

平成 31 年 2 月 22 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430039

研究課題名(和文) シグナル伝達分子HMGBを用いた成体神経新生の制御と活性評価法の確立

研究課題名(英文) Expression and functional roles of HMGB family in adult neurogenesis

研究代表者

井村 徹也 (Imura, Tetsuya)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00405276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：成体神経新生領域に選択的に発現する分子としてHMGBファミリーのひとつであるHMGB2を同定し、その機能解析を行った。HMGB2は神経幹細胞から神経前駆細胞に発現しており、ニューロンへ成熟すると消失した。発現抑制・強制発現実験の解析により、HMGB2はアポトーシスの制御を介して新生細胞の生存・成熟を調節していることが示唆された。また、海馬歯状回では新生ニューロンと胎生期生成ニューロンで核内受容体Nr4a2の発現が異なることを見出した。Nr4a2の発現は環境ストレスに応答しており、ストレス関連記憶における神経新生の役割に関わる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：HMGB2, a member of high-mobility group box protein (HMGB) family, is selectively expressed in adult neurogenic regions. Neural stem cells and neural progenitors highly express HMGB2, but its expression disappears after neuronal maturation. Knockdown and forced expression of HMGB2 indicate that it regulates survival and maturation of newborn cells.

We also identify that nuclear orphan receptor Nr4a2 is highly expressed in embryonically-generated, but not in adult-generated granule cells, in hippocampal dentate gyrus. Nr4a2 expression in granule cells is linked to environmental stress exposure, suggesting its role in neurogenesis-related stress response and memory formation.

研究分野：神経科学

キーワード：神経幹細胞 神経新生

1. 研究開始当初の背景

成体脳内における神経幹細胞は近年精力的に研究されている領域であり、特に海馬歯状回顆粒細胞層における神経幹細胞よりの神経新生は、記憶・学習等の高次機能との関連で注目されている。成体脳内における神経新生には幹細胞ニッチとよばれる微小環境が必須の役割を果たしているが、こうした多細胞間のコミュニケーションの制御機構の解明は iPS 細胞等を利用した移植治療の成否にもつながる重要な課題である。成体神経新生は既存のニューロンへの付加というよりは置換として働いていることが示唆されており、細胞死と細胞新生はバランスを保っていわば補填されるように調節されている。ニッチを構成する幹細胞・ニューロンや血管・グリア細胞等の複雑な相互作用がこの調節を司っており、老化や様々なストレス侵襲において観察される神経新生の異常はこうした多細胞間コミュニケーションの障害によるバランス調整機構の破綻に起因する可能性が想定される。

研究代表者らはこれまでに海馬歯状回において high mobility group box B (HMGB) family が神経新生領域において発現していることを見出した。HMGB は細胞内においては非特異的なクロマチン結合蛋白として様々な遺伝子の発現や autophagy の調節に与るが、能動的あるいは細胞死により受動的に細胞外に放出され周囲細胞へのサイトカイン様シグナル伝達分子としても働くことが明らかとなっている。細胞外 HMGB は自然免疫反応調節分子として近年その重要性が注目されているが、虚血・てんかん等の脳疾患においても細胞外に放出される HMGB が血液脳関門の破綻や炎症細胞の活性化等を惹起することで傷害を増悪させることが報告され、この作用のブロックが新たな治療標的として期待されている (Fan P et al., Mol Neurobiol 2012)。しかし、一方で細胞外 HMGB は血管新生や神経突起伸長の促進といった positive な働きを有することも知られている。幹細胞ニッチにおける HMGB の役割はわかっていないが、成体神経新生の過程では多くの新生ニューロンは細胞死に陥ることから、こうした細胞から HMGB が放出される可能性が想定される。幹細胞ニッチにおける細胞間コミュニケーションに関わる因子として多くのものが報告されているが、細胞死・細胞新生のバランスの調整メカニズムについては不明である。また細胞外 HMGB

のレセプターである TLR2/4 や RAGE が神経新生や学習に関与することは報告されているが、その内在性リガンドとして何が重要かはわかっていない。

2. 研究の目的

本研究は、神経幹細胞及びその系譜細胞の増殖・分化・生存における HMGB の役割を明らかとし、神経新生の activity 及びその異常を反映するマーカー分子としての HMGB の可能性、ならびに HMGB の機能制御による神経新生のコントロールの可能性、について探索することを目的とした。

