慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	神経細胞が細胞死を免れる機構の解明
Sub Title	Mechanisms of neuronal cell death and survival
Author	仲嶋, 一範(Nakajima, Kazunori) 本田, 岳夫(Honda, Takao) 久保, 健一郎(Kubo, Kenichiro)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
JaLC DOI	
Abstract	マウスの全大脳半球培養の際に大量の神経細胞死が生じることを確認し, ある特定の培地成分の有無によって神経細胞死が大きく影響を受けることを発見した。この成分が神経細胞死を誘導する機構を検討し, 分子的機序の一部を明らかにした。さらに, この成分による神経細胞死誘導を阻害できる薬剤を見出した。 また, マウス胎生期に一過的に虚血にして神経細胞死等を誘導した際に発現が変動する分子群を同定し, 変化の大きいシグナル経路を同定した。 We found that massive neuronal cell death occurred during culture of mouse cerebral cortex and that a certain component in the culture medium was important for this cell death induction. We have therefore analyzed the mechanism of this cell death, and have discovered a drug that could prevent the cell death by inhibiting this mechanism. We have also identified a set of genes whose expression was changed dramatically when mouse embryos had been exposed to transient ischemia.
Notes	研究種目 : 挑戦的萌芽研究 研究期間 : 2016～2016 課題番号 : 16K14567 研究分野 : 発生神経生物学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K14567seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　(共通)

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年　 ５ 月 ２６ 日現在

機関番号： ３２６１２
研究種目： 挑戦的萌芽研究
研究期間： 2016～2016
課題番号： １６Ｋ１４５６７

研究課題名（和文） 神経細胞が細胞死を免れる機構の解明

研究課題名（英文） Mechanisms of neuronal cell death and survival

研究代表者
仲嶋　一範（NAKAJIMA, Kazunori）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：９０２８０７３４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,900,000円

研究成果の概要（和文）：　マウスの全大脳半球培養の際に大量の神経細胞死が生じることを確認し、ある特定の培地成分の有無によって神経細胞死が大きく影響を受けることを発見した。この成分が神経細胞死を誘導する機構を検討し、分子的機序の一部を明らかにした。さらに、この成分による神経細胞死誘導を阻害できる薬剤を見出した。
　また、マウス胎生期に一過的に虚血にして神経細胞死等を誘導した際に発現が変動する分子群を同定し、変化の大きいシグナル経路を同定した。

研究成果の概要（英文）： We found that massive neuronal cell death occurred during culture of mouse cerebral cortex and that a certain component in the culture medium was important for this cell death induction. We have therefore analyzed the mechanism of this cell death, and have discovered a drug that could prevent the cell death by inhibiting this mechanism.
We have also identified a set of genes whose expression was changed dramatically when mouse embryos had been exposed to transient ischemia.

研究分野： 発生神経生物学

キーワード： 神経科学　脳・神経　発生・分化　細胞死

１．研究開始当初の背景

(1) 我々は以前、マウス脳の発生過程を子宮外で継続させることのできる系として、大脳半球全体を旋回しながら培養する系を確立し、様々な解析に使用してきた(Yozu, et al., ***J. Neurosci.,*** 25 (31), 7268-7277, 2005; Kanatani, et al., ***J. Neurosci.,*** 28 (50), 13582-13591, 2008; Kanatani, et al., ***PNAS,*** 112 (36), E4985-94, 2015)。その過程で、髄膜付きで培養すると平滑な表面を持ったまま大脳半球は成長する一方で、髄膜を除去してから培養すると脳表面が平滑ではなくなり、大きく変形することを見出した。またそれに伴い、大量の神経細胞死が髄膜除去脳に生じていることを見出した。

(2) 妊娠週数 28 週未満で生まれるヒトの超早産児は、発達後に高い確率で高次脳機能障害を引き起こすことが知られている。虚血などによる神経細胞死等の障害が関係している可能性が予想されていたが、その詳細は不明であった。

２．研究の目的

(1) まずは髄膜の有無による差が再現性良く生じることを確認する。そして、マウス大脳半球を髄膜を除去してから培養するとなぜ大量の神経細胞死が起こるのかを明らかにし、その細胞死を防ぐ方法と機構を見出すことを目指した。

(2) ヒト超早産児が生まれる時期に相当するマウス胎仔をモデルとし、一過的に虚血にしたときに神経細胞の生存に与える影響を明らかにする。そして、神経細胞の生存を守る人為的介入方法を見出すための手がかりとして、虚血の際に変化を生じる分子群やシグナル経路を明らかにすることを目指した。

