかった。【図 1】

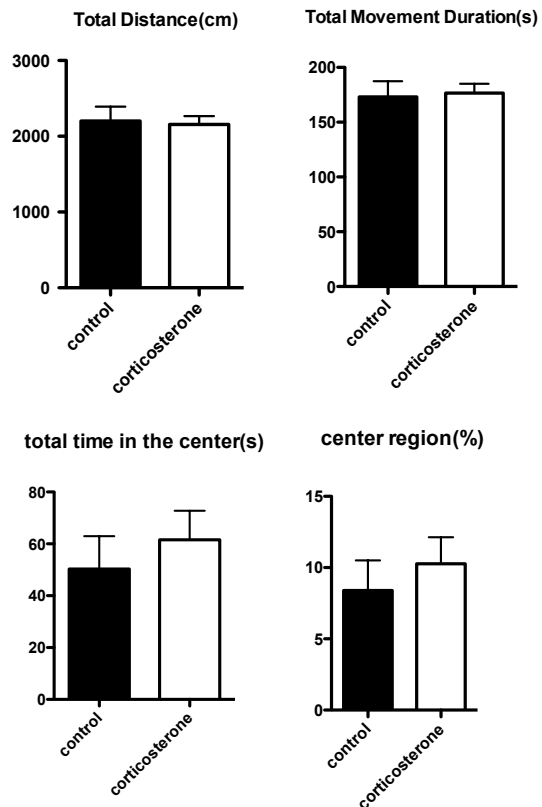


そして、投与開始後 9 週の時点において、オープンフィールドテストを行った。(各群 n=12) 【図 2】
(全て Student t test にて有意差なし)

先行研究 (David DJ et al., Neuron 2009) では、オープンフィールドテストにより、有意な不安傾向の増大が認められるため、Total distance が低下, Total time in the center も低下するはずであったが、全く再現性が取れなかった。これに関しては、マウスの系統の違い C57BL/6J と C57BL/6NTac の違いがあった可能性がある。いずれにせよ、マウスへのストレス負荷による神経新生を検討する実験系としては不適切であると結論づけられた。

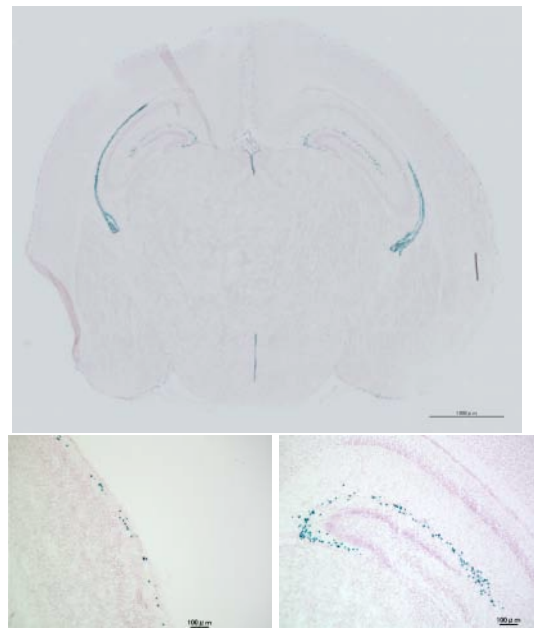
次に、神経新生を TAp73 が制御することが前提であるため、TAp73 の発現が海馬で見られるかどうか検討した。先行研究により TAp73 の免疫染色は成体のマウスの脳では極めて困難であることがすでになっていたため、労力はかかるものの、p73 の遺伝子座に LacZ 発現カセットが挿入されたノックインマウスを作成することを決断した。KOMP より LacZ 発現カセット及び、スプライスアクセプターが発現するカセットが p73 遺伝子座に相互転座された ES 細胞を購入し、大阪大学微生物病学研究所発生工学会に依頼して、キメラマウスを作成した。幸い、生殖系列伝播に成功し、p73 のノックイン+ノックアウト (p73KI+KO) マウスが完成した。まず、発達期の脳における発現を確認した。生後 5 日齢のヘテロマウスの凍結切片を作成し、X-gal 染色法により p73 の発現部位を検討した。【図 3-1】に示す通り、側脳室、第 3 脳室、第 4 脳室の上皮細胞層および、脈

