

氏名（本籍）	池上大悟	（東京都）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	甲第137号	
学位授与年月日	平成22年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	Molecular analysis for brain epigenetic mechanisms in aging and exogenous stimuli	
論文審査委員	主査	教授 鈴木 勉
	副査	教授 辻 勉
	副査	教授 亀井 淳三

論文内容の要旨

緒言 加齢や様々な環境因子により中枢神経系における可塑的な変化が誘導される。近年、その原因として長期的なゲノム情報発現機構であるエピジェネティクスによる遺伝子発現制御が大きく注目されるようになってきている。エピジェネティクスの機構として DNA メチル化やヒストン修飾等が挙げられ、これらの変化は遺伝子機能に長期的な影響を与える可能性を有する。DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティック修飾は体細胞分裂に際して安定に伝承されると同時に、発生・分化に際しダイナミックに変化する機構として知られてきた。環境因子によるエピジェネティック変化の誘導は環境適応に役立つ一方、その異常は各種疾患に関与することが明らかにされつつある。近年のゲノム解析技術の飛躍的な発達によって、加齢や種々の環境因子によって変動する因子の網羅的な mRNA 発現レベルでの解析は散見されるようになってきている。しかしながら、根本の分子メカニズム、特に長期的変動の機構は未だ明らかにされていない。

一般に、中枢神経系は、神経細胞と、アストロサイトやオリゴデンドロサイトなどのグリア細胞といった多様な細胞集団で構成されており、ヒトの脳内では神経細胞の 10 倍ものグリア細胞が存在している。グリア細胞の中でも大部分を占めるアストロサイトは、神経終末部より遊離した神経伝達物質の取り込み、代謝、血液-脳関門の形成、神経細胞周辺のイオン環境の保持、神経細胞への栄養補給、神経栄養因子の分泌といった神経細胞の保護ならびに機能維持を行うことで神経伝達を円滑化させることが明らかとなっている。神経変性疾患や脳卒中などの病態時には、アストロサイトはその細胞形態を変化させ、アストログリオーシスと呼ばれる現象を引き起こす。このアストログリオーシスはアストロサイトの機能を大きく変化させ、神経細胞の保護や障害後の神経系の再生過程に影響を与えると推察されている。一方、細胞侵襲や感染、細胞障害によって集積し、活性化するミクログリアは、細胞修復に関わるばかりでなく、神経細胞死、神経細胞の成長をはじめ神経可塑性や脳のホメオスタシスの維持に関わっている。正常な成熟脳では、ミクログリア

がラミファイドミクログリアとして観察される。この形態は一般的に、休止あるいは不活性化状態と捉えられているが、一定の間隔で整然と配置し、かつ長い突起を周りに巡らせている組織像から、脳のセンサー細胞として、積極的に機能していると考えられる。一方、脳が多発性硬化症、エイズ脳症、脳梗塞、アルツハイマー病、パーキンソン病などの疾患に陥ったとき、ミクログリアは活性化され、MHC (major histocompatibility complex) クラス II、補体受容体 CR-3 など免疫関連分子を強く発現する。しかし、これらの疾患では、脳在住の活性化ミクログリアと末梢から浸潤してきたマクロファージを区別できなくなるため、活性化ミクログリア・マクロファージと表現される。これらの細胞は互いに活性化し合い、さらに血液性成分や免疫系細胞と相互作用することで、二次的、三次的に活性化し、様々な神経障害性物質および炎症性サイトカインを産生する。また、このときの活性化ミクログリアは抗原提示細胞として働くことも示唆されている。

さらには、近年、成体哺乳類の海馬歯状回や側脳室下帯において自己複製能と多分化能を有し、かつ分離培養が可能な神経幹細胞が存在することが明らかとなった。この神経幹細胞は、未分化のままでも増殖することのできる自己複製能と、神経細胞、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトといった中枢神経を構成している 3 種類の細胞を産生する多分化能といった特徴を有していることが知られている。この神経幹細胞は主に、側脳室下帯 (subventricular zone: SVZ) や海馬歯状回顆粒細胞層 (subgranular zone) に豊富に存在し、脳高次機能の調節に密接に関与していると考えられている。実際に、感覚・運動刺激が豊富な環境 (enriched environment) で飼育することにより神経新生が促進され、それに伴い記憶・学習能力が向上することが報告されている。

