

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870683

研究課題名(和文) 成体神経幹細胞の恒常性維持機構とその認知機能形成における役割の解明

研究課題名(英文) Analysis of the molecular basis of neural stem cell maintenance and its role in cognitive function

研究代表者

大内 靖夫 (OUCHI, YASUO)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：70553858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、海馬に内在する成体神経幹細胞の認知機能の形成における役割が注目されている。本研究では、我々の開発したDGCR8遺伝子ヘテロ欠損型統合失調症モデルマウスを用いて、成体神経幹細胞の恒常性維持機構、認知機能形成およびその障害における役割をエピジェネティック制御の観点から明らかにすることを目的とした。その結果、成体神経幹細胞の自己分泌型増殖因子であるIGF2遺伝子の発現制御領域に、DNAメチル化異常が認められ、その発現が低下していた。このことから、海馬に内在する成体神経幹細胞はエピジェネティックな分子機構による制御を受けており、認知機能形成および統合失調症の発症に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, the role of adult hippocampal neurogenesis in cognitive function has attracted a lot of attention. In this study, to elucidate the molecular mechanism of the maintenance of adult neural stem cells and its role in cognitive function and development of schizophrenia, we focused on epigenetic regulation and analyzed the genome-wide DNA methylation profile of Dgcr8(+/-) mouse model of 22q11.2 deletion-associated schizophrenia. From this result, consistent with downregulation of IGF2 gene expression, we found that the DNA methylation status of the regulatory region of IGF2 gene, which is an important autocrine growth factor for hippocampal neural stem cells is altered in the Dgcr8(+/-) mice compared with control wild-type mice. These findings suggest that the role of an epigenetic regulatory mechanism of neural stem cells in cognitive function and in the development of schizophrenia.

研究分野：幹細胞学、分子生物学

キーワード：幹細胞学 認知機能形成 成体神経新生

1. 研究開始当初の背景

我々は、家族性の統合失調症のうちで最も頻度の高い22q11.2欠失症候群の責任領域に存在するmiRNAの生合成に不可欠なDGCR8遺伝子に着目し、Dgcr8遺伝子欠損マウスを作成し解析を進めてきた。その結果、Dgcr8遺伝子ヘテロ欠損マウスは、海馬に内在する成体神経幹細胞の自己分泌型増殖因子であるIGF2の発現低下により、神経新生と認知機能の低下を引き起こす、有用な統合失調症モデルマウスであることを明らかにしてきた(Ouchi Y et al., J Neurosci 2013)。

一方、近年、精神疾患の発症において環境要因によるエピゲノム変化が重要な役割を担っていること(Niwa Met al., Science 2013)が報告されたが、我々の同定したIGF2は、“刷り込み遺伝子”として非常に有名な分子である。IGF2遺伝子の発現は父性のゲノムのDMR領域がメチル化されることにより父性アレルのみが発現する。精神疾患においては統合失調症の発症との関連性が指摘されており、古くから統合失調症の発症率を2倍に増加させた環境要因として注目されてきた、第二次世界大戦末期の“Dutch Hunger Winter”の時期に胎児であったヒトでは、エピゲノム異常によるIGF2の発現低下が起きており、統合失調症の発症が高まる可能性が指摘されている(Heijmans BT et al., PNAS 2008)。

これらの事実から、miRNA発現異常、エピゲノム異常により、IGF2などの神経幹細胞未分化性維持因子の発現が障害され、成体神経幹細胞の恒常性が低下することが、認知機能障害を伴う精神疾患の発症において重要な役割を担っていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では海馬に内在する成体神経幹細胞における遺伝子発現、エピジェネティック制御に着目し、統合失調症などの認知機能の障害を伴う精神疾患の病態におけるその状態

変化と、その分子機構を解明することで、脳の恒常性維持機構と認知機能形成、およびその障害における分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)Agilent mouse CpG Island microarrayを用いたゲノムワイドなDNAメチル化領域の網羅的解析

8週齢のDgcr8(+/-)およびDgcr8(+/+)雄マウスより、海馬組織を摘出し、定法にてgDNAの抽出を行った。得られたgDNAに対して、超音波ホモジナイザー(Branson Sonifier 450)を用いてDNAの断片化処理を行い、得られた断片化gDNAのサイズを2% Agaroseゲル電気泳動で確認を行った。続いてDgcr8(+/-)およびDgcr8(+/+)マウスより得られたgDNA断片を、それぞれCy3, Cy5標識し、Agilent mouse CpG Island microarray 2 x 105K(Agilent社)を用いてゲノムワイドなメチル化の変化の網羅的な解析を行った。得られた遺伝子群に対して、先行研究から得られたDgcr8(+/-)およびDgcr8(+/+)マウス海馬における網羅的遺伝子発現解析結果を用いた発現解析、Pathway解析を行った。

