論文の内容の要旨

論文題目

ヒストン脱メチル化酵素 Fbxl11 による神経分化制御機構の解明

(Epigenetic regulation of neural stem cell fate by histone demethylase Fbxl11)

氏名　川上絵理

［背景］

中枢神経系を構成する神経細胞とグリア細胞は、発生過程の決まった時期に神経幹細胞より秩序正しく分化する。この時期特異的な神経幹細胞の分化および増殖は basic helix-loop-helix (bHLH)転写因子などの転写調節と DNA メチル化やヒストン修飾といったエピジェネティック制御機構により厳密にコントロールされている。特にヒストン H3 の特異的リジン残基(K)に対するメチル化/脱メチル化は標的遺伝子発現の ON/OFF を制御し、H3K4、H3K36 のメチル化は遺伝子発現亢進に、対して H3K9、H3K27 のメチル化は遺伝子発現抑制に働いている。これらヒストンのメチル化修飾はヒストンメチル化酵素および脱メチル化酵素により可逆的に制御されている。そのため、ヒストン修飾酵素の生物学的役割を解明することは、神経幹細胞のエピジェネティック状態の一端を明らかとするだけではなく、エピジェネティクスを標的とした疾患治療や再生医療への新しいアプローチの確立に繋がることが期待されている。

これまでにヒストン H3K27 のメチル化に働くポリコーム群タンパク質(PcG)が神経幹細胞の分化運命決定に寄与することが報告されている。PcG 構成因子である Ezh2 および Ring1B は bHLH 因子である Ngn1 の発現抑制を介して神経幹細胞から神経細胞とグリア細胞に分化する時期を調節する (Hirabayashi et al., 2009)。一方でヒストン脱メチル化酵素の神経発生における生理的役割や神経幹細胞の分化制御に対する機能についての報告は少ない。

当研究室では、ヒストン H3K36 の脱メチル化酵素である Fbxl10 が ES 細胞や神経幹細胞に高発現することに着目し、初期発生での機能を調べるために、Fbxl10 欠損マウスを作製した。Fbxl10 欠損マウスは、神経管閉鎖不全に起因した外脳症を発症し、また細胞周期因子 $p19^{ARF}$ や $p16^{Ink4a}$ の発現上昇が確認されたことから、Fbxl10 が神経発生過程における細胞増殖に重要であることが明らかとなった(図 1) (Fukuda et al., 2011)。一方で、Fbxl11 は Fbxl10 と同様に、

H3K36 に対するヒストン脱メチル化酵素活性を持つ jumonji ドメインを有する遺伝子であり、Zinc finger ドメイン、PHD ドメイン、F-box ドメイン、Leucine Rich Repeat といった機能ドメインの配列相同性も非常に高い。また、Fbxl11 は細胞周期因子 p15^{Ink4b}、p27^{Kip1} の発現を抑制することで間葉系幹細胞の増殖と分化を制御することが報告されている (Du J et al., 2012)。このように、Fbxl11 は幹細胞分化に対する Fbxl10 との機能重複の可能性は高いものの、Fbxl11 の個体での生理的機能および神経発生過程での神経幹細胞分化制御における役割についての報告は未だない。

[目的]

Fbxl11 の遺伝子改変マウスを作製し、その生理的機能を解析することで、ヒストンのメチル化修飾による遺伝子発現調節を介した神経分化制御機構を明らかにする。

[方法]

まず、①Fbxl11 レポーターマウスおよび Fbxl11 欠損マウスを作製し、Fbxl11 の発現動態および初期発生における機能解析を行った。次に、②神経特異的 Fbxl11 欠損(Emx1-Cre; Fbxl11$^{flox/flox}$, 以下 Fbxl11 cKO)マウスを作製し、神経発生における Fbxl11 の生理的機能について組織学的解析を行った。③Fbxl11 欠損による神経発生異常の原因を探るべく、Fbxl11 cKO マウス由来神経幹細胞に対して DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。

[結果および考察]