３．研究の方法

(1) マウス胎仔の大脳半球を摘出し、少量の液体培地を含むガラスボトルに入れて旋回しながら培養を行なった。その際、髄膜をあらかじめ除去した大脳半球と、髄膜を残した大脳半球を用意し、それぞれ培養して経過を観察した。また、液体培地中の成分を少しずつ変えた一連の培地を用意し、それぞれを用いて同様に大脳半球を培養して、その影響を調べた。

(2) まずヒトの超早産児が生まれる時期がマウスのどの時期に相当するのかを検討するため、妊娠週数ごとのヒト胎児の脳の状態を調べてマウス脳と比較した。その後、ヒトの妊娠週数 25 週程度に相当する時期のマウス胎仔に虚血操作を加え、脳の中で生じる神経細胞死等の変化を調べた。さらに、マイクロアレイ解析等を行い、遺伝子発現等に変化を生じる分子群とシグナル経路を検索した。また、神経細胞死等を抑制できる人為的な介入方法についての検討を行った。

４．研究成果

(1) 髄膜をあらかじめ除去してから全大脳半球培養を行うと、再現性良く全体が変形し、神経細胞死が生じることを確認した。そこで次に、培地中の成分を少しずつ変更した培地を各種作成し、同様の培養実験を行って、神経細胞死への影響を調べた。その結果、ある特定の成分の有無によって神経細胞死が大きく影響を受けることを発見した。この成分が神経細胞死の誘導に重要な役割を有することが示唆されたため、その機構を検討し、分子的機序の一部を明らかにした。そこでさらに、この成分による神経細胞死誘導を阻害する薬剤を探索したところ、ほぼ完全に阻害できる（同条件で培養しても神経細胞死が生じなくなる）薬剤を見出した。この薬剤は、今回見出した神経細胞死誘導機構を直接阻害できることも確認した。

(2) 倫理委員会の承認を得てヒト胎児の脳切片とマウスの脳切片との比較を行った。その結果、産生される神経細胞の種類や移動の状況等を指標とした場合、マウスの胎生 16.5 日程度の大脳皮質の発達段階がヒトの妊娠週数 25 週程度の発生段階に相当すると考えられた。そこで、マウスの胎生 16.5 日において一過的に子宮動脈を結紮し虚血にする

