

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460096

研究課題名(和文)新規分泌性因子Brorinの摂食制御における役割の解明

研究課題名(英文)The roles of Brorin, a novel secreted protein, in the regulation of feeding

研究代表者

三宅 歩 (Miyake, Ayumi)

京都大学・薬学研究科・講師

研究者番号：40346044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Brorin遺伝子欠損マウスとbrorin機能阻害ゼブラフィッシュを用いた解析により、Brorinが神経幹細胞のアストロサイトへの分化抑制と神経細胞とオリゴデンドロサイトの分化促進に関与していること及びbrorinがBmpシグナル伝達の制御に関与していることを明らかにした。さらに、Brorin遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比較して、皮下および内臓白色脂肪組織の重量が増加していることも明らかにした。また、brorin機能阻害ゼブラフィッシュを用いた解析により、brorinが視床下部の特性の維持と軸索投射に関与していることも明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Brorin were predominantly expressed in developing neural tissues. The loss of Brorin resulted in the activation of Bmp signaling in mice and zebrafish. brorin morphants exhibited defective development of the ventral domain in the forebrain. Furthermore, we demonstrated that Brorin inhibited Bmp signaling and played a critical role in the development of the ventral domain and specification of GABAergic interneurons and oligodendrocyte progenitors in the forebrain. It was also implicated in the suppression of astrocyte generation in the forebrain. In addition, brorin is essential for the appropriate expression of axon guidance molecules and has a role in the formation of forebrain commissural axons. The present results suggest that Brorin is a secreted Bmp antagonist predominantly expressed in developing neural tissues and that it plays multiple roles in the development of the forebrain.

研究分野：分子生物学

キーワード：Bmp アンタゴニスト 脳・神経 視床下部 神経分化

1. 研究開始当初の背景

分泌性タンパク質は、増殖・分化因子として様々な組織の形態形成にも重要な役割を担っている。これまでに申請者らは、主に Bioinformatics の手法により、ゲノム・遺伝子データベースから 15 種類以上の新規ヒト分泌性タンパク質を発見しており、その中の 1 つを *Brorin* と命名した。ヒト以外にマウス及びゼブラフィッシュからも *Brorin* を単離・同定しており、*Brorin* が脊椎動物に共通した分泌性タンパク質であることも明らかにしている。

分泌性タンパク質である *Bmp* (bone morphogenetic protein) は、骨・軟骨形成以外に脳形成にも関与しており、細胞表面に存在する受容体を介して細胞内にシグナルを伝達するが、その活性はアンタゴニストの制御を受ける。脳発生過程において *Bmp* シグナルは、神経系前駆細胞のニューロンとオリゴデンドロサイトへの分化を抑制して、アストロサイトへの分化を促進する。*Brorin* は、胎児期及び成体マウスにおいて脳神経系特異的に発現しており、*in vitro* で細胞外に分泌して *Bmp* アンタゴニスト活性を示し、神経系前駆細胞のニューロンへの分化を促進する。

申請者らは、*in vivo* における *Brorin* の生理的役割を解明するために、*Brorin* 遺伝子欠損マウスを作製し、機能解析を行っている。*Brorin* 遺伝子欠損マウスの表現型の特徴としては、通常食飼育時における体重が野生型に比べ有意に増加していた。そこで摂食量を測定したところ、*Brorin* 遺伝子欠損マウスでは、通常食飼育時における摂食量が野生型に比べ有意に増加していた。

Bmp シグナルは、視床下部 (摂食制御の神経回路において中心的役割をもつ神経核が存在) の神経分化および弓状核ニューロンの軸索投射などにも関与していることが報告されている。また申請者らは、*Brorin* が視床下部において胎児期から高発現していることも見出している。これらの結果は、視床下部形成過程において *Brorin* が、摂食行動制御に関与する神経細胞の分化に重要な役割を担っている可能性があることを示唆している。