一方、依存性薬物であるメタンフェタミンは、日本において最も乱用が問題となっている覚せい剤の一つであり、慢性的に乱用することでその薬物の感受性が増大する逆耐性現象を引き起こすことが知られている。げっ歯類においても覚せい剤による逆耐性の形成が認められ、他の依存性薬物とは異なる「不可逆的な神経可塑的变化」を引き起こす病態モデルとして用いられている。こうした、加齢や外因性刺激に応答して引き起こされる神経可塑的变化を伴った脳高次機能の変動の要因を特定するためには、神経-グリア細胞間の相互作用のみならず、神経幹細胞を含めたこれら三者間の相互作用を総合的に理解し、検討を行う必要があると考えられる。

そこで本研究では、老齢マウス、enriched environment にて飼育を行ったマウスならびに覚せい剤の逆耐性を形成したマウスを用いて、脳内エピジェネティクス機構の解析を中心に、分子生物学的ならびに免疫組織学的な検討を行い、加齢や外因性刺激による脳高次機能変化の実態について解明することを試みた。

老齢マウスにおける海馬神経新生抑制におけるエピジェネティクス解析

はじめに、老齢マウスの海馬領域において、神経芽細胞や移動神経前駆細胞に特異的に発現する **doublecortin** 陽性神経細胞の免疫活性の変化について免疫組織化学染色法に従い検討した結果、若齢マウスと比較し、老齢マウスの海馬歯状回領域において **doublecortin** 陽性神経細胞の消失が認められた。また、**doublecortin** ならびに **NeuroD mRNA** の発現量の変化について検討したところ、若齢マウスと比較し、老齢マウスの海馬において有意な減少が認められた。そこで、老齢マウスの海馬領域における **doublecortin** ならびに **NeuroD** 遺伝子プロモーター領域における、ヒストン修飾の検討を行った。その結果、**doublecortin** 遺伝子プロモーター領域において、転写活性化調節を行う、ヒストン H3 lysine 4 (H3K4) のトリメチル化の低下ならびに転写抑制調節を行う、ヒストン H3 lysine 9 (H3K9) のトリメチル化の増加が認められた。また、ヒストンのメチル化や脱メチル化を調節する酵素群について、**mRNA** の発現量の変化を検討したところ、有意な変化は認められなかった。一方、免疫組織学的染色法により、ミクログリアのマーカーである **ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1)**、ならびにアストロサイトのマーカーである **glial fibrillary acidic protein (GFAP)** について検討を行ったところ、若齢マウスと比較し、老齢マウスの海馬歯状回領域において **Iba1** 陽性ミクログリアならびに **GFAP** 陽性アストロサイトの増加が認められた。これまでに、**IL-1 β** による神経新生の抑制が認められるといった報告があることから、グリア細胞の増加によるサイトカインの産生増加を想定し、老齢マウスの海馬における **IL-1 β mRNA** の発現変化を検討したところ、著明かつ有意な増加が認められた。そこで、胎生 14 日のマウスより、神経幹細胞を分離培養し、**IL-1 β** を処置したところ、細胞の生存率には有意な変化が認められなかったが、神経幹細胞の分化誘導を行ったところ、神経のマーカーである **β III-tubulin** の減少が認められた。さらに、**IL-1 β** を処置した神経幹細胞において、**NeuroD mRNA** の発現量の変化について検討したところ、有意な減少が認められた。さらに、**NeuroD** 遺伝子プロモーター領域におけるヒストン修飾についても検討を行ったところ、老齢マウスと同様に、転写抑制調節を行うヒストン H3K9 のトリメチル化の増加が認められた。

以上のことから、老齢マウスの海馬領域において、グリア細胞の活性を伴った **IL-1 β** 産生の増加によるエピジェネティックな機構を介した神経新生の抑制が引き起こされる可能性が示唆された。

