

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290031

研究課題名(和文) ヒストン修飾を介した脳神経機能制御の解析と精神疾患モデルの開発

研究課題名(英文) Analysis of brain functions regulated by histone modification and development of psychiatric disorder animal models

研究代表者

浅野 雅秀 (Asano, Masahide)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50251450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：HP1 などのヒストン修飾因子の脳神経における機能を明らかにするために、HP1 の脳神経特異的欠損マウスを作製した。このマウスの網羅的行動解析を行ったところ、オープンフィールドや明暗往来テストで顕著な低活動性が観察された。しかし抗うつ薬や抗不安薬の投与では、この低活動性を改善することはできなかった。一方、HP1 欠損神経幹細胞はシャーレに接着しやすいことがわかった。神経幹細胞での遺伝子発現を比較したところ、幾つかの遺伝子の発現がHP1 欠損において有意に亢進しており、ヒストン修飾の抑制性マークの集積が低下していた。以上からHP1 はヒストン修飾を介して遺伝子発現を制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the function of histone modification factors including HP1 in the brain, we generated nervous system-specific HP1 -deficient mice. When the mice were applied to test-battery behavioral analysis, they showed marked low activity in the open-field and light-dark transition test. However, antidepressant and anti-anxiety drugs could not recover their low activity. HP1 -deficient neural stem cells (NSCs) isolated from the mice were tended to differentiate and adhere culture dishes after several passages. When gene expression levels were compared between HP1 -deficient and wild-type NSCs, expression levels of several genes related to nervous system were significantly enhanced in HP1 -deficient NSCs and the accumulation of repressive histone marks was reduced in these genes. These results suggest that HP1 regulates gene expression through histone modifications.

研究分野：実験動物学

キーワード：エピジェネティクス 脳神経疾患 行動学 遺伝子改変マウス

## 1. 研究開始当初の背景

近年、精神疾患や生活習慣病、がんなどにおいてエピジェネティクス制御の異常がそれらの発症に深く関係することがわかってきた。特に精神疾患は遺伝的影響が強く示唆されるものの、環境要因の影響も受けて、単一の遺伝子異常では説明がつかず、エピゲノム異常が原因と思われる疾患を多く含んでいる。

ヒストン H3 のメチル化した9番目のリジン (H3K9me) に結合して、その領域の染色体をヘテロクロマチン構造に誘導することで、転写を負に制御すると言われているヘテロクロマチン・プロテイン 1 (HP1) ファミリーに属する HP1 の欠損マウスを作製したところ、多くが出生直後に致死となり、生き延びた個体は雌雄ともに不妊であった。一方、ヒストン H3 の 27 番目のリジン (H3K27) の脱メチル化酵素である Jmjd3 の欠損マウスを作製したところ、これも出生直後に致死となった。このように HP1 と Jmjd3 は発生過程で重要な役割を果たしていることを明らかにしたが、成体まで成長する個体がほとんどいなかったので、胎生期以外の脳神経系機能の解析はできなかった。そこで本研究では、Cre-loxP システムを用いて、脳神経系特異的に HP1 や Jmjd3 を欠損したマウスを作製して解析を進めることにした。

## 2. 研究の目的

精神疾患は遺伝的要因以外に環境要因の影響も強く受け、エピゲノムの異常が疾患に大きく関わるとされている。ヒストン修飾はエピジェネティクス制御の重要な機構であるが、我々が発生過程での役割を明らかにした HP1 $\gamma$  と Jmjd3、及び Utx の脳神経系での機能を解析して、精神疾患につながるヒストン修飾異常の一端を明らかにする。HP1 $\gamma$  と Jmjd3 の欠損マウスは出生直後に致死となったので、Cre-loxP を用いて脳神経系特異的欠

損マウスを作製して、行動解析や組織学的解析、マイクロアレイ、ChIP 解析、神経幹細胞培養など多方面からの解析を実施する。HP1 $\gamma$  と Jmjd3/Utx が関与するメチル化 H3K9 と H3K27 はどちらも転写の抑制性マークといわれており、神経細胞分化の制御に関わることが予想され、精神疾患の原因解明や治療法開発に貢献する精神疾患モデルマウスが開発できることが期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 脳神経系特異的 HP1 欠損マウスの作製

理化学研究所の古関先生から入手した HP1-flox マウスと神経幹細胞で発現する Nestin-Cre マウスを交配することにより、脳神経系特異的 HP1 欠損マウスを作製した。HP1 欠損マウスは多くが出生直後に死亡したが、このマウスは特に問題なく成長した。

