

Title	CBP機能異常が脳皮質発生に与える影響に関する研究
Sub Title	Effects of loss of function of CBP on cerebral cortical histogenesis
Author	大門, 尚子(Daimon, Hisako)
Publisher	
Publication year	2016
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2015.)
JaLC DOI	
Abstract	近年、塩基配列を介さない遺伝子発現調節メカニズムであるエピジェネティック機構の異常が先天奇形症候群の病態として注目されている。本研究ではRubinstein-Taybi症候群(小頭症, 知的障害)の原因であるヒストンアセチル化酵素CREB結合蛋白(CBP)の機能異常が神経幹細胞の細胞分裂動態を破たんさせ、脳皮質発生を障害する可能性について検討した。その結果、CBPタンパク発現量を減少させた群では対照群と比較して、DNA合成期への進行が促進される可能性が示唆された。 Epigenetic regulations of gene expressions are considered to be putative pathogenic mechanisms underlying various genetic malformation syndromes. In this analysis, we investigated roles of histone acetylase CREB binding protein (CBP) on cell cycle kinetics of neuronal progenitor cells (NPCs) that form murine cerebral cortices. We found that the decreased expression level of CBP in the NPCs led to an increased number of NPCs in the S phase of cell cycle, indicating that CBP might have a role in cell cycle regulation of the NPCs.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2013～2015 課題番号：25860918 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_25860918seika

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：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860918

研究課題名(和文) CBP機能異常が大腦皮質発生に与える影響に関する研究

研究課題名(英文) Effects of loss of function of CBP on cerebral cortical histogenesis

研究代表者

大門 尚子 (DAIMON, HISAKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40627163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、塩基配列を介さない遺伝子発現調節メカニズムであるエピジェネティック機構の異常が先天奇形症候群の病態として注目されている。本研究ではRubinstein-Taybi症候群(小頭症、知的障害)の原因であるヒストンアセチル化酵素CREB結合蛋白(CBP)の機能異常が神経幹細胞の細胞分裂動態を破たんさせ、大腦皮質発生を障害する可能性について検討した。その結果、CBPタンパク発現量を減少させた群では対照群と比較して、DNA合成期への進行が促進される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic regulations of gene expressions are considered to be putative pathogenic mechanisms underlying various genetic malformation syndromes. In this analysis, we investigated roles of histone acetylase CREB binding protein (CBP) on cell cycle kinetics of neuronal progenitor cells (NPCs) that form murine cerebral cortices. We found that the decreased expression level of CBP in the NPCs led to an increased number of NPCs in the S phase of cell cycle, indicating that CBP might have a role in cell cycle regulation of the NPCs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：神経発生

1. 研究開始当初の背景

塩基配列を介さない遺伝子発現調節メカニズムとしてエピジェネティック機構の異常が、中枢神経異常をきたす先天奇形症候群の病態メカニズムとして近年注目されている。エピジェネティクス機構の主要メカニズムとして細胞核のクロマチン構造の変化が重要であり、ヒストン内リジン残基のアセチル化、脱アセチル化により、それぞれ転写が容易な *euchromatin*、転写が困難な *heterochromatin* 構造をとることが知られている。本研究で着目した CREB 結合蛋白 (CBP) はヒストンアセチル基転移酵素 (HAT) であり、CBP 遺伝子のハプロ不全で発症する Rubinstein-Taybi 症候群は小頭症、精神発達遅滞、自閉症を発症することから神経発生への影響が強く疑われているがその詳細なメカニズムは未解明である。

ヒストンのアセチル化は、ヒストン高次構造に変化を生じさせることによりヒストンに巻きつく状態で格納されている DNA を物理的に弛緩させ転写活性を増加させるため、エピジェネティクス機構のなかで最も重要な仕組みと考えられている。ヒストンアセチル化の調節メカニズムとして、前述のヒストンアセチル化酵素 (HAT) と、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDACs) とのバランスが重要であり、現に精神発達遅滞や脳の構造異常を生じる既知の先天性疾患の多くに HAT あるいは HDACs 遺伝子が含まれることが明らかとなっている。

申請者が所属している研究室において、大脳皮質を形成する神経幹細胞内の HDAC 発現量が発生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発見しており (未発表データ)、CBP が持つ HAT 活性の異常が正常な大脳皮質発生プログラムに破たんを生じることによって皮質形成に異常を生じている可能性が高いと予想した。

2. 研究の目的

本研究では、神経幹細胞特異的に CBP 蛋白発現量を減少させたうえで Rubinstein-Taybi 症候群の病態発現メカニズムを解明することを目指して実施した。まず CBP 蛋白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 (図 1)。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検討を加え、Rubinstein-Taybi 症候群に認められる小頭症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を解析した。

1. miRNA 発現プラスミド作成 2. 子宮内電気穿孔法 3. 細胞分裂動態の解析

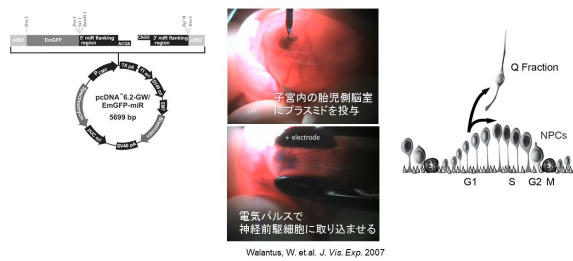


図1 研究の概略

CBP 蛋白発現を 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 (1)。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 (2)。神経幹細胞の細胞分裂動態を解析する (3)。

3. 研究の方法

(1) CBP 遺伝子に対する RNA 干渉を生じるプラスミドの作成

理論上 CBP 蛋白発現量を減少することが可能なマイクロ RNA (miRNA) を設計し、それをもとに哺乳類細胞で産生できるプラスミドを作成した (図 1 1.)。本プラスミドを培養細胞にトランスフェクトしその効果を確認した。