①初期発生における Fbxl11 の機能解析

まず Fbxl11 の発生段階における発現動態を解析するために、Fbxl11 レポーターマウス (Fbxl11$^{+/lacZ}$)を作製した(図 2)。その結果、Fbxl11 は胎生期 9 日目(E9) から E16 にかけて全身に広く発現しており、特に、神経分化時期(E14) では大脳皮質に偏局在することが観察された(図 3)。これらの発現パターンから Fbxl11 は神経分化期に大脳皮質に発現しており、Fbxl11 が Fbxl10 同様に神経発生過程において機能する可能性が強く示唆された。

次に発生過程における Fbxl11 の生理的機能を解析するために、Fbxl11 欠損マウスを作製した(図 2)。Fbxl11 欠損マウスは E8 以降から成長遅延を呈し、E12 前後で胎生致死となった(図 4)。組織学的解析の結果、E10 の Fbxl11 欠損マウスにおいてアポトーシスマーカー(Cleaved Caspase 3: CC3)の発現上昇、および M 期マーカー(Phospho Histone 3: PH3)の発現減少が有意に観察された。さらに、 Fbxl11 欠損マウスにおいて細胞周期停止に関わる p21^{Cip1} の発現が有意に上昇していたことから、Fbxl11 は p21^{Cip1} の発現を抑制し、初期発生に

おける細胞増殖に寄与することが示唆された。以上、Fbxl11 レポーターマウスおよび Fbxl11 欠損マウスによる解析結果により、Fbxl11 は初期発生に必須の因子であり、p21 をはじめとする細胞周期に関与する因子の発現調節を介して細胞増殖を制御していることを明らかにした(Kawakami et al., 2014)。

② 神経発生における Fbxl11 の機能解析

Fbxl11 欠損マウスは胎生致死を示したため、中枢神経系での Fbxl11 の機能を解析するのは困難だった。そこで、神経特異的 Fbxl11 欠損 (Fbxl11 cKO)マウスを作製した。Fbxl11 cKO マウスは生後 10 日(P10)において大脳皮質細胞層が顕著に減少しており、P15 前後で全個体が死亡した。大脳皮質における免疫組織学的解析の結果、胎生期の E14 および E17 において神経幹細胞マーカー(Sox2, Nestin)および神経細胞(Tbr1)の発現動態に異常は認められなかったが、生後の P0 および P10 の Fbl11 cKO マウスでは Tbr1 の発現は有意に減少していた。また、出生後よりアポトーシスマーカー(CC3)の発現が亢進しており、P10 ではアストロサイトマーカー(GFAP) およびミクログリアマーカー(Iba1)の発現上昇も観察された(図 5)。これらの結果より、胎生期から生後の大脳皮質において、Fbxl11 の欠損により神経細胞の細胞死が誘発され、アストログリアやミクログリアが過剰に集積されていることを見出した。このことは Fbxl11 欠損による生後での早期死亡の原因の一つと考えられた。

胎生期の神経幹細胞の増殖および分化能に対する Fbxl11 の役割を調べるため、Fbxl11 cKO マウス大脳皮質由来神経幹細胞を採取し、ニューロスフェアアッセイによって評価した。その結果、Fbxl11 cKO 由来ニューロスフェアは増殖できず、培養 7 日において細胞が完全に消失することが見出された(図 6)。培養 4 日目の Fbxl11 cKO 由来ニューロスフェアでは神経幹細胞で陽性である bHLH 因子(Hes5)の発現低下および、神経細胞マーカー(Tuj1)、細胞周期因子($p21^{Cip1}$) の発現が有意に上昇することが示された。この結果より、Fbxl11 欠損神経幹細胞では異常な神経分化亢進を示し、それに伴い細胞死が引き起こされており、Fbxl11 が細胞周期因子等の発現調節を介して神経幹細胞の増殖や分化に寄与することが示唆された。

