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

Title	ヒストンメチル化機構の異常が神経幹細胞の細胞分裂動態に与える影響に関する研究
Sub Title	Effects of abnormal histone methylation on cell cycle kinetics of neuronal progenitor cells
Author	三橋, 隆行(Mitsuhashi, Takayuki) 小崎, 健次郎(Kosaki, Kenjiro) 高橋, 孝雄(Takahashi, Takao)
Publisher	
Publication year	2016
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2015.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では過成長をきたす先天奇形症候群の原因について, 大脳皮質を形成する神経幹細胞の細胞分裂動態を中心に解析しようと試みた。具体的には, Sotos症候群の原因遺伝子NSD1蛋白の発現量を神経幹細胞でのみ減少可能な遺伝子改変マウスを作成しようとしたが, 実施期間中に完成させることができなかった。今後, ゲノム編集技術など別の方法を用いて遺伝子改変マウスを作成する計画を進めている。 A purpose of this research is to elucidate potential roles of histone methylation on cell cycle kinetics of neuronal progenitor cells. In detail, we have attempted to generate transgenic mice that would be capable of decreasing expression level of NSD1 protein, a causative protein for overgrowth syndrome Sotos syndrome, by applying RNA interference (RNAi) strategy in vivo. However, we were unable to obtain functional transgenic mouse lines during the research period, suggesting that RNAi might not be the appropriate method to generate the mice. We are planning to generate transgenic mouse lines using genome editing technique.
Notes	研究種目 : 基盤研究(C)(一般) 研究期間 : 2013 ~ 2015 課題番号 : 25461560 研究分野 : 医歯薬学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25461560seika

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、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月　 ７ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：２５４６１５６０

研究課題名（和文）ヒストンメチル化機構の異常が神経幹細胞の細胞分裂動態に与える影響に関する研究

研究課題名（英文）Effects of abnormal histone methylation on cell cycle kinetics of neuronal progenitor cells

研究代表者
三橋　隆行（MITSUHASHI, TAKAYUKI）

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：８０３３８１１０

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）：本研究では過成長をきたす先天奇形症候群の原因について、大脳皮質を形成する神経幹細胞の細胞分裂動態を中心に解析しようと試みた。具体的には、Sotos症候群の原因遺伝子NSD1蛋白の発現量を神経幹細胞でのみ減少可能な遺伝子改変マウスを作成しようとしたが、実施期間中に完成させることができなかった。今後、ゲノム編集技術など別の方法を用いて遺伝子改変マウスを作成する計画を進めている。

研究成果の概要（英文）：A purpose of this research is to elucidate potential roles of histone methylation on cell cycle kinetics of neuronal progenitor cells. In detail, we have attempted to generate transgenic mice that would be capable of decreasing expression level of NSD1 protein, a causative protein for overgrowth syndrome Sotos syndrome, by applying RNA interference (RNAi) strategy in vivo. However, we were unable to obtain functional transgenic mouse lines during the research period, suggesting that RNAi might not be the appropriate method to generate the mice. We are planning to generate transgenic mouse lines using genome editing technique.

研究分野：医歯薬学

キーワード：神経発生　細胞周期　エピジェネティクス　メチル化

１．研究開始当初の背景

高次脳機能の獲得はヒト中枢神経発達の中でも最重要項目である。高次脳機能の中枢である大脳皮質の発生は、遺伝情報により規定されたプログラムに従って進行しつつ、遺伝要因や環境因子により直接的・間接的に影響を受けることが想定されている。神経幹細胞から前駆細胞を経て幼若な神経細胞が産生される過程は、大脳皮質を構成するニューロンとグリアおよび興奮性ニューロンと抑制性ニューロンについて、それぞれ数のバランスや分布パターンがおおかた決定される極めて重要なステップである。この時期の正常発生メカニズムを解明し、さらに発生異常の原因となりうる種々の因子の関与様式について検討することは、小児における高次脳機能障害の病態解明、予防・治療法開発に不可欠と考える。

