

酸素濃度が神経分化に及ぼす影響とその分子機構解明

九州大学大学院 医学研究科 基盤幹細胞学分野
堅田 明子

1. 目的・背景

地球上に生育するほぼすべての生物は、進化の過程で空気中の酸素をエネルギー源として利用する代謝経路を獲得している。酸素が少ない環境（低酸素環境）では、解糖系の活性化や血管新生など、さまざまな生理応答を引き起こすことで環境に適応する。この低酸素環境は、実は個体発生のさまざまな組織においても生理的に認められ、胎仔脳内の酸素濃度は1-5%であると報告されている。哺乳類に特徴的な6層からなる大脳新皮質は、高等生物における複雑な脳機能を理解する上で最も重要な領域である。大脳新皮質を構成する様々なサブタイプのニューロンは、胎生期に共通の神経幹細胞（NSC）から、まず深層ニューロンが、次いで脳表層に存在する浅層ニューロンが順次産生され、個々のニューロンが定められた移動パターンを示すことで層構造が形成される（図1）。近年、ESやiPS細胞を用いた神経分化の研究が数多く試みられているが、*in vitro*における分化誘導法では胎生後期に出現する浅層ニューロンの産生効率が著しく低く、神経幹細胞が深層ニューロンから浅層ニューロンへと分化能を変化させるスイッチング機構には未だ不明な点が多い。そこで本研究では、胎仔脳内が一般的な細胞培養で用いられる大気酸素濃度（21%）と比較して、低酸素状態（1-3%）であることに注目し、大脳新皮質の神経発生における酸素濃度の影響を解析、神経幹細胞のニューロン分化におけるスイッチングの分子メカニズムを新たな切り口で解明することを目的とする。

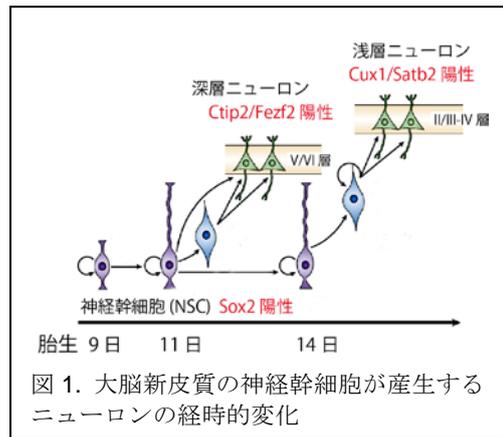


図1. 大脳新皮質の神経幹細胞が産生するニューロンの経時的変化

2. 方法

これまでに、所属研究室では神経幹細胞のアストロサイト分化において、低酸素誘導因子 Hif1 を介した低酸素シグナリングが神経幹細胞の発生に伴う適切な分化能変化に重要であることを報告している（参考文献1）。そこで、本研究ではまず *in vitro* において、**A. 神経幹細胞のニューロン分化における培養時酸素濃度の影響を解析**する。ES細胞、もしくは胎生11日齢のマウス脳より単離したNSCを異なる酸素濃度（2%：低酸素濃度、もしくは21%：通常大気酸素濃度）で培養、ニューロンへの分化誘導を施した後、各神経細胞層に特異的なマーカー遺伝子の発現を定量PCRや免疫組織化学的手法を用いて解析することで、酸素濃度がニューロン分化に与える影響を解析する。次に、動物個体を用いた *in vivo* での実験として、**B. 飼育時酸素濃度と大脳新皮質の層構造構築への影響を解析**する。妊娠マウス、もしくは帝王切開にて得られる新生仔マウスを異なる酸素濃度：大気酸素濃度21%（胎児脳内では~3%）、医療用酸素チャンバーの濃度40%（胎児脳内では~7%）、80%（胎児脳内では~20%）で飼育し、大脳新皮質の層形成への影響を各層特異的なマーカー遺伝子の発現を指標に解析する。これまでに報告の少ない、酸素濃度が脳発生に与える影響について、個体レベルで解明する。

最後に、ニューロン分化におけるスイッチングの分子メカニズムを解明するため、アストロサイト分化において重要であった転写因子 Hif1 のニューロン分化における機能解析を行うとともに、**C. 培養時の酸素濃度変化に応じて変動するヒストン修飾酵素を同定し、ニューロン分化の制御における機能を解析**する。ヒストンのメチル化修飾は、遺伝子の発現制御に重要なエピジェネティック因子の一つである。所属研究室では、これまでにエピジェネティクス制御として、DNAのメチル化研究が精力的に行われてきた（参考文献2）。そこで、本研究では新たにヒストンのメチル化修飾に注目し、神経幹細胞の発生に伴う分化能変化における新たな制御機構を探索する。

