

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：34310

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840090

研究課題名(和文) 神経上皮組織特異的な活性酸素シグナル伝達の分子機構の解明

研究課題名(英文) The analysis of the molecular function of ROS signaling in neuroepithelium development

研究代表者

酒井 大輔 (Sakai, Daisuke)

同志社大学・研究開発推進機構・助教

研究者番号：90632646

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)：本研究では、マウス胚の脳原基において内在的に存在する活性酸素種(ROS)がシグナル分子として機能し、脳発生を制御している可能性について検討した。その結果、ROSが神経前駆細胞の増殖とそれに伴う神経細胞の産生に必須であることがわかった。また、神経堤細胞の発生にも関与することが明らかとなった。組織特異的なROSの産生機構に関しては、ROS合成酵素によるものではなく、細胞呼吸代謝である解糖系の活性に依存する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I investigated whether reactive oxygen species (ROS) function as signaling molecule on embryonic brain development. Consequently, I revealed that ROS were required for proliferation of neural progenitor cells and consequent neurogenesis. Furthermore, ROS were involved in cranial neural crest development. Tissue specific ROS generation appeared to be dependent on the activity of cellular metabolism, glycolysis, but independent on ROS-generating NADPH oxidases.

研究分野：発生生物学

キーワード：活性酸素種 脳発生

1. 研究開始当初の背景

活性酸素種 (ROS) は細胞呼吸の副産物のみならず、シグナル分子として機能することが明らかとなっている。ROS シグナリングの基本メカニズムは、まず細胞内 ROS がセンサータンパクを酸化して、その活性を変化させる。そして、センサータンパクがエフェクタータンパクを活性化することで標的遺伝子の発現が亢進する。この ROS シグナリングが様々な細胞機能を制御していることが報告されている。例えば、神経幹細胞の初代培養細胞は、ROS 合成酵素 Nox2 を介して ROS を産生し、PTEN を酸化する。そして、エフェクターの Akt が活性化されることで細胞増殖が促進される。しかし、ROS シグナリングによる胚発生制御機構、特に哺乳類胚に関する報告は少ない。その理由として、(1) 胚体内の ROS の検出が困難であること、(2) 内在性 ROS の量を人為的に操作する方法が確立されていないことが挙げられる。

2. 研究の目的

申請者は、マウス胚体内の ROS を検出する方法を独自に開発することに成功した。そして、マウス胚の将来脳となる神経上皮組織において ROS が高レベルで産生されていることを発見した。このことから、神経上皮組織特異的に ROS を産生し、脳発生を制御する機構の存在が強く示唆される。そこで、内在性 ROS がマウスの脳発生にとって必要であるか調べる。さらに、ROS シグナリングの構成因子とその標的遺伝子を同定し、神経上皮組織特異的な ROS シグナリングの全容解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 胚の内在性 ROS 量を人為的に操作する手法を確立する。神経板期のマウス胚を抗酸化剤の NAC 存在下で培養することで、内在性 ROS を減少させ、脳発生異常の誘発条件を検討する。そして、脳発生異常の原因に関して、神経上皮細胞の分化や増殖、細胞死などに着目し、*in situ* ハイブリダイゼーション法や免疫染色法などにより解析する。

(2) 神経上皮組織特異的に ROS を産生する機構について、まず、神経上皮組織特異的に発現する ROS 合成酵素の同定を PCR や *in situ* ハイブリダイゼーション法により試みる。さらに、その下流で活性化しているシグナル伝達経路の同定を試みる。

4. 研究成果

(1) マウス全胚培養に終濃度 1mM から 100mM の範囲で NAC を添加し、36 時間培養を行った。そして胚発生、特に脳発生への影響を形態観察により調べた。その結果、1mM から 5mM NAC 存在下で培養した胚は正常に発生