これまで発達遅滞に対して有効な治療法は存在しないと考えられてきたが、精神発達遅滞の重要な原因としてエピジェネティックな異常、すなわち DNA 塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現メカニズムの異常が、中枢神経異常を合併する先天奇形症候群の病態メカニズムとして注目されている。真核生物の核内においては、DNA はヒストンタンパクにまきつく形でクロマチン構造をとり、ヒストンの化学的修飾（アセチル化、メチル化、リン酸化）によりクロマチンの三次元構造が変化することで、クロマチンにまきついている DNA の転写活性に変化を生じると考えられている。これらの転写活性の変化は塩基配列に非依存的に生じることからエピジェネティクス機構の主要なメカニズムと想定される。

本研究では過成長・悪性腫瘍の合併・精神発達遅滞・先天性心疾患や腎尿路の異常を特徴とする先天異常症候群の一つである Sotos 症候群に着目した。Sotos 症候群はヒストンメチル基転移酵素活性（histone methyltransferase, HMT）を持つ NSD1 遺伝子のヘテロ変異により発症することから、その発症にはメチル化ヒストンの異常な減少が関係していると考えられる。具体的には、NSD1 はヒストン H3 の 36 番目リジン残基（H3K36）およびヒストン H4 の 20 番目リジン残基（H4K20）へメチル基を特異的に転位し、一方 H3K36 の脱メチル化は Jhdm1b 型ヒストンリジン脱メチル酵素によって触媒される。Jhdm1b は細胞周期の調節を担う重要分子であることから、NSD1 の機能異常が細胞周期調節機構を破たんさせることで神経細胞数を異常に増加させる結果、大頭症や頭囲の過成長、生後の高い腫瘍発生率につながる可能性が高い。

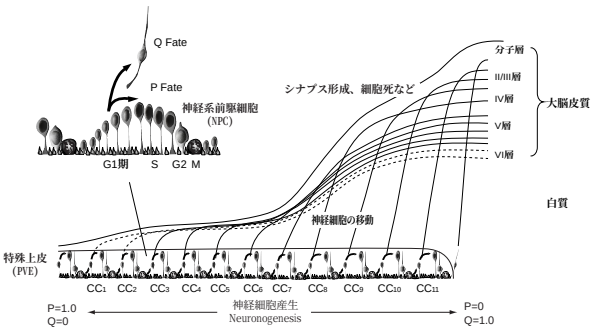
申請者は 2005 年より「ヒストンアセチル化状態が神経幹細胞の分裂調節に重要な機能を持つのではないか」との仮説のもと研究を開始し、大脳皮質を形成する神経幹細胞内のヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）の発現量が神経細胞産生過程が進むにつれて変動することや、特定のリジン残基特異的なヒストンアセチル化状態が変化することを見出した（三橋ら、投稿中）。さらに特定のヒストン脱アセチル化酵素を強制発現することで、産生される神経細胞数が増加し皮質構築に異常を生じることが判明している（三橋ら、投稿中）。近年の研究でヒストンアセチル化とメチル化が初期の想定以上に密接に関連していることが示されていることを鑑みると、エピジェネティクス機構を担うメカニズムの一つであるヒストンメチル化の異常により神経幹細胞の細胞分裂動態が破たんし、大脳皮質発生プログラムに異常を生じる可能性がある。

上記仮説の傍証として、近年原因が判明した多くの大脳皮質形成異常を伴う先天奇形症候群においてヒストンメチル化あるいはアセチル化異常が関与することが明らかとなっている。具体的には Kabuki 症候群（ヒストンメチル基転移酵素 MLL2 遺伝子）、Rubinstein-Taybi 症候群（ヒストンアセチル化酵素 CBP 遺伝子）、Young-Simpson 症候群（ヒストンアセチル化酵素 KAT6B（MYST4/MORF）遺伝子）などがあり、大脳皮質発生においてエピジェネティック機構が重要な役割を担っている点を強く示唆している。

２．研究の目的

本研究では、神経幹細胞特異的に NSD1 タンパク発現量を減少させることで神経幹細胞の細胞分裂動態の異常とそれらから形成される大脳皮質構築異常を解析し、Sotos 症候群の病態発現メカニズムを解明することを目標に実施した。NSD1 タンパク発現を減少させるモデルマウスを RNA 干渉と子宮内電気穿孔法とを組み合わせることで作成し、神経幹細胞の細胞分裂動態に与える影響の解析を試みた。またその結果として大脳皮質にどのような異常を生じるのかについて解析し、Sotos 症候群に認められる大頭症、過成長の原因が神経幹細胞の分化誘導の異常で説明可能であるかについて検討を試みた。