(2)Bisulfite sequence法を用いたIgf2-H19遺伝子領域に対するDNAメチル化解析

8週齢のDgcr8(+/-)およびDgcr8(+/+)雄マウス、各4匹より、海馬組織を摘出し、定法にてgDNAの抽出を行った。得られたgDNAに対して、EpiTect Fast DNA Bisulfite kit(QIAGEN社)を用いてgDNAのBisulfite処理を行い、精製後、得られたDNA産物に対して、Igf2/H19ゲノム領域に存在するICR特異的なPrimerを用いてPCRを行い、増幅を行った。続いて得られたPCR産物をpGEM-T-Easyにクローニングし、Sequenceの解析を行うことでICR領域のメチル化の解析を行った。

4. 研究成果

CpG island マイクロアレイを用いて、DGCR8 遺伝子ヘテロ欠損型統合失調症モデルマウスにおけるエピゲノムの解析を行った結果、本マウス海馬では、数多くの遺伝子で CpG island における DNA メチル化状態に変動が起きていることが明らかとなった。興味深いことに海馬における成体神経幹細胞の自己分泌型増殖因子であり、我々が本モデルマウスにおいて発現が低下していることを報告していた Igf2 遺伝子や神経幹細胞マーカーである Sox2 遺伝子上に存在する CpG island が高メチル化状態にあることがわかった。続いて IGF2 は隣接する H19 遺伝子とともに、エピジェネティックな制御を受ける胚発生、癌細胞における増殖因子であり、統合失調症の発症との関連性が示唆されていることから Bisulfite Sequence 法を用いて Igf2/H19 遺伝子座に対してより詳細な解析を行った。その結果、Dgcr8(+/-) マウス海馬では Igf2 の発現をエピジェネティックに制御するエンハンサーである ICR 領域上に存在する CTCF 結合配列第3番が低メチル化状態になっていることが明らかとなった。ICR 領域の低メチル化は Igf2 遺伝子の発現を抑制することから、この低メチル化状態は Igf2 の発現低下に寄与している可能性が考えられる。以上の結果から Dgcr8 ヘテロ欠損型統合失調症モデルマウスの海馬では、DNA メチル化制御異常によって IGF2 の発現が低下し、成体神経幹細胞の増殖、神経新生を低下させ、認知機能形成の低下を引き起こしている可能性が示唆された。

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 3件)

(1) Usui-Ouchi A, Ouchi Y, Kiyokawa M, Sakuma T, Ito R, Watanabe S, Ebihara N
“Upregulation of Mir-21 Levels in the Vitreous Humor Is Associated with

Development of Proliferative Vitreoretinal Disease”
PLoS ONE 11(6): e0158043.2016, **査読有**

(2)大内靖夫

「統合失調症の病態における miRNA の生合成と成体海馬のニューロン新生の役割」
神経化学学会誌 Vol.54 (No.1) :1-7, 2015,
査読無

(3) Iwamoto T, Ouchi Y.

Emerging evidence of insulin-like growth factor 2 as a memory enhancer: a unique animal model of cognitive dysfunction with impaired adult neurogenesis.
Rev Neurosci. 2014;25(4):559-74, 査読有

〔学会発表〕(計 4件)

1.Ouchi Y, Patil A, Uematsu S
“Generation of tumor-specific cytotoxic T cells via highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing”
千葉大学 GP シンポジウム、千葉大学(千葉)
2016年11月14日(ポスター発表)

2.Ouchi Y

“The DGCR8 gene, a candidate gene for 22q11.2deletion-associated schizophrenia, regulates adult hippocampal neurogenesis and cognition”
第11回幹細胞シンポジウム、淡路夢舞台国際会議場(兵庫)2016年5月20日(ポスター発表)

3. 大内 靖夫

「統合失調症の病態における miRNA の生合成と成体海馬のニューロン新生の役割」
厚生労働省ヒト幹細胞情報化推進事(SKIP) セミナー、2015年12月、慶応義塾大学医学部(東京)(招待講演)

4. 大内 靖夫

“The emerging role of microRNA biogenesis and adult neurogenesis in schizophrenia.”
第36回日本生物学的精神医学会、第57回日本神経化学学会大会合同年会、2014年10月1日、奈良、日本(招待講演)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 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 0 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

大内 靖夫 (OUCHI, Yasuo)
千葉大学・大学院医学研究院・特任助教
研究者番号：70553858

(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

()