3. 研究の方法

a) 動物モデル

mGFAP-Cre トランスジェニックマウス (Garcia AD et al., Nat Neurosci, 2004), Nestin-CreERT2 トランスジェニックマウス (Imayoshi I et al., Nat Neurosci, 2008), mT/mG トランスジェニックマウス (Muzmudar MD et al., Genesis 2007)、HMGB2 ノックアウトマウス (Ronfani L et al., Development 2001)。動物モデルの作製・繁殖維持は、福島県立医科大学・実験動物センターの SPF 室にて施行し、以下のすべての実験は福島県立医科大学動物実験委員会・遺伝子組み換え実験委員会の審査・承認を得た上で、米国国立衛生研究所「実験動物の管理と使用に関する指針」に準拠して行なった。

b) 遺伝子ベクター

HMGB 過剰発現ならびにノックダウンを目的に、マウス HMGBs をターゲットとした shRNA 及び cDNA をクローニングしたレンチウイルスベクター (理化学研究所・Addgene・Santa Cruz Technologies 社) を構築し、培養細胞への導入及びマウス脳への直接投与を行い、以下の解析を行った。

c) 組織学的解析

深麻酔下に灌流固定を行った脳組織を用いて、各種抗体による免疫染色を行い、レーザー顕微鏡 (FV1000, Olympus 社) にて撮影・解析を行った。

d) 細胞培養

成体及び新生児マウスの側脳室周囲・海馬歯状回から neurosphere 法にて分離・培養した神経幹細胞を用いて、増殖・分化能の評価を行った (Imura et al., J Neurosci 2003; Stem Cells 2011)。

e) リアルタイム RT-PCR

培養細胞・マウス脳組織から抽出した RNA を鋳型に逆転写にて cDNA 合成を行い、Sybr green 法にてリアルタイム PCR を行なった

(SteoOnePlus, Life Technologies 社)

4. 研究成果

(1) HMGB2 の脳内発現パターン

HMGB familyのうち、HMGB1は成体マウス脳内にユビキタスに広く発現する一方で、HMGB2は側脳室周囲と海馬歯状回subgranular zoneの神経新生領域に局在して発現がみられた。発現はいずれも核局在を示し、細胞質での発現は明らかでなかった。

各分化段階のマーカーとの共染色での検討では、HMGB2の発現はNestin陽性神経幹細胞～Dcx陽性神経前駆細胞までみられるが、NeuN陽性成熟ニューロンに至ると消失していた。BrdU標識実験では、標識後4-8週でHMGB2の発現は消失した。

各種年齢のマウスでの検討では、HMGB2の神経新生領域における発現は年齢依存的で、老齢になるにつれて減少していた。

(2) HMGB2 の発現抑制により培養神経幹細胞数は減少する

培養神経幹細胞でもHMGB2は高発現していることが示されたため、shRNAによるHMGB2の発現抑制の影響を、ニューロスフェア法による解析を用いて行った。結果、HMGB2の発現抑制(KD)によりMTTアッセイによる総細胞数($72\% \pm 6\text{SEM}$ vs 対照群、 $p < 0.01$)・ニューロスフェアの平均長径(KD群 $141 \mu\text{m} \pm 8\text{SEM}$ vs 対照群 $218 \mu\text{m} \pm 22\text{SEM}$ 、 $p < 0.001$)いずれも有意に減少がみられた。

HMGB2の発現抑制によりニューロン・グリア分化の比率には有意の変化はみられなかった。

一方、リコンビナントHMGB2を培養液中に負荷した検討では増殖・分化いずれにも有意の変化はみられなかった。

(3) HMGB2 の発現抑制により培養神経幹細胞数はアポトーシスが增加する

HMGB2の発現抑制による培養神経幹細胞数減少の機序を明らかとするため、BrdU標識による増殖能およびTUNEL法によるアポトーシスの評価を行った。結果、BrdU標識率に有意の変化はみられなかったが、TUNEL陽性細胞は有意に増加した(KD群 $2.8\% \pm 0.4\text{SEM}$ vs 対照群 $1.2\% \pm 0.2\text{SEM}$ 、 $p < 0.05$)。

以上から、HMGB2の発現抑制はアポトーシスを増加させることで、神経幹細胞数を減少させることが示唆された。分子発現のレベルではHMGB2 KD群ではp53の発現増加がみられる一方で、c-Fosの発現は低下していた。