2. 研究の目的

Brorin は胎児期から脳神経系特異的に発現しており、*in vitro* で細胞外に分泌して *Bmp* アンタゴニスト活性を示し、神経系前駆細胞のニューロンへの分化を促進する。*Bmp* シグナルは、視床下部の神経分化及び弓状核ニューロンの軸索投射に関与していることが報告されており、*Brorin* は胎児期から視床下部において高発現している。*Brorin* 遺伝子欠損マウスの表現型の特徴としては、通常食飼育時で摂食量が野生型に比べ有意に増加

し、体重も野生型に比べ有意に増加していた。これらの結果から、視床下部形成過程において *Brorin* が、摂食行動制御に関与する神経細胞の分化に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

脳発生過程において *Bmp* シグナルは、神経系前駆細胞のニューロンとオリゴデンドロサイトへの分化を抑制して、アストロサイトへの分化を促進する。そこで本研究では、ゼブラフィッシュ *brorin* も前脳の終脳腹側及び間脳腹側領域で高発現していることから、まず胚の発生が早いゼブラフィッシュを用いて、脳発生過程における *Brorin* の役割について明らかにする。*brorin* 機能阻害ゼブラフィッシュ胚を用いた解析により、神経系前駆細胞の分化に対する *Brorin* の機能および *Bmp* シグナル伝達経路と *Brorin* との関係について明らかにする。

さらに、*Brorin* による胎児期の視床下部神経形成が摂食行動制御機構にどのように関わっているのか分子レベルで明らかにするために、*Brorin* 遺伝子欠損マウスについても同様に解析を行い、視床下部の摂食行動制御に関与する神経細胞の分化における *Brorin* の役割を明らかにする。また、*Brorin* 遺伝子欠損マウスの組織重量などを測定することにより、体重増加の原因についても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *Bmp* シグナル伝達経路に対するゼブラフィッシュ *Brorin* の作用の検討

これまでに申請者らは、*Brorin* が *in vitro* で *Bmp* アンタゴニスト活性を示すことを明らかにしている。そこで、*in vivo* においても *brorin* が *Bmp* シグナル伝達経路に関与しているか検討するために、*brorin* 過剰発現ゼブラフィッシュ胚において *Bmp* シグナル伝達経路が抑制されているか否かを検討した。

さらに、*Bmp* シグナル伝達経路が *brorin* 機能阻害ゼブラフィッシュ胚の表現型に関与しているか検討するために、*brorin* 機能阻害ゼブラフィッシュ胚において *Bmp* シグナル伝達経路が活性化されているか否かについても検討した。指標として *Bmp* シグナル伝達経路の下流因子である *Smad* のリン酸化について抗体を用いて検出した。

(2) *brorin* 機能阻害ゼブラフィッシュを用いた神経系前駆細胞の分化における *Brorin* の役割の解明

brorin 機能阻害ゼブラフィッシュ胚を作製し、その表現型について解析を行った。まず前脳領域の特性決定に対する *brorin* の機能を明らかにするために、*brorin* 機能阻害胚における終脳腹側・間脳腹側マーカー (*dlx2*) の発現について検討した。

さらに前脳における神経分化に対する *brorin* の機能を明らかにするために、*brorin* 機能阻害胚における神経分化マーカーの発現を検討した。前脳の腹側領域の神経分化マーカーとしては *ascl1a* を用い、前脳の背側領域の神経分化マーカーとしては *ngn1* を用いた。

終脳腹側領域と腹側視床からは主に GABA 作動性ニューロンとオリゴデンドロサイトが発生することが報告されている。そこで、*brorin* 機能阻害胚における GABA 作動性ニューロンのマーカーである *gad1* とオリゴデンドロサイトのマーカーである *olig2* の発現についても検討した。

Bmp シグナルが弓状核ニューロンの軸索投射に参与していることから、*brorin* の軸索投射における役割についても検討した。*brorin* 機能阻害胚における軸索投射パターンについては、抗 -チューブリン抗体を用いて検出した。さらに、軸索ガイダンス分子の発現パターンを検討するために、*brorin* 機能阻害胚における *netrin1a* と *sema3d* の発現についても検討した。