具体的にはオンラインの RNAi Designer (Life Technologies 社) を使い、CBP 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 プラスミドに挿入した (pcDNA-CBPRNAi)。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。pcDNA-CBPRNAi プラスミドを培養細胞 (PC12) にトランスフェクトし、CBP 蛋白の発現量が減少するかを CBP に対する抗体を用いたウエスタンブロット法で確認した。

(2) 子宮内電気穿孔法の実施

pcDNA-CBPRNAi プラスミドを胎生 14 日の胎児側脳室周囲の神経幹細胞に子宮内電気穿孔法により投与した。具体的には、まず妊娠マウスにペントバルビタールを腹注し全身麻酔状態とし、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した。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、ガラスキャピラリーよりプレ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。滅菌された専用電極で胎児頭部に電気パ

ルスを加えた。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観察する。覚醒後 SPF 環境で飼育し、1 日後の胎生 15 日目に以下の実験に供した。

(3) BrdU を用いた Cumulative Labeling 法による細胞分裂動態の解析

午前 9 時から DNA 合成 (S) 期のトレーサー BrdU を胎生時期に応じて母マウスに 2 時間、3 時間おきに腹注した。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。

4. 研究成果

(1) CBP 遺伝子に対する RNA 干渉を生じるプラスミドの作成

理論的に CBP タンパク発現量を減少することが可能な miRNA を RNAi Designer で設計し、5 個の特異的配列を同定した。それらをもとに相補的な DNA 配列を合成、pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR プラスミドに挿入した (pcDNA-CBPRNAi)。プラスミドを培養細胞 (PC12) にトランスフェクトした結果、5 個の配列のうち一つで CBP タンパクの発現量の減少をウエスタンブロット法で確認した (図 2)。

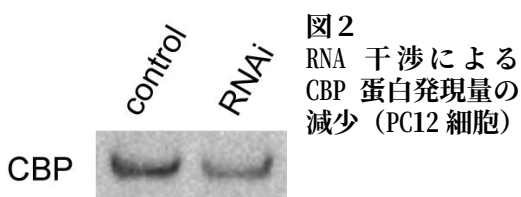


図 2
RNA 干渉による
CBP 蛋白発現量の
減少 (PC12 細胞)

(2) 子宮内電気穿孔法の実施と神経幹細胞の細胞分裂動態の解析

pcDNA-CBPRNAi を方法に記載した手順で胎生 14 日目の胎児側脳室に注入、電気穿孔法で側脳室周囲の神経幹細胞に導入した。翌日胎生 15 日目の朝 9 時に BrdU を母マウスに腹注射し、2 時間後に胎児を摘出の上冠状断切片を作成し、BrdU に対する蛍光免疫組織染色を実施した (図 3)。その結果、電気穿孔法による神経幹細胞の分布、核の上下運動 (interkinetic nuclear migration) に異常を生じなかった。

BrdU の陽性細胞の分布パターンは内側皮質域 (medial cortical zone, MCZ)、外側皮質域 (lateral cortical zone, LCZ) でコン

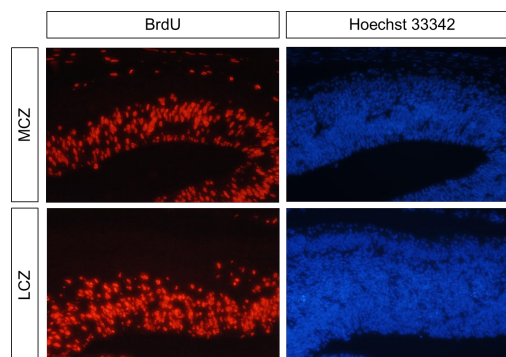


図 3
電気穿孔法後の BrdU 蛍光免疫組織染色写真
MCZ: 内側皮質域 (medial cortical zone)、LCZ: 外側皮質域 (lateral cortical zone)、Hoechst 33342: 対比染色

トロールと比較してほぼ保たれていたが、電気穿孔法によるプラスミド導入がされやすい LCZ で MCZ よりも影響が大きい傾向が認められた (図 4)。

さらに、CBP RNAi 群では対照群と比較して神経幹細胞の細胞分裂動態の変動が大きく、S 期への進行が促進される可能性が示唆された。これらは先行研究と逆の結果となっており、アセチル化ヒストン量が増加した結果 G1 期を制御する蛋白発現が変動した可能性が考えられる。

一方、本研究の限界として電気穿孔法後の大脳壁内のアポトーシスが増加した点が挙げられる (データ未発表)。以上から現在、本プラスミドをもとにトランスジェニックマウスを作成しており、今後 CBP タンパク発現量の減少が神経幹細胞の細胞分裂動態に与える影響と、その後に大脳皮質発生異常につながるのかについて解析を進めている。

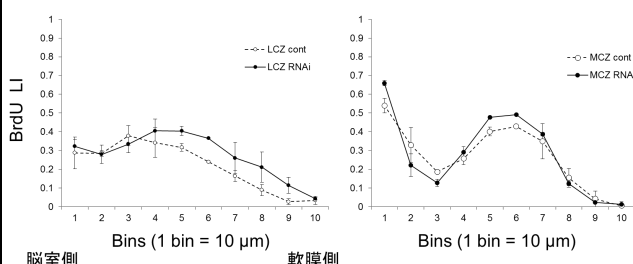


図 4
MCZ および LCZ の BrdU LI
Bins: 脳室に接する横 100 μm 、縦 10 μm の各グリッドごとに LI を測定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔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

大門 尚子 (DAIMON HISAKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40627163