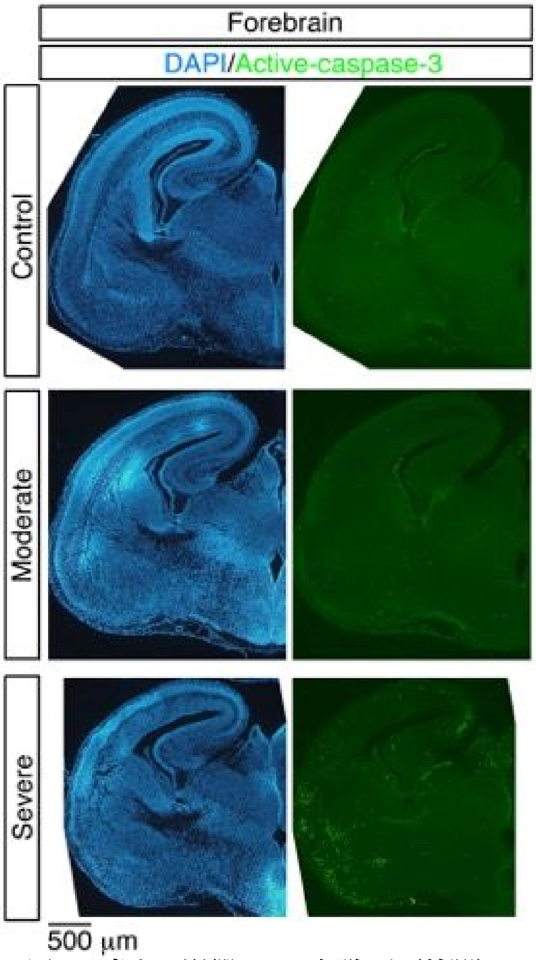

図１　虚血の影響による細胞死（前脳）

ProbeName	FC ([Ischemia] vs [Control])	FC (abs) ([Ischemia] vs [Control])	Regulation ([Ischemia] vs [Control])	Gene Symbol
A_55_P2005475	3.7865996	3.7865996	up	Sult1a1
A_51_P256827	3.7012823	3.7012823	up	S100a8
A_55_P2269819	3.3631954	3.3631954	up	Fam107a
A_51_P321341	3.348934	3.348934	up	Sult1a1
A_51_P509573	-3.148907	3.148907	down	Ccl4
A_51_P167292	3.1191921	3.1191921	up	Chil3
A_52_P507214	-2.9049335	2.9049335	down	Mmp9
A_55_P1963154	2.867865	2.867865	up	Folh1
A_55_P2015541	2.856905	2.856905	up	Hif3a
A_55_P1998471	2.7766004	2.7766004	up	S100a9
A_51_P381618	2.7030358	2.7030358	up	Pla1a
A_51_P140710	-2.5804858	2.5804858	down	Ccl3
A_51_P265495	2.2644572	2.2644572	up	Ly6a
A_51_P411345	-2.1858144	2.1858144	down	Mogat2
A_55_P2152364	-2.149678	2.149678	down	Runx2os1
A_51_P335569	2.1330056	2.1330056	up	Slco1a4
A_52_P680751	2.12709	2.12709	up	Cux1
A_51_P185660	-2.0876887	2.0876887	down	Ccl9
A_30_P01028902	-2.0796466	2.0796466	down	
A_55_P1961499	2.0675395	2.0675395	up	Ly6c1
A_52_P64763	-2.0279548	2.0279548	down	Gen1
A_55_P2109033	1.9916008	1.9916008	up	Hmgcs2
A_51_P241995	1.944063	1.944063	up	Col5a3
A_66_P139546	1.9306703	1.9306703	up	Igfbp6
A_55_P2185372	1.9084626	1.9084626	up	Sirt4
A_55_P2021981	-1.8969502	1.8969502	down	Ctsw
A_30_P01018027	-1.8920132	1.8920132	down	
A_30_P01027214	-1.8913376	1.8913376	down	
A_55_P2103190	-1.8789464	1.8789464	down	
A_52_P151227	-1.8685192	1.8685192	down	LOC102638165
A_55_P2364738	-1.8572079	1.8572079	down	Plxdc1
A_30_P01019455	-1.8547968	1.8547968	down	
A_55_P2148403	-1.8498558	1.8498558	down	
A_51_P421140	-1.8049215	1.8049215	down	Tubb6
A_55_P2154709	-1.7986627	1.7986627	down	Pter
A_52_P796840	1.7963213	1.7963213	up	Cfhr2
A_55_P2064771	1.7928647	1.7928647	up	Ly6c1
A_51_P362066	-1.7905496	1.7905496	down	Chil1
A_30_P01024091	-1.7758662	1.7758662	down	
A_30_P01029553	-1.771854	1.771854	down	
A_30_P01024622	-1.7615677	1.7615677	down	
A_51_P460954	-1.7500229	1.7500229	down	Ccl6
A_52_P515826	-1.7494599	1.7494599	down	Med13
A_55_P1988048	1.7458267	1.7458267	up	Emcn
A_55_P2111302	1.7383515	1.7383515	up	Cp
A_55_P2168346	-1.7371057	1.7371057	down	Banf2
A_66_P132249	-1.7223352	1.7223352	down	Akr1c13
A_30_P01029871	-1.7140328	1.7140328	down	
A_55_P2010271	-1.708752	1.708752	down	Samsn1
A_55_P1962747	-1.7076668	1.7076668	down	H2-Ab1
A_51_P519791	-1.7007089	1.7007089	down	Ska3

図 2 一過的な胎生期の虚血によって発現が変動した代表的な分子群

操作を加えて、その影響を調べた。その結果、予想通りアポトーシスに陥りつつある細胞が多く観察された（図 1）。

そこで次に、RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行い、虚血操作によって発現が変動する分子群を同定する（図 2）とともに、Ingenuity Pathway Analysis (IPA)ソフトウェアを用いて変化の大きいシグナル経路の探索を行った。その結果、炎症に関わる経路が大きく影響を受けていることがわかった（図 3）。

さらに、虚血操作時に一時的に体温を 3～4 度低下させることにより、神経細胞死等の影響を抑制できることも見い出した。今後さらにその抑制機序を解明していくことにより、神経細胞死を防ぐ機構とそれを活用した人為的介入方法が見出されることが期待される。