- (3) *Brorin* 遺伝子欠損マウスを用いた線条体、内包および視床下部の神経細胞の分化における *Brorin* の役割の解明

成体の脳解析には生後 8 週齢の C57BL/6 野生型マウスおよび *Brorin* 遺伝子欠損マウスを使用した。麻酔後に全脳を摘出して、OCT compound に包埋後、ドライアイスを用いて新鮮凍結サンプルを作製した。

新生児期の脳解析には生後 2 日齢の C57BL/6 野生型マウスおよび *Brorin* 遺伝子欠損マウスマウスを使用し、ドライアイスを用いて頭部新鮮凍結サンプルを作製した。

クリオスタットにより新鮮凍結サンプルから厚さ 16 μm の薄切切片を作製した。

脳切片を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、免疫組織化学的染色を行った。一次抗体としては抗 NeuN 抗体、抗 Grial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体、抗 Adenomatous polyposis coli (APC) 抗体および抗 Nestin 抗体を使用し、その後蛍光標識二次抗体により可視化した。核染色には DAPI を用いた。

共焦点顕微鏡した、線条体の側脳室近傍、内包領域および視床下部について単位面積あたりの抗 NeuN 抗体で標識された神経細胞数、抗 GFAP 抗体で標識されたアストロサイト数、抗 APC 抗体で標識されたオリゴデンドロサイト数、抗 Nestin 抗体で標識された神経幹細胞数及び DAPI で標識された総細胞数を計数した。すべてのデータは、独立した最低 3~5 個体の 3 切片以上を測定し、それらの平均値を算出したもので、統計的有意差は Student t-test を用いて算出した。検定の結果、 $p < 0.05$ となったものを有意と判断した。

- (4) *Brorin* 遺伝子欠損マウスの組織重量、血糖値および血中インスリン濃度の検討

Brorin 遺伝子欠損マウスの体重増加の原因について明らかにするために、C57BL/6 野生型マウスと *Brorin* 遺伝子欠損マウスから各組織(心臓、肺、腎臓、皮下白色脂肪組織および内臓白色脂肪組織)を摘出し、その重量を測定した。さらに、C57BL/6 野生型マウスと *Brorin* 遺伝子欠損マウスの血糖値についても測定した。

Brorin 遺伝子欠損マウスのエネルギー代謝状態を検討するために、指標となる血中パラメータの 1 つである血中インスリン濃度についても測定した。

4. 研究成果

- (1) Bmp シグナル伝達経路に対するゼブラフィッシュ *Brorin* の作用の検討

以前の解析より、*Brorin* が *in vitro* で Bmp アンタゴニスト活性を示すことを明らかにしている。そこで、ゼブラフィッシュ胚を用いて *brorin* の Bmp シグナル伝達経路における役割を検討したところ、*brorin* 機能阻害胚では Bmp シグナルが活性化されたが、*brorin* 過剰発現胚では Bmp シグナルの抑制が認められ、*Brorin* が Bmp シグナル伝達の制御に参与していることが明らかとなった。

- (2) *brorin* 機能阻害ゼブラフィッシュを用いた神経系前駆細胞の分化における *Brorin* の役割の解明

brorin の前脳形成における役割を明らかにするために、*brorin* 機能阻害胚を作製したところ、*brorin* 機能阻害胚は前脳の形態異常を示し、さらに終脳腹側・間脳腹側マーカー(*dlx2*)の発現が正常胚と比較して減少していた。従って、zebrafish *brorin* は前脳形成過程において終脳腹側及び間脳腹側領域の特性決定に参与していることが示された。

前脳における神経分化に対する *brorin* の機能を検討したところ、*brorin* 機能阻害胚では腹側領域の神経分化マーカー(*ascl1a*)の発現が正常胚と比較して減少していた。一方、前脳背側領域においては神経分化マーカー(*ngn1*)の発現が正常に検出された。従って、*brorin* は前脳腹側領域の神経分化にのみ関与していることが示された。

brorin 機能阻害胚において発現が減少していた *dlx2* は、主に終脳腹側及び間脳腹側領域から産生される GABA 作動性ニューロン及びオリゴデンドロサイトの発生に参与していることが報告されている。そこで、*brorin* 機能阻害胚においてそれぞれのマーカーである *gad1* 及び *olig2* の発現解析を行