### (2) 脳神経系特異的 Jmjd3 欠損マウスの作製

我々が作製した Jmjd3-flox マウスと Nestin-Cre マウスを交配したところ、Jmjd3 欠損マウスに見られた骨格形成異常はレスキューされたが、同様に出生直後致死となった。そこで Nestin-CreERT2 マウスと交配して、タモキシフェン投与により脳神経系特異的な Jmjd3 欠損マウスの作製を試みた。

### (3) テストバッテリー方式の行動実験と行動薬理実験

脳神経系特異的 HP1 欠損マウスと野生型マウスを用いて、以下のテストバッテリー方式の行動実験を行った。オープン・フィールドテスト、明暗往来テスト、Y 字迷路、ホームケージ活動量、ロータ・ロッドテスト、バランスビームテスト、モリス型水迷路、音による驚愕反応テスト、プレパルス抑制テストなどである。

また低活動性が検出されたオープン・フィールドテストと明暗往来テストについては

フルオキセチン（抗うつ薬）の慢性投与あるいはジアゼパム（抗不安薬）の単回投与後に行動実験を行った。

#### (4) 神経幹細胞（NSC）のマイクロアレイや定量 RT-PCR による遺伝子発現解析

HP1 欠損胎仔（E14.5）脳の大脳基底核原基から NSC を調製して培養した（Neurosphere 法）。数回継代を行うと野生型はまだ球状の形態（Neurosphere）を維持していたが、HP1 欠損 NSC はシャーレに接着するようになる。この時、球状の野生型、球状の HP1 欠損、接着した HP1 欠損の 3 つから RNA を調製してマイクロアレイによる網羅的発現解析を行った。さらに HP1 欠損 NSC で有意に発現が亢進していた遺伝子群のうち神経系で機能していると考えられる遺伝子について、定量 RT-PCR による発現解析と ChIP-qPCR によるヒストン修飾の解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 脳神経系特異的 HP1 欠損と Jmjd3 欠損マウスの作製

HP1<sup>-flox</sup> マウスと Nestin-Cre マウスを交配して B6 背景の脳神経系特異的 HP1 欠損マウスを作製した。HP1 欠損マウスは出生後致死であったが、このマウスは正常に出生して成長した。一方、Jmjd3<sup>-flox</sup> マウスと Nestin-CreERT2 マウスを交配して B6 背景のタモキシフェン誘導型の脳神経系特異的な Jmjd3 欠損マウスを作製した。妊娠 18 日目の母親にタモキシフェンを腹腔内投与したが、出生仔の脳での Jmjd3 遺伝子の発現はあまり抑制することができず、こちらのマウスは解析保留とした。

#### (2) 脳神経系特異的 HP1 欠損マウスの行動解析

テストバッテリー方式により上述の 9 種

類の行動解析を行ったところ、オープン・フィールドテストと明暗往来テストにおいて顕著な低活動性が観察された。特にオープン・フィールドテストにおける立ち上がり回数が顕著に低下していた。また、モリス型水迷路ではほとんど泳がず、不動時間が顕著に長く、強制水泳のような状態になった。さらに音に対する驚愕反応も低下していた。この結果は不安の亢進やうつ状態が疑われたので、まず抗うつ薬のフルオキセチンの慢性投与を行った後に、オープン・フィールドテストと明暗往来テストを行った。しかし、両テストとも脳神経系特異的 HP1 欠損マウスの低活動性を改善することはできなかった。次に抗不安薬のジアゼパムの単回投与による効果も測定したが、低活動性は改善されなかった。また、このマウスの大脳皮質におけるモノアミンの濃度を測定したが、セロトニン系やドーパミン系に野生型マウスとの有意な差は認められなかった。今後は別の観点からの行動薬理学実験を行う必要がある。なお、本研究の途中（平成 26 年度後半）に研究代表者と研究分担者の研究室を金沢大学から京都大学に引っ越したので、特にマウスを用いた実験が予定通りには進めることができなかった。

#### (3) 神経幹細胞（NSC）における遺伝子発現解析とヒストン修飾解析

HP1 欠損 NSC は数回継代を行うとシャーレに接着する性質を示すようになる。その時の HP1 欠損と野生型 NSC の遺伝子発現をマイクロアレイにより網羅的に解析した。発現に違いが認められた遺伝子の中から神経系で機能していると考えられる遺伝子に絞って定量 RT-PCR 解析を行ったところ、5 つの遺伝子の発現が HP1 欠損 NSC で有意に亢進していた。そこでそれらの遺伝子のヒストン修飾の状態を ChIP-qPCR で解析したところ、H3K27me3 と H3K9me3 の集積が有

