

神経損傷後のクロマチン立体構造の変化

島根大学 医学部医学科 発生生物学

藤田 幸

【 背景 】

脊髄損傷や頭部外傷などにより障害を受けた場合、神経機能の回復の程度は限定的で元通りの機能を取り戻すことはしばしば困難である。障害を受けた神経機能を回復するためには、破綻した神経回路の再構築が必要である。障害後、切断を免れた神経軸索は新しい側枝を伸長し、損傷部を回避した迂回路を形成することで、再び標的細胞への情報伝達を可能にする。このように再編成された神経回路は、代償性神経回路とも呼ばれ、一部の機能回復に寄与することが、近年の研究からわかってきた。代償性神経回路形成過程では発生期の神経回路形成と同様の段階を経て形成される。すなわち、はじめに過剰数の側枝が伸長し、標的細胞と結合して回路に組み込まれた側枝のみが残り、余分な側枝は退縮あるいは変性によって取り除かれるというステップを経て、精密な神経回路が再構築される (Nakanishi, Fujita et al., 2019, Cell Death Dis)。

中枢神経回路が形成される過程では、多数の遺伝子が、時間軸、空間軸に従って変動する。このことから、多様な遺伝子発現の変化が障害後の神経回路の修復を制御し、病態の回復過程に寄与する可能性がある。

【 目的 】

複数の遺伝子発現変動を包括的に調節する仕組みとして、ヒストンアセチル化やDNAメチル化などのエピジェネティックな制御が重要であることが知られている。これまでに私たちは、ヒストン修飾の変化が損傷後の神経細胞の生存や維持に重要であることを示してきた (Fujita et al., 2015, PONE; Fujiwara, Fujita et al., 2016, Transl Psychiatry; Zhang, Fujita, et al., 2018, Cell Death Disなど)。ヒストンアセチル化のような直鎖状のゲノムに対するエピジェネティクス制御機構が神経細胞の生存、維持に重要であることは、国内外の多くのグループから数多く報告されている。また、ヒストン修飾のみならず、核内空間におけるクロマチンの空間的な配置やクロマチンの立体的な構造変化が包括的な遺伝子発現調節に重要であることが、次世代シーケンサーを用いた解析から明らかになってきた。そこで本研究では、中枢神経損傷から神経回路の修復過程で、必要な遺伝子を適切に発現させるメカニズムを明らかにするため、エピジェネティックな解析を進めた。

【 方法 】

運動機能を司る皮質脊髄路が再編成される過程では、はじめに過剰数の側枝が脊髄内で伸長し、標的細胞と結合して回路に組み込まれた側枝のみが残り、余分な側枝は退縮や変性に

よって取り除かれるというステップを経て神経回路が完成する。皮質脊髄路の細胞体が存在する大脳皮質第V層の神経細胞の発生過程においても同様に、軸索の伸長、シナプス形成、刈り込み、の一連の過程が精密な神経回路形成を担うことが報告されている。そこで、脳皮質第V層の細胞を特異的に蛍光標識し、セルソーターを用いて蛍光標識された細胞を特異的に回収する手法を用いる計画をたてた。神経細胞は脆弱であり、解析可能な状態で細胞自体を回収することが困難であったため、神経細胞の核をGFP蛍光標識し、回収した (Sada, Fujita et al, 2020, Cell Death Dis)。クロマチンの立体的な構造制御が破綻することで、神経回路の修復及び神経機能の回復過程にどのような影響を及ぼすか明らかにするため、野生型マウス、およびクロマチン構造制御機構の破綻したマウスから神経細胞の核を回収し、発現変動遺伝子を探索した。

【 結果 】

大脳皮質第V層の細胞にCreを発現するマウス (*Rbp4-Cre*)と、核膜タンパク質であるSUN1のC末端にGFPを付加したマウス (*R26-CAG-LSL-Sun1-sfGFP-myc*) (Mo, et al., 2015, Neuron) を交配し、大脳皮質第V層細胞の核膜をGFPラベルしたマウスを作成した。このマウスの脳切片を作成し、実際に大脳皮質第V層の細胞の核がGFPラベルされたことを確認した (図1)。そこで、このマウスの大脳皮質を回収し、超遠心機を用いて核を分画した。得られた核のうち、GFP陽性の核をセルソーターで単離し、RNA-seq解析サンプルを調整した。