った。*brorin*機能阻害胚ではどちらの発現も正常胚と比較して減少していた。従って、*brorin*はGABA作動性ニューロン及びオリゴデンドロサイトの発生に参与していることが示された。

Bmpシグナルが弓状核ニューロンの軸索投射に参与していることから、*brorin*機能阻害ゼブラフィッシュを用いて*brorin*の軸索投射における役割についても検討した。*brorin*機能阻害胚では、軸索投射に異常が認められ、軸索ガイダンス分子の発現パターンにも異常が認められた。

以上の結果より、ゼブラフィッシュ*brorin*は終脳腹側及び間脳腹側領域の特性決定と軸索投射に参与することを明らかにした。さらに、ゼブラフィッシュ*brorin*は前脳腹側領域において*dlx2*の発現を維持することにより、GABA作動性ニューロン及びオリゴデンドロサイトの分化を促進することも明らかにした。また、これらの作用はゼブラフィッシュ*brorin*が*in vivo*においてBMP antagonist活性をもつことより、Bmpの機能を阻害することで発揮されると考えられる。

(3) *Brorin* 遺伝子欠損マウスを用いた線条体、内包および視床下部の神経細胞の分化における*Brorin*の役割の解明

成体の*Brorin*遺伝子欠損マウスの脳について、神経細胞を標識する抗NeuN抗体、アストロサイトを標識する抗GFAP抗体およびオリゴデンドロサイトを標識する抗APC抗体を用いた免疫組織化学的解析を行い、成体の脳における*Brorin*の機能について検討した。その結果として、*Brorin*遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べて線条体の側脳室近傍において総細胞数に変化はないが、NeuN陽性細胞およびAPC陽性細胞の割合が有意に減少し、GFAP陽性細胞の割合が有意に増加していることが明らかになった。また、内包領域および視床下部においても総細胞数に変化はないが、GFAP陽性細胞の割合が有意に増加し、APC陽性細胞の割合が有意に減少していることが明らかになった。これらの結果は、*Brorin*遺伝子欠損マウスの脳において神経細胞およびアストロサイト、オリゴデンドロサイトの比率が変化していることを示している。従って、*Brorin*が成体の脳において神経系前駆細胞の運命決定に参与している可能性が示唆された。

神経系前駆細胞から神経細胞およびアストロサイトへの分化は胎児期から新生児期にかけて盛んに行われることから、新生児期の*Brorin*遺伝子欠損マウスについても抗NeuN抗体および抗GFAP抗体を用いた免疫組織化学的解析を行った。その結果として、*Brorin*遺伝子欠損マウスの線条体の側脳室近傍において、野生型マウスに比べて総細胞数に変化はないが、NeuN陽性細胞の割合が

有意に減少し、GFAP陽性細胞の割合が有意に増加していることが明らかになった。また、内包領域と視床下部においても総細胞数の変化はないが、NeuN陽性細胞の割合が有意に減少し、GFAP陽性細胞の割合が有意に増加していることが明らかになった。従って、*Brorin*が脳において神経系前駆細胞からアストロサイトへの分化抑制と神経細胞への分化促進に胎児期から関与することが明らかとなった。

さらに、神経細胞やオリゴデンドロサイト、アストロサイトへの分化能を持つ神経幹細胞の増殖への*Brorin*の関与について検討した。新生児期の*Brorin*遺伝子欠損マウスについて抗Nestin抗体を用いた免疫組織化学的解析を行った。その結果として、線条体の側脳室近傍、内包領域および視床下部においてジェノタイプ間で差は認められなかった。従って、*Brorin*が神経幹細胞の増殖には関与していないことが示唆された。

さらに、生体内における*Brorin*のBMPアンタゴニスト活性の有無を検討した。その結果として、生後2日齢の*Brorin*遺伝子欠損マウスの線条体と内包領域において、Smadのリン酸化が亢進していた。従って、マウス*Brorin*も生体内においてもBmpアンタゴニストとして作用することが示された。