3. 結果

A. ニューロン分化誘導効率と培養時酸素濃度の影響

まず、酸素濃度 2% (低酸素濃度)、もしくは 21% (通常大気酸素濃度) において、ES 細胞のニューロン分化を誘導し、産生されるニューロンのサブタイプを定量 PCR にて経時的に解析した (図 2)。その結果、NSC のマーカーである Sox1 遺伝子や、発生の初期に発現が認められる深層ニューロン特異的遺伝子 Fezf2 の発現は培養時の酸素濃度によらず、分化誘導の 4-6 日後から発現が確認され、10-12 日後に最大となった。すなわち、ES 細胞におけるニューロン分化の誘導効率は培養時の酸素濃度に依存しないことが示唆された。一方、後期の深層ニューロンに特徴的な Ctip2 や、浅層ニューロンに特徴的な Cux2、アストロサイトのマーカー遺伝子である GFAP 等の発現は、通常培養と比較して低酸素培養で優位に上昇し、また時期的にも早い段階から発現が認められることが明らかとなった (図 2)。すなわち、*in vivo* において観察される発生の進行に伴う NSC の分化能のスイッチングが *in vitro* においては、低酸素条件下において、効率的に再現できることが明らかとなった。

次に、胎生 11 日齢のマウス胎仔脳より単離した NSC を用いて同様の解析を行った。胎生 11 日齢の NSC は一般に Ctip2 陽性の深層ニューロンへと分化する。しかし、この NSC を 2 日間酸素濃度 2%、もしくは 21% で培養した後ニューロン分化を誘導したところ、低酸素培養では Satb2 陽性のニューロンへの分化効率が上昇することがわかった。すなわち、単離神経幹細胞においても、ES 細胞と同様に低酸素培養では NSC の発生進行に伴う性質変化が効率よく誘導でき、NSC の分化能スイッチングに酸素シグナルが必須であることが明らかとなった。

B. 飼育時酸素濃度と大脳新皮質の層構造構築への影響を解析

次に、酸素濃度がマウスの個体発生に与える影響を解析するため、妊娠マウスを異なる酸素濃度で飼育した後、発生が進んだ胎仔において大脳新皮質の層構造を層特異的マーカー遺伝子 Satb2/Ctip2 の発現を指標に解析した。E11.5 日齢の妊娠マウスを通常大気中 (胎仔脳内における酸素濃度: ~3%)、もしくは高酸素チャンバーを用いて酸素濃度 80% (胎仔脳内: ~20%) で E17.5 日齢まで飼育した後、胎仔を帝王切開にて取り出し、大脳新皮質の構造を解析した。その結果、通常は E17.5 日齢では浅層ニューロンである Satb2 陽性細胞 (図 3: 灰色) は Ctip2 陽性 (図 3: 白色) の深層ニューロンの上位に配置され、綺麗な層構造が観察されるのに対して、高酸素濃度チャンバーで飼育した胎仔では Satb2 陽性のニューロン産生が通常と比べて著しく減少し、深層と浅層の境界が明確にならないことが明らかとなった。

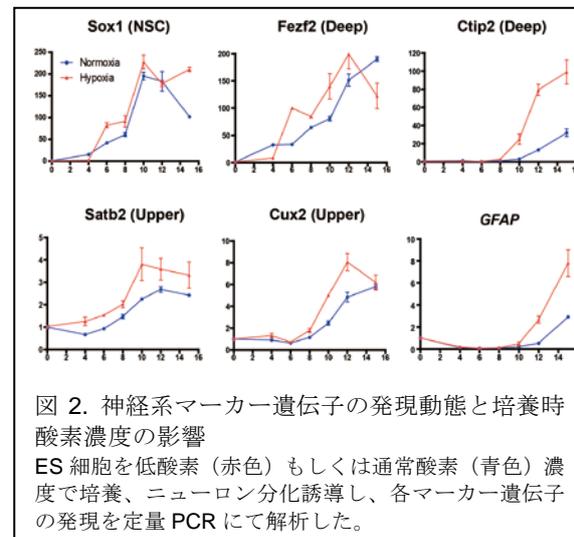


図 2. 神経系マーカー遺伝子の発現動態と培養時酸素濃度の影響
ES 細胞を低酸素 (赤色) もしくは通常酸素 (青色) 濃度で培養、ニューロン分化誘導し、各マーカー遺伝子の発現を定量 PCR にて解析した。