図１　大脳皮質の発生



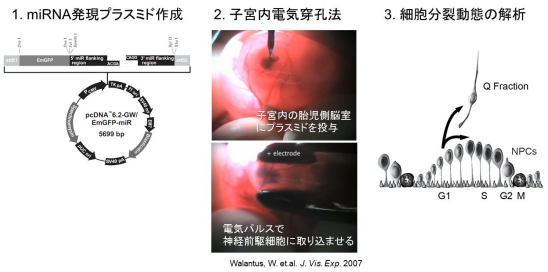


図２　研究の流れ

1. NSD1 タンパク発現を RNA 干渉で減少させることが可能なプラスミドを作成する。
2. プラスミドを子宮内電気穿孔法で胎児側脳室周囲の神経幹細胞に取り込ませる。
3. 神経幹細胞の細胞分裂動態を解析する。

３．研究の方法

(1) NSD1 遺伝子に対する RNA 干渉を生じるプラスミドの作成

NSD1 タンパク発現量を減少させることが可能なマイクロ RNA（miRNA）を以下の方法で設計した。オンラインの RNAi Designer（Life Technologies 社）を使い、NSD1 遺伝子のコーディング配列特異的に RNA 干渉を起こすことが想定される配列を複数同定した。それらをもとに相補的な DNA 配列を合成し、pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR プラスミド（図２1.）に挿入した（pcDNA-NSD1RNAi）。本プラスミドは CMV プロモータを持つことから哺乳類細胞において RNA を発現可能である。プラスミドを培養細胞（PC12）にトランスフェクトし、NSD1 タンパクの発現量が減少するかをウエスタンブロット法で確認した。確認後、テトラサイクリン応答エレメント（TRE）下に挿入したプラスミドを作成した（pTRE-NSD1RNAi）。

(2) 子宮内電気穿孔法による pTRE- NSD1RNAi の神経幹細胞への投与

pTRE-NSD1RNAi プラスミドを胎生 12-16 日のマウス胎児側脳室周囲の神経幹細胞に以下の子宮内電気穿孔法により投与した。まず妊娠マウスにペントバルビタールを腹注して全身麻酔状態とし、マウスを仰向けに寝かせ腹部を 70%エタノールで消毒した。腹部の皮膚を正中線に沿って 2 cm ほど切開し、腹壁を白線に沿って切開する。中央に穴があいた滅菌ガーゼをあてがい子宮角を腹腔外に露出させる。ガラスキャピラリーよりプラーで作成したインジェクション針を用いて胎児側脳室に上記プラスミド溶液（2.5 μg/μl、インドシアニングリーンで着色）を 1-2 μl 注入した（図２ 2.）。滅菌された専用電極で胎児頭部に電気パルスを加えた（図２2.）。すべての胎児を処置後、腹壁をナイロン糸で抱合し、皮膚切開部をステープラーで閉鎖した。覚醒するまで体温が下がらないよう注意して観察し、覚醒後 SPF 環境で飼育し、1-2 日後に以下の実験に供した。

(3) BrdU を用いた Cumulative Labeling 法による細胞周期各相の測定

午前 9 時から DNA 合成（S）期のトレーサーBrdU を母マウスに腹注した。胎児前脳を摘出、4%パラフォルムアルデヒド（PF）で固定後パラフィン包埋し、厚さ 4 μm の連続冠状断切片を作成した。抗 BrdU 抗体（AbD Serotec 社）、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学染色後、神経幹細胞のうち BrdU 陽性細胞の割合（Labeling Index、LI）を計測した。LI の増加率から神経幹細胞の細胞周期長を計算し、NSD1 タンパク発現量の減少が神経幹細胞の細胞周期調節に与える影響の解析を試みた。

