

医学科・生命科学科 1 年生ウォーミングアッププログラム開催通知 記入様式

分野等名	基盤幹細胞学分野／統合的組織修復医学分野	電話番号	092-642-6196
担当者名	今村拓也	メールアドレス	imamura@scb.med.kyushu-u.ac.jp

【タイトル】

分子細胞生物学とバイオインフォマティクス的手法によるマウス神経幹細胞制御の新展開

【概要・趣旨】

脳・神経系を構成する主要な細胞種であるニューロンやグリア細胞は共通の神経幹細胞から産生されます。また、長らく再生しないと考えられていた成体の脳にも神経幹細胞は存在し、その神経幹細胞から新しく産生されたニューロンの学習・記憶など脳高次機能における関与が示唆されています。神経幹細胞の分化は、細胞外因子によるシグナルだけでなく、DNA メチル化を含むエピジェネティクス等の細胞内在性プログラムにより時空間的に巧妙に制御されています。今回は、当該研究分野で行われている研究内容・研究手法・ライフスタイルについて紹介し、将来の研究室配属を見据えた文献収集について講義します。

(担当教員 中島欽一・今村拓也・堅田明子)

【開催日時】

平成 27 年 11 月 20 日 (金) 18:00-20:00

(更に深く学ぶ機会は応相談にて提供いたします。)

【開催場所】

病院地区 総合研究棟 6 階 6 2 1 室

【対象】

医学科および生命科学科 1 年生

【受入可能人数】

10 人

【問合せ・参加申込先】

今村拓也 imamura@scb.med.kyushu-u.ac.jp

(今回は春開催のウォーミングアッププログラムと同様の内容です。発展版を希望する学生にも応相談にて別途機会を提供いたしますので、上記にご連絡ください。)

【備考・関係ホームページ】 <http://www.scb.med.kyushu-u.ac.jp>

【添付 PDF】 基盤幹細胞学分野資料後期分.pdf



特定遺伝子のスイッチ ON/OFF を制御する ノンコーディング RNA の新種「pancRNA」を発見！

概要

九州大学大学院医学研究院の今村拓也助教、京都大学大学院理学研究科大学院生（九州大学で研究指導中）の濱崎伸彦らの研究グループは、京都大学大学院理学研究科の阿形清和教授、九州大学大学院医学研究院の中島欽一教授らとの共同研究により、1,000 を超える遺伝子にプロモーターノンコーディング RNA（注1）がペアとなって存在していることを発見しました。

今回発見した研究グループが 1,000 個以上のノンコーディング RNA の新分類を「pancRNA」と名付けました。

本研究成果は、2015 年 1 月 29 日（木）午前 10 時（英国時間）に、英国科学雑誌「Development」のオンライン版に掲載されました。今後、3 月にプリント版（142 巻 5 号）に掲載される予定です。

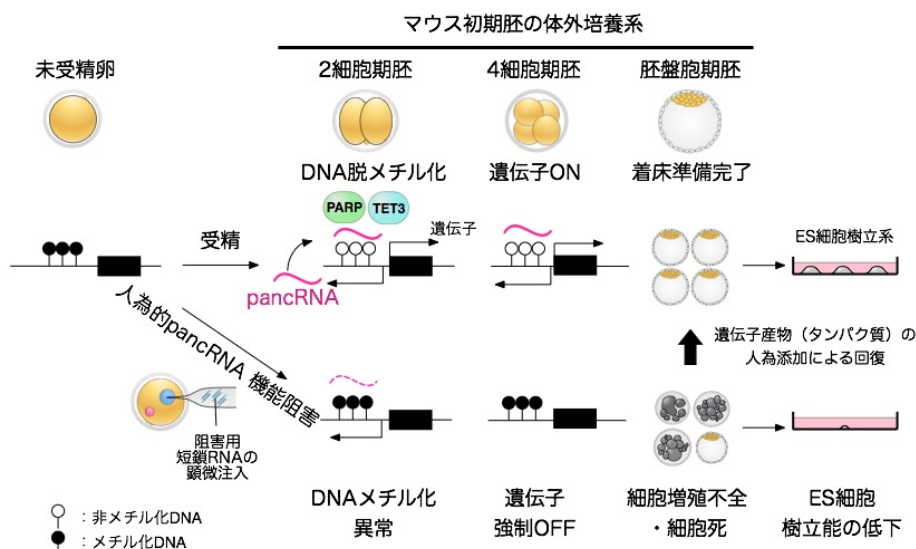
背景

生物の設計図とも言われるゲノム DNA には、タンパク質を作る命令を出す遺伝子の他にも、タンパク質にはならず RNA として機能を発揮する分子群を生み出す情報がコードされています。このような RNA はノン（タンパク質）コーディング RNA と呼ばれており、2006 年には、米国の Craig Mello 博士と Andrew Fire 博士が、短い二本鎖 RNA (<40 塩基)による遺伝子の抑制機構である「RNAi」の発見によりノーベル医学・生理学賞を受賞しています。2001 年にヒトゲノム DNA の配列解読がなされて以来、ビッグデータ解析を基礎とした大規模 RNA 解読が進行しており、その過程において、短い二本鎖 RNA 以外にも多種多様なノンコーディング RNA が見つかってきています。