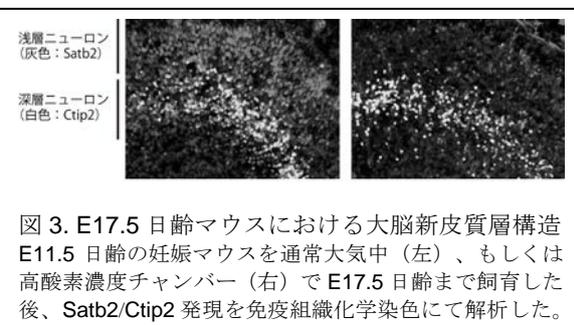


図 3. E17.5 日齢マウスにおける大脳新皮質層構造
E11.5 日齢の妊娠マウスを通常大気中 (左)、もしくは高酸素濃度チャンバー (右) で E17.5 日齢まで飼育した後、Satb2/Ctip2 発現を免疫組織化学染色にて解析した。

C. ニューロン分化のスイッチングにおける分子機構

ニューロン分化におけるスイッチングの分子機構を解明するため、まずアストロサイトの分化能獲得に重要であった転写因子 Hif1 α のニューロン分化における機能を解析した。

胎生 10 日齢のマウス胎仔脳より単離した NSC において、shRNA 配列を用いて Hif1 α の発現減弱を誘導した後、酸素濃度 2% で培養、ニューロン分化を誘導した。その結果、Hif1 α の発現減弱ではコントロールと比較して Satb2 陽性ニューロンへと分化する細胞の割合が減少した。すなわち、Satb2 の遺伝子発現を転写因子 Hif1 α が直接制御する可能性が示唆される。

次に、NSCの適切なニューロン分化のスイッチングに関わる Hif1 α 以外の制御機構を探索した。ヒストンの脱メチル化を担う JmJc ヒストン脱メチル化酵素群は、その酵素活性の発揮に酸素分子を必要とすることが報告されている。また、ヒストンのメチル化修飾は、DNAのメチル化修飾と並び遺伝子発現の制御に重要なエピジェネティック因子の一つである。すなわち、JmJc ヒストン脱メチル化酵素群は、NSCの性質変化を誘導する酸素シグナルの制御因子として機能することが期待される。そこで、ES細胞を用いてニューロン分化を行った際に発現が誘導される JmJc ヒストン脱メチル化酵素の解析を行ったところ、いくつかの候補遺伝子を同定した。現在、これらの遺伝子の発現減弱を誘導し、ニューロン分化への影響を解析している。

4. 考察

本研究課題により、ES細胞や単離NSCのニューロン分化において、通常培養と比較して生体における酸素濃度を模倣した低酸素培養では発生の後期に産生するニューロンへの分化効率が上昇することが明らかとなった。これは、NSCの発生に伴う分化能変化に酸素シグナルが重要な役割を果たすことを示唆する。事実、単離NSCにおける低酸素誘導因子 Hif1 α の発現減弱では、浅層ニューロン Satb2 陽性細胞やアストロサイトへの分化効率が減少する。今後は、低酸素条件下で変化・誘導される転写因子、ヒストン修飾等の解析を糸口として、NSCの分化能スイッチングの分子機構解明を継続する。

また、本研究による *in vivo*での解析において、高酸素飼育した妊娠マウスの胎仔では大脳新皮質の層形成に顕著な異常を認めた。現在の医療現場では、未熟児の呼吸補助を目的として高酸素チャンバーにおける保育が日常的に行われている。しかし、過剰な酸素シグナルはNSCの深層-浅層ニューロン、またグリア細胞への分化を遅延・攪乱させる危険性が考えられる。今後、飼育時の酸素濃度と高酸素刺激の暴露期間を変えることで、酸素シグナルが脳の神経発生に及ぼす影響をさらに詳細に解析する。

5. 参考文献

1. Mutoh T., Sanosaka T., Ito K. & Nakashima K. Oxygen levels epigenetically regulate fate switching of neural precursor cells via HIF1 α -Notch signal interaction in the developing brain. *Stem Cells*. 2012. (30) 561-569.
2. Namihira M., Kohyama J., Semi K., Sanosaka T., Deneen B., Taga T., & Nakashima K. Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells. *Dev Cell*. 2009. (16) 245-255.