したが、10mM NAC 存在下ではコントロールに比べて頭部が縮小した。20mM 以上の NAC を添加した場合は、濃度依存的に発生停止胚の出現率が上昇した。これらの結果から、10mM NAC を用いることで頭部特異的な発生異常を誘導できることがわかった。次に培養 12 時間、24 時間、36 時間後に胚を回収し、頭部発生異常の程度を調べた。培養 12 時間後ではコントロールと比べて顕著な差は認められなかったが、24 時間後で頭部の大きさに差が認められた。36 時間後には頭部の縮小がさらに顕著となった (図 1)。ROS が血管形成に関与することが報告されている。頭部の発生異常が、血管形成異常に起因する可能性が考えられたので、この時期の主要な血管である卵黄嚢血管の形成を調べた。卵黄嚢血管の形成は 10mM NAC 存在下での 36 時間培養では影響が

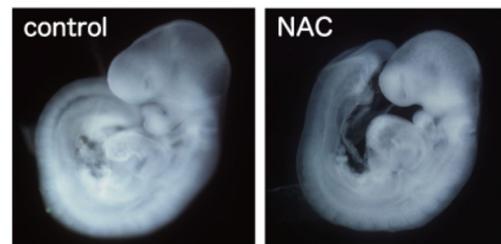


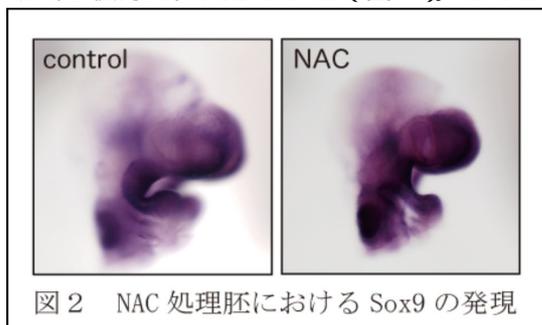
図 1 NAC 処理による形態形成異常

見られなかった。以上の結果より、10mM NAC 存在下での 36 時間培養を ROS シグナル阻害実験の基本とし、以降、この胚を「NAC 処理胚」と表記する (図 1)。

次に、NAC 処理胚の頭部形成異常の原因を組織学的手法により解析した。まず、BrdU を含む培地で全胚培養を 30 分間行うことにより増殖期の細胞を標識した。培養した胚を 4%PFA により固定し、包埋後に頭部の横断凍結切片を作成した。細胞増殖を抗 BrdU 抗体と抗リン酸化ヒストン 3 抗体、細胞死を抗活性型カスパー 3 抗体を用いた免疫染色により調べた。脳全体で神経前駆細胞の増殖低下が認められたが、特に前脳において著しい増殖低下が見られた。また、それに伴って神経前駆細胞数が減少していた。細胞死については、野生型と比較して顕著な差は認められなかった。次に、神経分化への影響について抗 β III チューブリン抗体を用いた免疫染色により調べたところ、NAC 処理胚で神経細胞の数が減少していた。これらの結果から、内在性 ROS が神経前駆細胞の増殖とそれに続く神経細胞産生に必須であることが明らかとなった。

NAC 処理胚は脳の他に、前頭鼻隆起の大きさも野生型に比べて減少していた。頭部横断切片像の解析から、前頭鼻隆起内の神経堤由来間充細胞が NAC 処理胚で減少していることがわかった。そこで、頭部神経堤マーカーである Sox9 の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により調べた。野生型においては、Sox9 の発現が前頭鼻隆起の先端と上顎および下顎隆起に認められたが、NAC 処理胚ではその発現