【図 2】

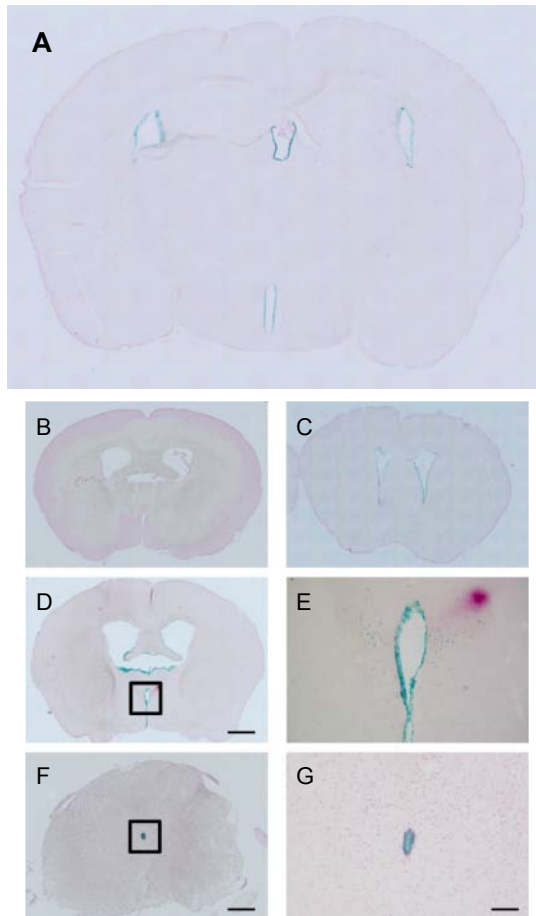


絡叢、そして未成熟な歯状回、皮質の第一層における発現が確認された。

【図 3-1】



【図 3-2】

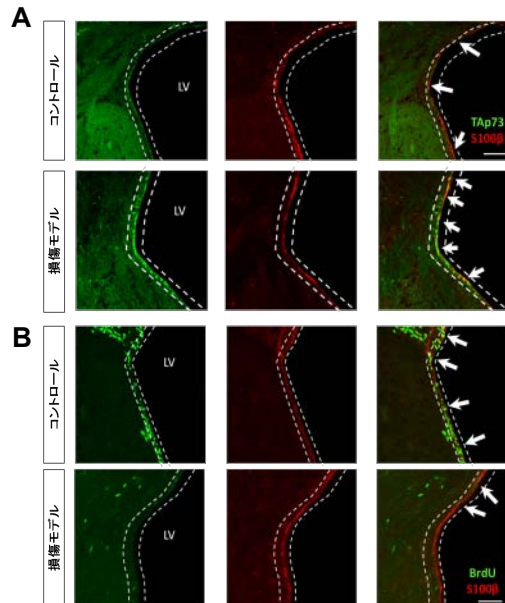
B は wild type マウスで
negative control

次に、2ヶ月齢のマウス脳における p73 の発現を検討した。次頁の【図 3-2】に示されるとおり、側脳室 (A, C, D)、第 3、第 4 脳室 (A, D, E)、脊髓中心管 (F, G) において上皮細胞層にほぼ特異的に発現が観察された。また、海馬には発現が一切確認することができなかった (A)。そこで、定常状態においては発現が認められない p73 が、ストレス下などの刺激に暴露された時に、発現の変化が想定されたため、当初の計画通り、このマウスを用いて拘束刺激を加える事により、うつ状態の惹起を試みた。しかし、p73 の発現に変化は見られなかった。従って、p73 は発達期における歯状回形成については重要な役割を果たすが、成体海馬においてはあまり関与がないことが示された。

ただ、神経幹細胞への影響が否定されたわけではなく、特に、上皮細胞層は、損傷により神経幹細胞化する可能性が示唆されている。従って、損傷による p73 の発現変化について検討を行った。まず、免疫染色法により、TAp73 の発現が LacZ 蛋白の発現と合致することを確認した。(上皮細胞層は非特異的反応が出やすい部分であるが、既に示した X-gal 染色の結果から正しいシグナルであることが確認できている。)