Enriched environment による海馬内エピジェネティック修飾による BDNF 産生増加と神経新生

Enriched environment にて飼育したマウスの海馬歯状回において、**NeuroD** ならびに

doublecortin 陽性細胞の著明な増加が認められた。こうした条件下、BDNF の発現変化について検討を行ったところ、enriched environment 飼育 4 週目の海馬歯状回において、通常飼育群と比較して、BDNF mRNA 量の有意な増加が認められた。こうした BDNF の発現増加についてトランスクリプトーム解析ならびにエピジェネティクス解析を行ったところ、BDNF Promoter 3 (P3) ならびに P6 にて、H3K4 のメチル化の増加、ならびに BDNF P4 における H3K9 のメチル化の減少、さらには、BDNF P3 ならびに P4 における H3K27 のメチル化の減少が認められた。また、こうした条件下、DNA メチル化酵素、ヒストンを修飾するメチル化酵素ならびに脱メチル化酵素、miRNA 発現に変化は認められなかった。以上の結果より、enriched environment による海馬における BDNF mRNA 発現量の増加を伴った神経新生は、BDNF のプロモーター領域におけるヒストンのメチル化の変化によって一部調節されている可能性が示唆された。

側坐核領域におけるエピジェネティック修飾を伴ったケモカイン受容体 CCR2 の発現変化による methamphetamine 誘発自発運動促進作用の制御機構

Methamphetamine の間欠投与により、自発運動促進作用に対する逆耐性が形成された。このような条件下において、中脳辺縁ドパミン神経の投射先である側坐核領域において、サイトカインである GDNF と Cys-Cys ケモカインファミリーの受容体である CCR2 の mRNA 発現量の著明かつ有意な増加が観察された。また、ChIP on PCR 法を用いて、ヒストン修飾の変動について解析を行った結果、methamphetamine 投与群の側坐核領域の CCR2 遺伝子プロモーター領域において、遺伝子発現の亢進を示す H3K4me3 量の有意な増加が認められた。このように本研究において、methamphetamine の投与により、遺伝子エピジェネティクス修飾の首座に位置する DNA ヒストン修飾を伴った CCR2 遺伝子の発現変動が認められたことから、methamphetamine の自発運動促進作用に対する逆耐性形成ならびに維持には、エピジェネティック修飾により制御される長期的な遺伝子制御が関与しているものと考えられる。

結語

本研究の結果より、加齢、豊富な環境および覚せい剤の繰り返し投与により、脳内エピジェネティクス修飾を介した特定の遺伝子発現の長期的発現制御および発現促進が引き起こることが明らかとなった。こうした「加齢および環境刺激における後生的な遺伝子修飾の重要性」の理解は、多様な生命現象とその異常としての疾患のメカニズムの本質的な理解を可能にするものであり、「神経可塑性」を分子レベルで理解するために、まさに必要不可欠なものとなる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

加齢や環境因子等により中枢神経系における可塑的变化が誘導され、その原因として長期的なゲノム情報発現機構、すなわちエピジェネティクスによる遺伝子発現制御が最近注目されてきている。エピジェネティック機構として DNA メチル化やヒストン修飾等が挙げられ、これらの変化は遺伝子機能に長期的な影響を与える可能性がある。DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティック修飾は体細胞分裂に際して安定に伝承されると同時に、発生・分化に際しダイナミックに変化する機構として知られている。環境因子によるエピジェネティック変化の誘導は環境適応に役立つ一方、その異常は各種疾患に関与することがある。近年のゲノム解析技術の飛躍的な進歩により、加齢や種々の環境因子によって変動する因子の網羅的な mRNA 発現レベルでの解析も始まっている。しかしながら、長期的変動の機構は未だ明らかにされていない。そこで、申請者は、老齢マウス、enriched environment (EE) で飼育したマウス、ならびに覚せい剤誘発自発運動促進作用に対する逆耐性を形成したマウスを用いて、脳内エピジェネティック機構の解析を中心に、分子生物学的ならびに免疫組織学的な検討を行い、加齢や外因性刺激による脳高次機能変化を解明することを試み、以下のような研究成果を挙げている。

