

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860853

研究課題名(和文) 神経細胞におけるSCRN1の分化に対する影響

研究課題名(英文) The effect of SCRN1 on neuronal differentiation

研究代表者

手塚 優 (tezuka, yu)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：70453321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体内で普遍的に発現しているセセルニン(Secernin 1: SCRN1)は、癌細胞を含む多くの細胞の成長に影響を与えることが報告されている。神経細胞に対するSCRN1の役割について、培養細胞を用いて検討した結果、SCRN1の発現変化は神経細胞の分化を調節した。また、SCRN1の発現を低下させた遺伝子改変動物では、胎仔の成長も抑制されることが明らかとなった。本研究結果は、胎児期の甲状腺ホルモン低下が原因と考えられる神経発達障害の原因の一つとしてSCRN1が治療標的となりうることを示唆し、今後新しい治療の確立に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Secernin (SCRN)1 whose expression is detected in various tissues has been known to enhance the growth of many types of cells including cancer cells. In this study, our results suggest that change in SCRN1 expression can influence neuronal differentiation such as neurite outgrowth in neuronal cells. It was revealed that the fetal development is inhibited by decreased expression of SCRN1 in SCRN1 gene trap mice. Since the expression level of SCRN1 is reduced in chick cerebellum under hypothyroid condition during fetal development, the results in this study are useful information to address new therapeutic approaches of hypothyroid diseases.

研究分野：薬理学

キーワード：神経分化 発生

## 1. 研究開始当初の背景

セセルニン (Secernin 1 : SCRN1) は、生体内で普遍的に発現しているタンパク質である。2000 年以降、新規の腫瘍関連抗原 (TAAs) の候補として検討されており、生殖器と消化器官の癌細胞において、癌細胞の成長・増大時に SCRN1 の発現が増加することが明らかとなっている<sup>1,2)</sup>。これらの検討から SCRN1 が細胞の成長に何かしらの影響を与えることが考えられるが、その機序には不明な点が多い。我々の研究室では、孵化前の鶏卵に抗甲状腺薬 (MMI : メチマゾール) 投与することで孵化の遅延や鶏胚脳重量が増加し、小脳組織に変化があることを明とした<sup>3)</sup>。この小脳組織のプロテオミクス解析では、SCRN1 タンパク質の泳動パターンに変化が認められた。これまで、SCRN1 が脳・神経細胞の発達に関与しているという報告は存在していない。しかし、鶏胚を用いた結果から SCRN1 が脳・神経細胞の発達に対し、何かしら関与している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

妊娠中の抗甲状腺薬投与による低甲状腺ホルモン状態が胎児脳の発達にどのように影響するかについては、未だ不明な点が多い。我々の研究室では、孵化前の鶏卵に MMI を投与した鶏胚において、小脳でのセセルニン (Secernin 1 : SCRN1) タンパク質に変化が認められることを明らかとした。SCRN1 は、殆どの組織に発現し、プロテアーゼ活性ドメインを有することが分かっているが、細胞内での役割については不明な点が多い。そこで申請者は、胎児期の神経発達における SCRN1 の役割を明らかとする。本申請研究で得られた結果は、甲状腺ホルモン低下状態で起こる神経発達障害の

治療にも貢献しうる基礎研究になると考える。

## 3. 研究の方法

1、si-RNA およびアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法により N1E115 細胞及びラット初代培養神経細胞での SCRN1 の発現調節を行い、SCRN1 が神経細胞の分化に与える影響について培養細胞を用いて検討を行った。また、SCRN1 の発現調節を行うことで、細胞内で SCRN1 の発現と関連して発現や活性が変化するタンパク質について RT-PCR 法および WB 法を用いて検討を行った。

2、SCRN1 遺伝子改変マウスを用いた SCRN1 の発生における役割の解明

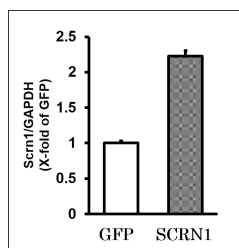
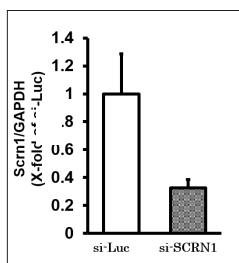
SCRN1 遺伝子の一部を破壊した SCRN1 ヘテロ接合体マウス (SCRN1<sup>+/-</sup>) 同士を掛け合わせることにより、発生における SCRN1 の重要性および SCRN1 ノックアウト (KO) マウス (SCRN1<sup>-/-</sup>) の表現系の検討を行った。

## 4. 研究成果

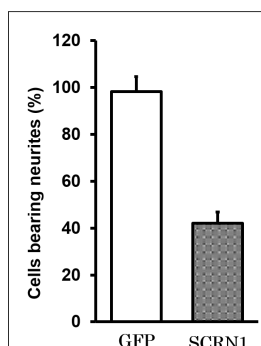
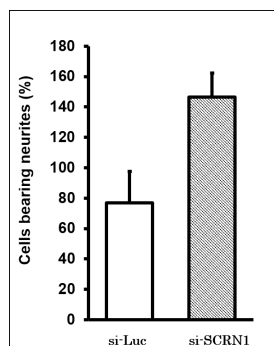
### 1、SCRN1 の神経細胞分化に与える影響