つぎに、野生型の脳損傷モデルマウスを用

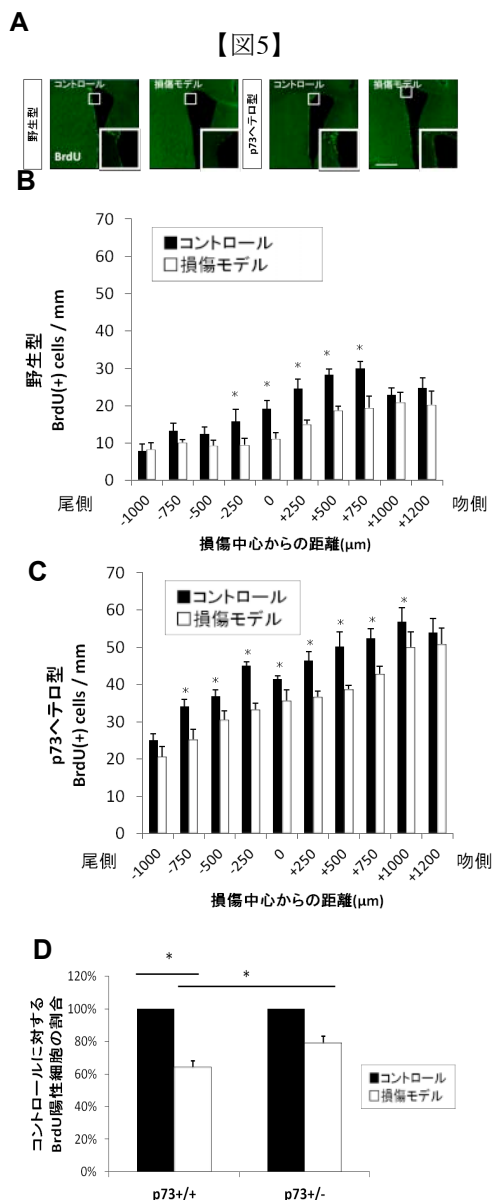
【図 4】



いて損傷後 2 日目における側脳室 上皮細胞の TAp73 の発現変化及び、BrdU の取り込みを指標とした上皮細胞の増殖能を免疫染色法にて検討した。損傷後 2 日目の野生型マウスにおいて、側脳室上皮細胞層で TAp73 の蛋白発現がコントロールに比べ上昇していることが確認された【図 4A】。また、BrdU の取り込みはコントロールに比べ、上皮細胞層で低下していることが観察された【図 4B】。

次にそれを定量評価するために、側脳室周囲の長さ 1 mm あたりの BrdU 陽性細胞を計測した。BrdU 陽性上皮細胞の数が野生型のコントロールに比べ、p73 ヘテロ型では約 2 倍増加していた【図 5A,B,D】。この結果から p73 は非損傷下において上皮細胞の細胞増殖を抑制することが示唆された。次に、損傷モデルを用いてコントロールマウスと比較検討した。損傷周囲部 (-750 μm ~ +750 μm) の野生型と p73 ヘテロ型の増殖細胞の減少率を比較した【図 5A,C,D】。野生型では約 40% 減少しているのに対し、p73 ヘテロ型では 20% の減少となった。このことから、p73 のハプロインサフィシエンシーにより損傷後においても、細胞増殖能の低下が阻害されることがわかった。最後に、TAp73 の発現が上昇する意義を検討するために、脳損傷における DNA ダメージの影響を検討した。DNA ダメージの指標として、DNA 二本鎖切断が生じた際の細胞応答の一つである、リン酸化 H2AX (γH2AX) の発現を免疫染色法にて検証した。野生型、p73 ヘテロ型のどちらのマウスも損傷周囲近傍部に多数の γH2AX の発現細胞が見られたが、側脳室周囲には見られなかった【図 6A】。このことから、脳質壁上皮細胞は DNA ダメージを受けていないと考えられる。p73 は細胞死に関与していることが報告されている。そこで、損傷により上皮細胞の細胞死が