第一に、老齢マウスの海馬領域において、神経芽細胞や移動神経前駆細胞に特異的に発現する doublecortin (DCX) 陽性神経細胞の免疫活性の変化について検討している。その結果、若齢マウスと比較し、老齢マウスの海馬歯状回領域において DCX 陽性神経細胞の消失が認められた。また、DCX ならびに移動神経前駆細胞から神経細胞への分化、ならびに成熟過程において特異的に発現する NeuroD mRNA の発現量についても検討し、老齢マウスの海馬において有意な減少が認められることを明らかにした。そこで、老齢マウスの海馬領域における DCX ならびに NeuroD 遺伝子プロモーター領域におけるヒストン修飾の検討を行っている。その結果、DCX 遺伝子プロモーター領域において、転写活性化調節を行うヒストン H3 lysine 4 (H3K4) の trimethyl (me3) の有意な低下ならびに転写抑制調節を行うヒストン H3 lysine 9 (H3K9) me3 の有意な増加を発見している。一方、ミクログリアのマーカーである ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1) ならびにアストロサイトのマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) について検討を行った。その結果、若齢マウスと比較して老齢マウスの海馬歯状回領域では Iba1 陽性ミクログリ

アならびに GFAP 陽性アストロサイトが有意に増加していることを見いだした。最近、神経新生が IL-1 β により抑制されることが明らかにされていることから、老齢マウスの海馬における IL-1 β mRNA の発現変化を検討し、有意に増加することを見いだしている。そこでさらに、胎生神経幹細胞を分離培養し、IL-1 β を処置したところ NeuroD mRNA の発現量が有意に減少することを明らかにしている。この結果を受け、NeuroD 遺伝子プロモーター領域におけるヒストン修飾を検討し、H3K9me3 が有意に増加することを発見している。以上のことから、老齢マウスの海馬領域において、グリア細胞の活性を伴った IL-1 β 産生増加によるエピジェネティック機構を介した神経新生の抑制が引き起こされる可能性が示唆されている。

次に、EE による海馬内エピジェネティック修飾による BDNF 産生増加と神経新生についても検討を行っている。EE にて飼育したマウスの海馬歯状回において、NeuroD ならびに DCX 陽性細胞の著明かつ有意な増加を見いだしている。こうした条件下で BDNF の発現変化についても検討しており、EE 飼育 4 週目の海馬歯状回において、通常飼育群と比較して BDNF mRNA 量が有意に増加することを明らかにしている。この BDNF の発現増加についてもエピジェネティクス解析を行ったところ、BDNF プロモーター 3 (P3) ならびに P6 において、H3K4me3 の有意な増加ならびに BDNF P4 において H3K9me3 の有意な減少、さらには、BDNF P3 ならびに P4 における H3K27me3 の有意な減少を見いだしている。以上の成果より、EE による海馬における BDNF mRNA 発現量の増加を伴った神経新生は、BDNF のプロモーター領域におけるヒストンのメチル化の変化によって一部調節されている可能性を示唆している。

Methamphetamine の間欠投与により、自発運動促進作用に対する逆耐性が形成されたマウスの側坐核領域において、GDNF ならびに CCR2 の mRNA 発現量の有意な増加が認められている。また、ChIP on PCR 法を用いて、ヒストン修飾の変動について解析を行った結果、methamphetamine 投与群の側坐核領域の CCR2 遺伝子プロモーター領域において、遺伝子発現の亢進を示す H3K4me3 量の有意な増加を見いだしている。このように methamphetamine の自発運動促進作用に対する逆耐性形成ならびに維持には、エピジェネティック修飾により制御される長期的な遺伝子制御が関与していることを明らかにした。

本論文の成果より、加齢、豊富な環境および覚せい剤の繰り返し投与といっ

た現代社会が抱える問題により、脳内エピジェネティック修飾を介した特定の遺伝子発現の長期的発現制御および発現促進が引き起こされることを明らかにしている。こうした「加齢および環境刺激における後生的な遺伝子修飾の重要性」の理解は、多様な生命現象とその異常としての疾患のメカニズムの本質的な理解に多いに貢献するものであり、「神経可塑性」を分子レベルで理解するために、まさに必要不可欠なものとなると考えられる。

本論文は正確に記載されており、疾病をエピジェネテックスの視点から解析し、医療現場にも多くの示唆を与える内容であり、貢献度も高い。したがって、本論文は博士（薬学）の学位論文として相応しいものであると判断した。