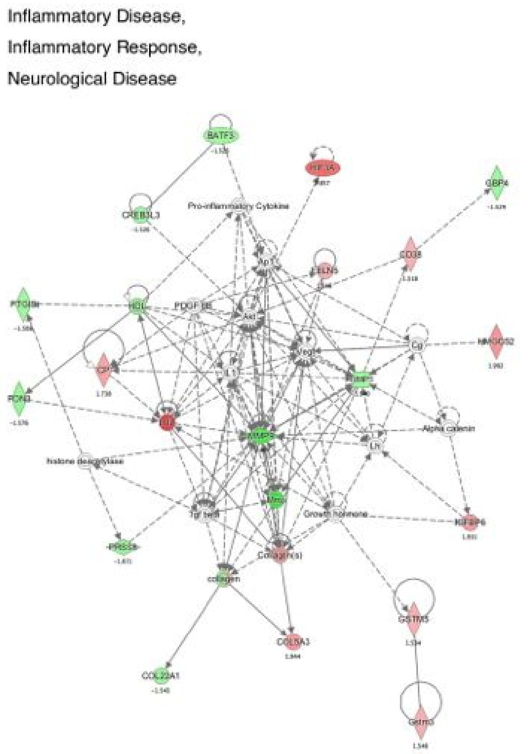

図 3 パスウェイ解析

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）

(1) Association of impaired neuronal migration with cognitive deficits in extremely preterm infants. <u>Ken-ichiro Kubo</u>, Kimiko Deguchi, Taku Nagai, Yukiko Ito, Keitaro Yoshida, Toshihiro Endo, Seico Benner, Wei Shan, Ayako Kitazawa, Michihiko Aramaki, Kazuhiro Ishii, Minkyung Shin, Yuki Matsunaga, Kanehiro Hayashi, Masaki Kakeyama, Chiharu Tohyama, Kenji F. Tanaka, Kohichi Tanaka, Sachio Takashima, Masahiro Nakayama, Masayuki Itoh, Yukio Hirata, Barbara Antalffy, Dawna D. Armstrong, Kiyofumi Yamada, Ken Inoue, and <u>Kazunori Nakajima</u>. ***JCI Insight***, in press. 査読有

〔学会発表〕（計　9　件）

(1) Gen Shiihashi, Daisuke Ito, Yuki Kobayashi, Shigeyoshi Itohara, Kanehiro Hayashi, <u>Kazunori Nakajima</u>, Shintaro Otsuka, Michisuke Yuzaki, and Norihiro Suzuki

“Novel ALS/FTD model mice expressed cytoplasmic FUS in a toxic gain-of-function manner” (oral)
The 13th International Conference on Alzheimer’s and Parkinson’s Diseases, Austria Centre, Vienna (Austria), 2017 年 3 月 29 日-4 月 2 日

(2) 久保健一郎、出口貴美子、北澤彩子、石井一裕、シン ミンギョン、高嶋幸男、中山雅弘、伊藤雅之、井上健、仲嶋一範
“超早産児脳障害のモデルマウス脳における組織構築の解析” (oral)
第122回日本解剖学会総会・全国学術集会、長崎大学坂本キャンパス（長崎県長崎市)、2017年3月28-30日

(3) Kazunori Nakajima
“Neuronal layer formation during development of the cerebral cortex” (oral, invited)
NUS-KEIO JOINT SCIENTIFIC SYMPOSIUM “Frontiers of Translational Medicine – From Cradle to Ageing”, National University of Singapore (Singapore), 2017 年 1 月 10-11 日

(4) Ken-ichiro Kubo, Kimiko Deguchi, Taku Nagai, Wei Shan, Ayako Kitazawa, Michihiko Aramaki, Kazuhiro Ishii, Shin Minkyung, Sachio Takashima, Masahiro Nakayama, Masayuki Itoh, Barbara Antalffy, Dawna D. Armstrong, Kiyofumi Yamada, Ken Inoue, and Kazunori Nakajima.
“Why does cognitive impairment frequently develop later in extremely preterm infants?” (poster)
Cell Symposia: Big Questions in Neuroscience, Paradise Point Resort & Spa, San Diego, California (U.S.A.), 2016年11月10-11日

(5) 久保健一郎、出口貴美子、井澤栄一、井上健、仲嶋一範
“環境要因としての虚血ストレスが大脳皮質の発達に与える影響（Effects of ischemic stress on cerebral cortical development）” (oral, invited)
シンポジウム：“生体防御・ストレス応答研究の新展開”（オーガナイザー：石井功）フォーラム2016：衛生薬学・環境トキシコロジー、昭和大学旗の台キャンパス（東京都品川区)、2016年9月11日

(6) 仲嶋一範
“大脳皮質の形成機構”(oral, invited)
九州大学医学部組織学特論、九州大学病院キャンパス基礎研究 B 棟（福岡県福岡市)、2016 年 7 月 8 日

(7) 仲嶋一範
“環境因子が大脳皮質の発生・発達過程に与える影響”(oral, invited)
九州大学精神科・特別セミナー、九州大学病院ウェストウィング棟 （福岡県福岡市)、2016 年 7 月 7 日

(8) 仲嶋一範
“大脳皮質構築のメカニズム” (oral, invited)
京都大学大学院医学研究科セミナー、京都大学医学部 A 棟 （京都府京都市)、2016 年 6 月 28 日

(9) 仲嶋一範
“大脳皮質層構造の形成機構” (oral, invited)
京都大学医学部解剖学特別講義、京都大学医学部総合解剖センター（京都府京都市)、2016 年6月28日

６．研究組織
(1) 研究代表者
仲嶋　一範　(NAKAJIMA, Kazunori)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：90280734

(2) 連携研究者
本田　岳夫　(HONDA, Takao)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：30365225

久保　健一郎　(KUBO, Ken-ichiro)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：20348791