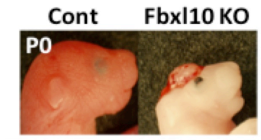
in vivo の組織学的解析では、Fbxl11 cKO マウス大脳皮質において胎生期の神経幹細胞の動態は正常であったのに対して、*in vitro* のニューロスフェアアッセイでは Fbxl11 欠損により神経幹細胞が細胞死を呈し、消失するという一見相反する結果が得られた。この矛盾に対して、*in vivo*(胎生期)の大脳皮質が低酸素に保たれていることから、「*in vitro* での培養条件下では *in vivo* と比較して高酸素環境であるため、このような酸素濃度の違いにより Fbxl11 cKO 神経幹細胞の細胞死が引き起こされる」という仮説を立てた。この仮説の証明のため、低酸素下(5% O_2)で神経幹細胞を培養したところ、Fbxl11 欠損神経幹細胞のニューロスフェア形成能が回復した(図 6)。このことから、通常酸素下において Fbxl11 は神経幹細胞の生存を正に制御するこ

とが明らかになった。現在、酸化ストレスと Fbxl11 との機能の関連性について詳細に検討している。

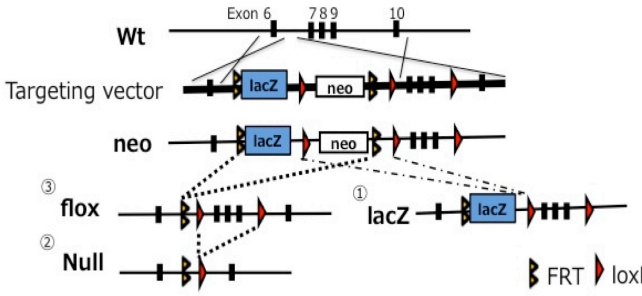
③神経幹細胞における Fbxl11 の下流遺伝子の網羅的探索

Fbxl11 cKO マウスにおける神経幹細胞の増殖異常、分化異常の原因となる標的遺伝子およびシグナル経路を探索するため、Fbxl11cKO マウスとコントロール（Emx1-Cre; Fbxl11$^{+/flox}$）マウス由来神経幹細胞に対して、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、神経幹細胞における Fbxl11 の標的遺伝子を抽出した。

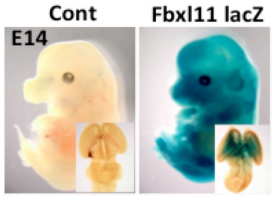
今後、Fbxl11 がヒストン修飾を介して標的遺伝子の発現調節を行っているかクロマチン免疫沈降法(ChIP)により検討する予定であり、ヒストン脱メチル化酵素 Fbxl11 による神経幹細胞分化制御の分子メカニズムの解明へと繋げていきたい。



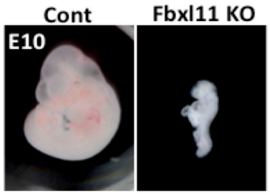
(図1)Fbxl10 欠損マウスは外脳症を呈して死亡する(Fukuda et al.,2011)



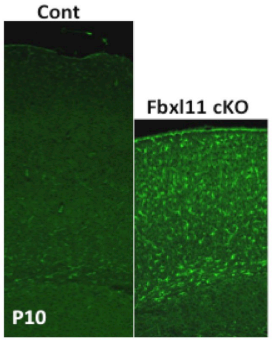
(図2) Fbxl11 ターゲッティングストラテジー



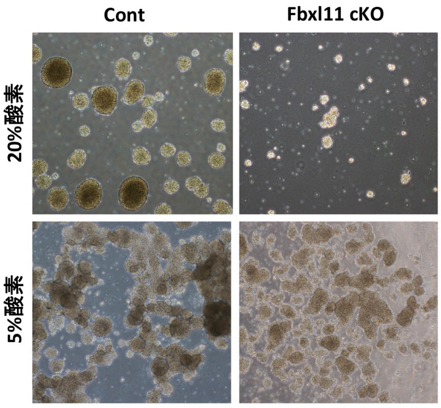
(図3) Fbxl11 は大脳皮質に局在する



(図4) Fbxl11 はE10以降で胎生致死を示す



(図5) Fbxl11 cKO大脳皮質ではアストログリアが異常増加する



(図6)低酸素下においてFbxl11 cKO由来神経幹細胞の生存率が回復