マウス神経芽腫由来細胞 (N1E115 細胞) を神経細胞のモデルとして神経細胞の分化誘導に対する SCRN1 の影響について検討を行った。si-SCRN1 を N1E115 細胞に加え、N1E115 細胞における SCRN1 の役割を検討した。その結果、si-RNA により SCRN1 の発現が低下した N1E115 細胞において、神経細胞様突起伸張が認められた。さらに、SCRN1 遺伝子をアデノウイルスベクター (ADV-SCRN1) を用い、N1E115 細胞内で過剰発現させた結果、SCRN1 の発現が増加した N1E115 細胞においては、神経突起様突起伸張が抑えられた。

また、ラット初代培養神経細胞を用いて神経細胞の分化誘導に対する SCRNI の影響について検討を行った。



その結果、N1E115 細胞と同様に、si-SCRNI による SCRNI の発現が低下することにより、神経細胞様突起伸張が認められた。ADV-SCRNI を用いた、SCRNI の過剰発現モデルでは、SCRNI の発現が増加することで神経細胞においては、神経突起様突起伸張が抑えられた。

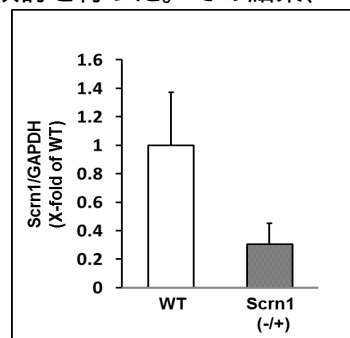


## 2、SCRNI の標的シグナルの検討

神経細胞分化には細胞内シグナルの変化が影響している。そこで SCRNI の発現レベルによって影響を受ける細胞内シグナルについて PCR 法および WB 法を用いて検討を行った。その結果、神経細胞の増殖や分化に関係している MAPK family、Notch、PI3/AKT family、Wnt/-catenin 等の細胞内シグナルにおいて SCRNI の発現と同期した発現レベルの変化やリン酸化による活性化は認められなかった。

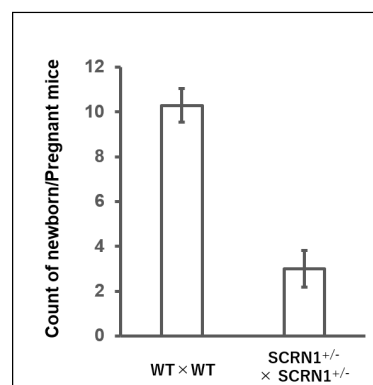
## 3、SCRNI 遺伝子改変マウスの表現系解析

SCRNI の発現が神経細胞の発生時の分化に与える影響について検討を行うため、SCRNI 遺伝子を破壊した遺伝子改変マウスを作製し、検討を行った。その結果、SCRNI の発現が低下している遺伝子改変マウスである SCRNI へテロ接合体



マウス (SCRNI<sup>+/-</sup>) の雌雄を掛け合わせた結果、SCRNI の遺伝子改変マウスを掛け合わせることで出生率が低下した。また、SCRNI の遺伝子が発現していない

(SCRNI<sup>-/-</sup>) の出生率は理論値と比較して著しく低下していることが明らかとなった。また、わずかながら出生した SCRNI<sup>-/-</sup> の個体は、WT (SCRNI<sup>+/+</sup>) やヘテロ接合体マウス (SCRNI<sup>+/-</sup>) と比較して身体が大きさが小さく、離乳後 2~4 週間で死亡する個体が多いことが明らかとなった。そこで、SCRNI へ



テロ接合体マウス同士を掛け合わせた場合の胎生 10.5 日目の胎子について発生数や大きさについて検討を行った。その結果、胎生 10.5 日目の発生数はコントロール群 (WT x WT) と有意な差は認められず、子宮内での児の発達についても大きな変化は認められなかった。

胎生 17.5 日目では、SCRN1 の遺伝子が発現していない SCRN1<sup>-/-</sup>は、WT(SCRN1<sup>+/+</sup>) およびヘテロ接合体 (SCRN1<sup>+/-</sup>) と比較して身体の成長に違いが認められた。

SCRN1	Count of newborn (SCRN1 <sup>+/+</sup> × SCRN1 <sup>+/-</sup> )		
	+/+	+/-	-/-
♂	22	69	11
♀	24	51	6
<b>Total</b>	48	120	17

甲状腺ホルモン低下状態では、小脳組織において SCRN1 の発現が低下することから、本申請研究で得られた結果は、抗甲状腺薬による母体の治療や先天性甲状腺疾患により引き起こされる、胎児の甲状腺ホルモン低下が原因と考えられる神経発達障害の治療に貢献するものである。

#### 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 件 )

〔 学会発表 〕 ( 計 件 )

〔 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

手塚 優 ( Tezuka, Yu )  
岩手医科大学・薬学部・助教  
研究者番号 : 70453321

##### (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

( )