４．研究成果

研究実施計画に従い、NSD1 遺伝子に対する RNA 干渉を生じる pTRE-NSD1RNAi プラスミドを 5 種類作成した。プラスミドを培養細胞（PC12）にトランスフェクトし、それらのうち一つが NSD1 タンパクの発現量の減少させうることをウエスタンブロット法で確認した。

そこで本プラスミドを子宮内電気穿孔法により神経幹細胞へ投与し、NSD1 タンパク減少による細胞分裂動態への影響を解析しようと試みた。しかし、別研究（CBP タンパクを神経幹細胞において減少させる研究）より子宮内電気穿孔法自体が胎児発生中大脳壁内のアポトーシスを増加させる傾向を認めたことから、神経幹細胞の細胞分裂動態を正しく解析できない可能性が生じた。そこで、pTRE-NSD1RNAi プラスミドを元にトランスジェニックマウスの作成を試みた。具体的には、作成済みであった pTRE-NSD1RNAi プラスミドをもとに TRE-NSD1RNAi トランスジェニックマウスを作成した。本トランスジェニックマウスは、tet0 を含むテトラサイクリン応答エレメント（TRE）の制御下で、rtTA・ドキシサイクリン共存下で NSD1RNAi 転写産物を発現する。神経幹細胞特異的な発現が知られている nestin タンパクの転写調節領域制御下で rtTA を発現する nestin-rtTA トランスジェニックマウスと上記 TRE-NSD1RNAi トランスジェニックマウスを交配し、ドキシサイクリンを母親に投与することで、特定の時期に神経幹細胞にのみ NSD1 タンパクを減少させることが理論的に可能である。

しかし、受精卵へのマイクロインジェクション法により作成を試みたが、TRE-NSD1RNAi トランスジェニックマウスを１ラインしか得ることができなかった。さらに、得られた 1 ラインのオスマウスをメスの nestin-rtTA ト

ランスジェニックマウスと交配し、胎生 12 日の胎児を孕む母マウスにドキシサイクリンを 2 日間経口投与、胎児を摘出の上大脳壁からタンパクを抽出して NSD1 に対するウエスタンブロット解析を行ったが、NSD1 タンパクを減少させることができなかった。

原因として、何等かの理由で NSD1RNA1i 転写産物が非誘導的に発現し、NSD1 タンパク発現量の減少が受精卵の発生に悪影響を与えた可能性、ゲノムに挿入された NSD1RNA1i フラグメントが発生に重要な遺伝子発現を何等かのメカニズムで障害した可能性などが考えられた。

今後別の方法で仮説検証可能な遺伝子改変マウスを作成する計画を進めている。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 3 件）

① Mitsuhashi T, Takahashi T. Proliferation and differentiation characteristics of neural stem cells during course of cerebral cortical histogenesis. Congenit Anom (Kyoto). 査読無（invited review）, 56, 2016, 6-11. doi: 10.1111/cga.12117.

② 高橋孝雄，三橋隆行.〔長期予後と成人後の医学的問題〕小児神経疾患　日本医師会雑誌、査読無（invited review）, 143, 2015, 2135-8.

③ 高橋孝雄，三橋隆行．大脳皮質の発生と難治性てんかん　脳と発達、査読無（invited review）, 46, 2014, 187-19.

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 2 件）

① 藤村公乃，三橋隆行，高橋孝雄．ガイドラインと最新文献で学ぶ小児科学レビュー２０１６－１７【疾患　編】10. 神経・筋疾患，精神疾患（精神行動異常、心身症）４４）脳形成異常，総合医学社，東京，429-435，2016.

② 三橋隆行，高橋孝雄．脳回形成メカニズムと大脳皮質内神経細胞数の変動について．続・イメージからせまる小児神経疾患 50 ―症例から学ぶ 診断・治療プロセス―，診断と治療社，東京，87-8，2015.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ
http://www.med.keio.ac.jp/research/faculty/42/

６．研究組織

(1)研究代表者
三橋　隆行（MITSUHASHI TAKAYUKI）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：80338110

(2)研究分担者
小崎　健次郎（KOSAKI KENJIRO）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：30234743

高橋　孝雄（TAKAHASHI TAKAO）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：80171495