以上の結果から、線条体の側脳室近傍、内包領域および視床下部において、マウス*Brorin*は神経幹細胞の増殖ではなく、神経系前駆細胞からアストロサイトへの分化抑制と神経細胞およびオリゴデンドロサイトへの分化促進に胎児期から関与することが示唆された。これまでに、Bmpシグナルは神経系前駆細胞から神経細胞への分化を抑制し、アストロサイトへの分化を促進することが明らかになっている。従って、マウス*Brorin*は胎児期からBmpアンタゴニストとして作用することにより、Bmpシグナルを抑制して、脳の特定の領域において神経系前駆細胞の運命決定に参与している可能性が考えられる。

(4) *Brorin* 遺伝子欠損マウスの組織重量、血糖値および血中インスリン濃度の検討

野生型マウスと比較して*Brorin*遺伝子欠損マウスの体重が有意に増加していたことから、組織重量と血糖値について検討した。*Brorin*遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比較して、主要臓器である心臓、肺、腎臓の重量には差が見られなかったものの、皮下及び内臓共に白色脂肪組織重量は増加していた。

また血糖値を測定したところ、*Brorin*遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比較して血糖値が上昇していた。

そこで、野生型マウスおよび*Brorin*遺伝子欠損マウスについて、エネルギー代謝状態

の指標となる血中パラメータの変化の有無についても検討した。Brorin遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比較して、血中インスリン濃度も増加していた。

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)

A. Miyake, T. Chitose, E. Kamei, A. Murakami, Y. Nakayama, M. Konishi, N. Itoh, Fgf16 is required for specification of GABAergic neurons and oligodendrocytes in the zebrafish forebrain, *PLoS One*, 査読有、9巻、2014、e110836
DOI:10.371/journal.pone.0110836

Y. Masuda, H. Ohta, Y. Morita, Y. Nakayama, A. Miyake, N. Itoh, M. Konishi, Expression of Fgf23 in activated dendritic cells and macrophages in response to immunological stimuli in mice, *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有、38巻、2015、687-693

Y. Nakayama, Y. Masuda, H. Ohta, T. Tanaka, M. Washida, Y.I. Nabeshima, A. Miyake, N. Itoh, M. Konishi, Fgf21 regulates T-cell development in the neonatal and juvenile thymus, *Sci. Rep.*, 査読有、7巻、2017、330、
DOI: 10.1038/s41598-017-00349-8

A. Miyake, Y. Mekata, H. Fujibayashi, K. Nakanishi, M. Konishi, N. Itoh, Brorin is required for neurogenesis, gliogenesis, and commissural axon guidance in the zebrafish forebrain, *PLoS One.*, 査読有、12巻、2017、e0176036
DOI:10.1371/journal.pone.0176036.
eCollection 2017

[学会発表](計 4件)

村上 温子、平松 丈朗、田松 秀和、山上 誠人、小西 守周、三宅 歩、伊藤 信行
新規分泌性 Bmp antagonist, Brorin 及び Brorin-like の神経細胞とアストロサイトの分化における機能解析
第 37 回日本分子生物学会、2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜

藤林 英徳、中西 和也、目堅 瑤子、楠田 素子、三宅 歩
前脳形成過程における分泌性因子ゼブラフィッシュ Brorin の役割

第 39 回日本分子生物学会、2016 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜

藤林 英徳、高橋 都史樹、三宅 歩
グリア細胞の分化における新規分泌性因子、ゼブラフィッシュ Brorin-like の役割
第 40 回日本分子生物学会、2017 年 12 月 6 日、神戸ポートアイランド

中西 和也、村川 由佳、三宅 歩
前脳形成過程におけるゼブラフィッシュ fgf22 の機能
第 40 回日本分子生物学会、2017 年 12 月 6 日、神戸ポートアイランド

[図書](計 0件)

該当なし

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

該当なし

取得状況(計 0件)

該当なし

[その他]
ホームページ等

該当なし

6. 研究組織
(1)研究代表者

三宅 歩 (MIYAKE, Ayumi)
京都大学・大学院薬学研究科・講師
研究者番号: 40346044

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

伊藤信行 (ITHO, Nobuyuki)
京都大学・国際高等教育院・教授

小西 守周 (KONISHI, Morichika)
神戸薬科大学・教授