領域が後方に拡大していた(図2)。このこ



とから、NAC 処理により神経堤細胞の移動もしくは分化のタイミングの異常が引き起こされたと考えられた。

(2) 神経上皮に特異的に発現する ROS 合成酵素の同定を試みた。まず、胎生 8.5 日目胚から RNA を調整し、cDNA を逆転写により合成した。この cDNA を鋳型として PCR を行い、ROS 合成酵素である *Nox1-5* と *Duox1-2* の発現を調べた。その結果、*Nox2*、*Nox4*、*Duox2* が胎生 8.5 日目胚で発現していることがわかった。次に、胎生 9.0 から 10.0 日目胚における各遺伝子の発現パターンを whole-mount *in situ* ハイブリダイゼーション法により調べた。*Nox4* と *Duox2* は発現が検出されず、発現量が低いことが推察された。*Nox2* は顔面部(前頭鼻隆起、上顎および下顎突起)と頸部の腹側で発現が認められたが、表皮外胚葉に発現していたことから神経上皮の内因性 ROS の産生に関与している可能性は低いと考えられた。現在までのところ、神経上皮における内在性 ROS の産生に関与する遺伝子の同定には至っていない。内在性 ROS 産生機構の他の可能性として、細胞呼吸代謝の副産物としての ROS が神経上皮で増加していることが考えられる。そこで、解糖系および酸化リン酸化の阻害剤存在下でマウス全胚培養を行った。その結果、解糖系阻害剤存在下で脳発生に異常が認められた。この結果は、解糖系が神経上皮における内在性 ROS の発生源である可能性を強く示唆している。現在、解糖系遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスを用いた実験の準備を進めている。最終年度に予定していた研究実施計画の内容から若干の変更が生じたが、神経上皮における内在性 ROS 産生機構の解明という目的は変わらず、着実にその解明に近づいていると言える。

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 3 件)

1. Daisuke Sakai, Jill Dixon, Annita Achilleos, Michael Dixon, and Paul A Trainor. Prevention of Treacher Collins syndrome craniofacial anomalies in mouse models via maternal antioxidant

supplementation. *Nature Communications*. 査読有, 7, 10328, 2016. DOI: 10.1038/ncomms10328.

2. Daisuke Sakai, Jun Motoyama and Paul A Trainor. Prevention of the craniofacial abnormalities based on the pathogenesis of Treacher Collins syndrome. *Congenital Anomalies*. 査読無, 55(4). 2015. DOI: 10.1111/cga.12085.

3. Daisuke Sakai, and Paul A Trainor. Gene transfer techniques in whole embryo cultured post-implantation mouse embryos. 査読有, *Methods in Molecular Biology*. 1092, 227-234. 2014. DOI: 10.1007/978-160327-292-6_15.

[学会発表](計 5 件)

1. 酒井大輔、トリーチャーコリンズ症候群モデルマウスによる顎顔面奇形発症メカニズムの解明、第 55 回 日本先天異常学会学術集会、2015 年 7 月、神奈川県横浜市、パシフィコ横浜

2. 酒井大輔、トリーチャーコリンズ症候群モデルマウスを用いた小脳症発症機序の解析、第 3 回高次神経機能障害の発症メカニズム解明と新規治療法の開発シンポジウム、2015 年 3 月、京都府京田辺市、同志社大学医心館

3. 酒井大輔、発生生物学的アプローチによる先天性頭部奇形の発症機序の解明、第 29 回脳神経科学コアセンターセミナー、2014、宮城県仙台市、東北大学医学部講堂

4. Daisuke Sakai and Jun Motoyama, Anaerobic glucose metabolism regulates neural tube formation. 第 47 回日本発生生物学会、2014 年 5 月、愛知県名古屋市、ウインクあいち

5. 酒井大輔, Jill Dixon, Michael J Dixon and Paul A Trainor, トリーチャーコリンズ症候群モデルマウスを用いた顎顔面奇形発症機序の解明と抗酸化剤による出生前治療、第 53 回日本先天異常学会学術集会、2013 年 7 月、大阪府豊中市、千里ライフサイエンスセンター

[図書](計 1 件)

1. Dennis, R. Warner, Daisuke Sakai, and Lisa, L. Sandell. John Wiley & Sons, Mammalian Cell Culture. Current Protocols in Essential Laboratory Technique. 2015 年 7 月、総ページ数 70.

[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

酒井大輔 (SAKAI, Daisuke)

同志社大学 研究開発推進機構 助教

研究者番号：90632646