起きているか検証するために、アポトーシスの主要な実行分子の一つである活性型の

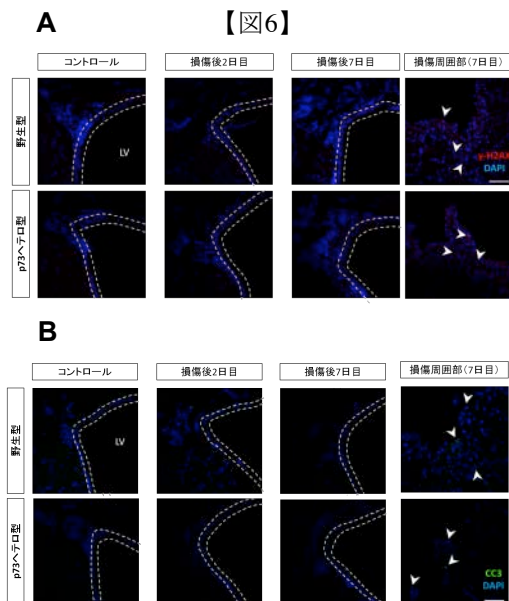


Caspase-3(Cleaved Caspase-3)の発現を免疫染色法にて確認した。損傷周囲部近傍にて Cleaved Caspase-3 の発現が認められた【図6B)。しかし、側脳質周囲ではほとんど発現細胞は見られなかった。従って、細胞増殖の低下は細胞死によるものではないと考えられる。

(考察)

TAp73 は TAp73 のアイソフォーム特異的ノックアウトマウスの解析結果から歯状回の発生や、脳内の神経幹細胞の維持に必須であることが報告されている。本研究では、脳損傷後に TAp73 の発現が上昇することで p21 の経路を介し、神経幹細胞として働く上衣細胞の細胞周期を制御することが強く示唆された。また、TAp73 の発現上昇がアポトーシスの誘導にも関与していないことが観察され

た。このことから、TAp73/p21 経路を介した増殖制御が、損傷後に何かしらの生理的意義



を持つと考える。この TAp73 の発現上昇の意義の1つとして、脳損傷を与えることによる上衣細胞の運命転換の促進についても考えられる。近年の研究で、脳組織に障害が起こると細胞増殖を伴わずに、上衣細胞とアストログリア細胞の間で細胞運命の転換が行われることが報告された。急性期では側脳室の上衣細胞層で上衣細胞がアストロサイトに分化し、慢性期にはアストロサイトが上衣細胞に分化する。これは急性期にアストロサイトによる瘢痕形成や、細胞保護を促進するためと考えられる。したがって、TAp73 の発現上昇には、上衣細胞の細胞増殖を制御することで、アストロサイトへの直接的な分化転換を補助する役割を持つ可能性が推察できる。しかし、こちらに関しても上衣細胞の分化に関する検討が必要である。これらの TAp73 による分化の影響は上衣細胞を遺伝子導入により蛍光標識したレポーターマウス及び、本研究で用いた p73 ノックインマウスを組み合わせたマウスにより検証できると考える。

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2件)

①Gallagher D, Norman AA, Woodard CL, Yang G, Gauthier- Fisher A, Fujitani M, Vessey JP, Cancino GI, Sachewski N, Woltjen K, Fatt MP, Morshead CM, Kaplan DR, Miller FD
Transient maternal IL- 6 mediates long-lasting changes in neural stem cell pools by deregulating an endogenous self-renewal pathway. Cell stem cell 2013 13(5) 564-576 (査読有)

②Fujiki, R., Sato, A., Fujitani, M. and Yamashita, T
A proapoptotic effect of valproic acid on progenitors of embryonic stem cell derived glutamatergic neurons. Cell death dis 2013 20(4) e677 (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 平成26年1月9日 International Symposium on Glyco- Neuroscience 淡路夢舞台
ポスター: microRNA- 484 located in chromosome 16p13.11 locus, controls cortical development. 発表者: 藤谷 昌司
- ② 平成25年08月03日 第二回大阪大学神経難病フォーラム 大阪大学 16番染色体 16p13に着目した新規脳発生関連分子の発見と小児神経疾患モデル動物作成の試み
発表者: 藤谷 昌司
- ③ 平成26年03月13日 大阪大学 16 番染色体関連 miR484 は PCDH19 を介して神経幹細胞の分化を制御する。第七回神経発生討論会
発表者: 藤谷 昌司
- ④ 平成25年08月31日 microRNA- 484は皮質神経前駆細胞の分化を制御する 第14回 ORIGIN 神経科学研究会 下呂温泉発表者: 藤谷 昌司

6. 研究組織

藤谷 昌司 (MASASHI FUJITANI)
大阪大学・連合小児発達学研究所・助教
研究者番号: 40376372