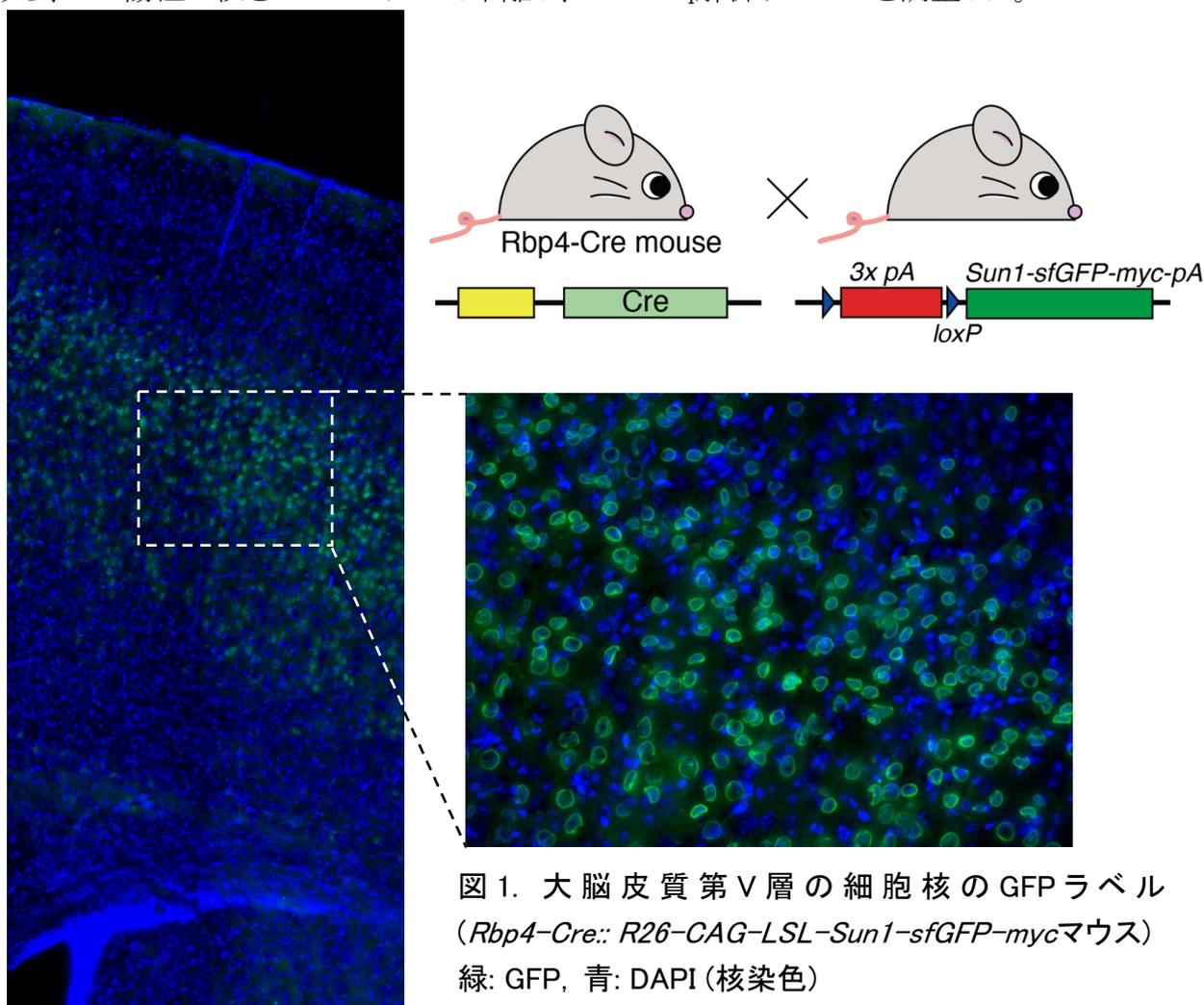


図1. 大脳皮質第V層の細胞核のGFPラベル (*Rbp4-Cre::R26-CAG-LSL-Sun1-sfGFP-myc*マウス)
緑: GFP, 青: DAPI (核染色)

RNA-seq解析により、発現変動遺伝子を探索した結果、317の発現増加遺伝子と49の発現減少遺伝子が検出された（図2）。以上から、クロマチンの立体的な構造制御機構は、神経障害後の神経回路の再編成に関わる遺伝子発現制御に寄与する可能性がある。

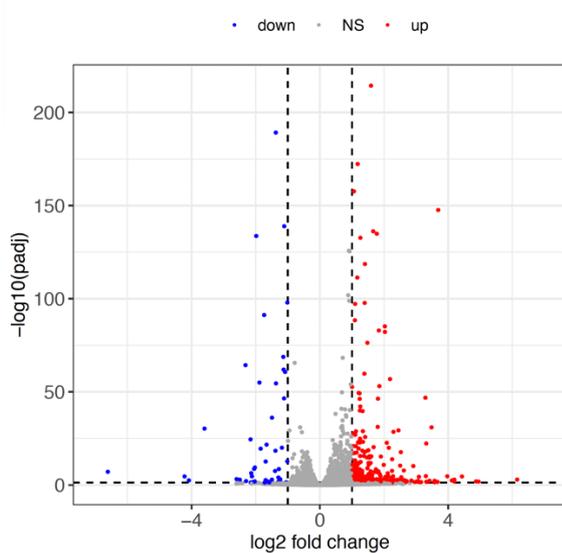


図 2. RNA-seq 解析による発現変動遺伝子の volcano plot:

x 軸は、右側が発現量が増加した遺伝子、左側が発現量が減少した遺伝子を示す。y 軸は上に行くほど統計的有意性が高い遺伝子を示す。

【 考察 】

近年の次世代シーケンサー解析の進歩や普及により、CTCFやコヒーシンの因子によるクロマチンの立体的な構造制御機構の重要性が明らかになってきた。これら因子の協調的な働きにより、ループ形成、TAD (topologically associated domain)、コンパートメントと呼ばれる階層的なクロマチン構造は、神経障害後にどのように変化するのか、また、その変化がどのようにして障害後の神経回路の再編成および病態の増悪に寄与するのか、解析を進めている。

【 謝辞 】

本研究にご支援を賜りました公益財団法人アステラス病態代謝研究会に深く感謝申し上げます。