意に低下していた。両者は抑制性マークなので、これらが低下したために、遺伝子発現が亢進した可能性が示唆される。すなわち HP1 は H3K27 や H3K9 のヒストン修飾を制御して、ターゲット遺伝子の発現をコントロールしている可能性が示唆された。今後はこの結果と行動実験の結果を結びつけることができれば、脳神経系における HP1 の機能を分子レベルで解明できると考えられる。

## 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 4 件)

Ohno, R., Nakayama, M., Naruse, C., Okashita, N., Takano, O., Tachibana, M., Asano, M., Saitou, M., and Seki, Y. A replication-dependent passive mechanism modulates DNA demethylation in mouse primordial germ cells. *Development* 140: 2892-2903, 2013. 査読有 DOI: 10.1242/dev.093229.

Lopatina, O., Yoshihara, T., Nishimura, T., Zhong, J., Akther, S., Fakhrol, A.A., Liang, M., Higashida, C., Sumi, K., Furuhashi, K., Inahata, Y., Huang, J., Koizumi, K., Yokoyama, S., Tsuji, T., Petugina, Y., Sumarukov, A., Salmina, A.B., Hashida, K., Kitao, Y., Hori, O., Asano, M., Kitamura, Y., Kozaka, T., Shiba, K., Zhong, F., Xie, M-J., Sato, M., Ishihara, K., and Higashida, H. Anxiety- and depression-like behavior in mice lacking the CD157/BST1 gene, a risk factor for Parkinson's disease. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8: 133, 2014. 査読有 DOI: 10.3389/fnbeh.2014.00133

Ha, N., Pham, D-H., Naruse, C., Asano, M., and Thai, T-H. HP-1 $\gamma$  controls high-affinity antibody response to T-dependent antigens. *Frontiers in Immunology* 5: 271, 2014. 査読

有 DOI: 10.3389/fimmu.2014.00271.

Wu, W., Nishikawa, H., Fukuda, T., Vittal, V., Asano, M., Miyoshi, Y., Klevit, R.E. and Ohta, T. Interaction of BARD1 and HP1 is required for BRCA1 retention at sites of DNA damage. *Cancer Research* 75: 1311-1321, 2015. 査読有

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2729.

[学会発表](計 5 件)

川口隆之, 成瀬智恵, 柴田進和, 浅野雅秀「胎盤特異的インプリンティング遺伝子における Jmjd3 の機能解析」第 60 回日本実験動物学会, つくば国際会議場(茨城県), 2013 年 5 月 15 日

Sakanishi, K., Abe, K., Yoshihara, T., Naruse, C., Asano, M. "Loss of HP1 $\gamma$  affected the character of neural stem cells in culture." 第 37 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(神奈川県), 2014 年 11 月 25 日

成瀬智恵, 柴田進和, 阿部可奈恵, 川口隆之, 杉原一司, 伊川正人, 浅野雅秀「マウス体軸形成に対する Kdm6 ファミリーの関与」第 62 回日本実験動物学会, 京都テルサ(京都), 2015 年 5 月 30 日

成瀬智恵, 柴田進和, 阿部可奈恵, 川口隆之, 杉原一司, 伊川正人, 浅野雅秀「マウス体軸形成に対する Kdm6 ファミリーの機能」第 38 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド(兵庫), 2015 年 12 月 3-4 日

成瀬智恵, 田村勝, 伊川正人, 若菜茂晴, 浅野雅秀「マイクロ CT を用いた Jmjd3 変異マウスの骨格形成の解析」第 63 回日本実験動物学会, ミューザ川崎シンフォニーホール(神奈川), 2016 年 5 月

[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〕

ホームページ等

<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/research.htm>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

浅野 雅秀 (ASANO, Masahide)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：50251450

### (2)研究分担者

成瀬 智恵 (NARUSE, Chie)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30372486

吉原 亨 (YOSHIHARA, Toru)

京都大学・大学院医学研究科・特定助教

研究者番号：00401935

### (3)連携研究者

杉原 一司 (SUGIHARA, Kazushi)

京都大学・大学院医学研究科・技術職員

研究者番号：10377418