(4) HMGB2-KO マウスの解析

これまでの結果から、HMGB2は神経新生

の活性に相関して、神経幹細胞～前駆細胞の段階でのアポトーシス抑制に関わっていることが示唆される。そこで次にHMGB2 KOマウスを用いて *in vivo* での解析を行った。

HMGB2 KOマウスの神経新生領域は、形態学的にも神経新生マーカー発現解析でも、対照群に比して明らかな差異はみられなかった。神経新生ならびに分離神経幹細胞数の加齢による減少はHMGB2 KOマウスでより高度の傾向がみられたが、統計学的有意差は得られなかった。培養系でのshRNAを用いた急性抑制実験の結果との乖離の原因としては、胎生期からのHMGB2欠失により何らかの補償が働いている可能性が考えられる。実際、HMGB2 KOマウス神経新生領域ではHMGB1の発現が高い傾向が観察された。

(5) HMGB2 の過剰発現は未熟な形質のニューロンを増加させる

成果(1)で示したように、HMGB2の神経新生領域における発現は分化・成熟に伴い消失する。この機能的意義を検討するため側脳室周囲へのレンチウイルス注入によりHMGB2持続強制発現を行った。結果、注入後4週で、HMGB2+/GFP+新生細胞は対照群細胞(HMGB2-/GFP+)と同様に側脳室からRMSを経て嗅球顆粒細胞層に分布しており、HMGB2の強制発現は細胞移動に明らかな影響を与えなかった。一方、嗅球に存在するHMGB2強制発現細胞での神経前駆細胞マーカーDcxの陽性比率は対照群に対し有意に高かった(HMGB2/GFP群 $15\% \pm 3\text{SEM}$ vs 対照GFP群 $4\% \pm 2\text{SEM}$ 、 $p < 0.05$)。以上から、HMGB2の持続的発現はニューロンの成熟を遅延させる、あるいは未熟なニューロンの生存を促進させる、のいずれかの可能性が示唆された。

(6) Nr4a2 は海馬歯状回のストレス関連遺伝子であり、胎生期生成顆粒細胞に高発現を示す

HMGB2の解析の過程で、HMGB2とは対照的な挙動を示す分子として核内受容体Nr4aファミリー分子の一つであるNr4a2を同定し、この発現制御についても検討を加えた。

Nr4a2陽性細胞は海馬歯状回顆粒細胞層に散在性に分布していたが、GFAP-Creマウス及びNestin-Creマウスを用いた検討で、Nr4a2は胎生期に生成される“古い”顆粒細胞で高発現を示すことが明らかとなった。Nr4a2の顆粒細胞層での発現は老齢マウスでは増加がみられたが、この発現の差異は維持されていた。一方、体動抑制による急性ストレス負荷でNr4a2の発現は抑制されるが、慢性的なストレス負荷では逆にNr4a2の発現は増加を示した。デキサメサゾン負荷試験の結果から、海馬顆粒細胞でのNr4a2の発現は脳内コルチゾールに逆

相関することが示された。

以上の本研究の結果から、HMGB2 は成体神経新生領域に選択的に発現しその活性に相関する分子であることが示された。その機能的意義については、神経幹細胞及び未熟前駆細胞のアポトーシスの抑制と分化の調節が示唆され、その制御は神経新生の機構解明につながることを期待されるものである。しかし、特に生体内でのその詳細な役割については、今後さらなる検討が必要である。

一方、付加的な発見として見いだされた Nr4a2 は、海馬歯状回の“古い”顆粒細胞に高発現するユニークなストレス関連分子であることを明らかとした。近年、海馬歯状回の神経新生は恐怖・ストレス記憶の形成において重要な役割を果たしている可能性が想定されており、顆粒細胞の形成時期によってストレス応答分子が異なるという今回の成果は、外傷後ストレス障害の病態解明や治療を考えるうえで意義の高いものである。

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 1件)

Imura T, Kobayashi Y, Suzutani K, Ichikawa-Tomikawa N, Chiba H.
Differential expression of a stress-regulated gene Nr4a2 characterizes early- and late-born hippocampal granule cells. Hippocampus.2018
doi:10.1002/hipo.23045.[Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計 2件)

1. 小林 靖幸、井村 徹也他。成体神経幹細胞における HMGB ファミリーの発現と機能解析、日本病理学会 2014
2. 錫谷 研、井村 徹也他。海馬神経新生のダイナミクスと“老若”ニューロンの分子特性、日本病理学会 2016

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
井村 徹也 (Imura, Tetsuya)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号：00405276

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()