内容

pancRNA のそれぞれは、特定の遺伝子とペアで機能しうると考えられます。これまで、遺伝子機能を OFF にするノンコーディング RNA はよく知られていました。しかし、pancRNA は、遺伝子機能を ON にするメカニズムに関与することで、ほ乳類個体発生のごく初期から機能していることが明らかになりました。

pancRNA は、プロモーターと呼ばれる、遺伝子の発現制御に重要な働きを担うゲノム領域から生み出されます。例えば、マウスのインターロイキン 17d (*Il17d*) 遺伝子(注2)のプロモーターには pancRNA である *pancIl17d* が存在し、*pancIl17d* は DNA 配列特異的に DNA メチル化(注3)の消去に関与することにより、*Il17d* 遺伝子そのものの発現上昇に寄与する機能があることが明らかとなりました(図)。



(図の説明)

ゲノムには遺伝子（黒ボックス）がコードされており、その上流はプロモーターと呼ばれ、DNA メチル化などによる遺伝子発現調節が可能となっている。遺伝子の一部はこのプロモーター部分から **pancRNA** が生み出されることにより、遺伝子発現を正に調節していることが分かった。**pancRNA** の機能阻害により遺伝子発現は **OFF** になり、胚にさまざまな異常が確認され、**ES** 細胞を含むいわゆる幹細胞が正常に機能しなくなる。このような異常は、**pancRNA** によって制御される遺伝子がコードするタンパク質を培養液中に添加することにより、回復させることができる。

■効果

今回、マウス初期胚は、**pancRNA** の機能を阻害すると、着床に至る前の段階で細胞が自滅する分子機構が駆動してしまうことにより生存できなくなりました。大多数の遺伝子セットは動物種を超えて共通に利用されていますが、遺伝子のスイッチ **ON/OFF** の様式には動物種差が多数認められます。様々な動物種から得られてきた細胞リソースを医療・農畜産応用に結びつける上で、動物種差を理解し、安全性を考慮しながら活用することが必須です。機能性ノンコーディング RNA が、遺伝子機能抑制だけでなく発生の最初期から遺伝子活性化に働くことを発見した本研究成果により、動物種を超えて遺伝子のスイッチ **ON/OFF** を制御する研究展開が見込まれます。

■今後の展開

今後、動物組織や細胞の多様性を生み出す基本メカニズムを解明する研究が促進されることが期待できます。また、再生医療に役立つ細胞における遺伝子スイッチを **ON/OFF** の両面から制御する応用展開が期待できます。

【論文】

著者： Nobuhiko Hamazaki, Masahiro Uesaka, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura

論文名： Gene activation-associated long noncoding RNAs function in mouse preimplantation development.

掲載誌： Development 142 巻 5 号 doi: 10.1242/dev.1169962015 (2015 年 3 月予定)

下記の URL よりオンライン版にアクセスできます：

<http://dev.biologists.org/content/early/2015/01/29/dev.116996.abstract>

【用語解説】

(注1) **pancRNA**

プロモーターノンコーディング RNA (promoter-associated noncoding RNA) の略称。プロモーターと呼ばれる、ゲノム上の遺伝子発現制御領域から作り出される。RNA の多くはタンパク質にデコードされることによりさまざまな生物機能に関わるが、**pancRNA** は RNA のまま遺伝子発現制御に関わる。

(注2) インターロイキン 17d 遺伝子

インターロイキンとは、発見当初、白血球から分泌され、細胞間コミュニケーションに機能する液性因子の総称として名付けられた。免疫系の賦活化に関係するものが多く、ヒト・マウスでは 40 種類以上の遺伝子が存在する。免疫系以外の細胞からの分泌も多数報告されており、多岐に渡る生理活性が認められている。このうち *Il17d* の機能に関する研究は少ないが、他のインターロイキン類の産生を促す可能性が指摘されている。

(注3) DNA メチル化

ゲノムを構成する塩基であるアデニン・グアニン・シトシン・チミンのうち、主にシトシンに起こる化学修飾の一つ。一般に、遺伝子発現制御領域において DNA メチル化が起こると、その遺伝子は発現が抑制される。DNA メチル化パターンは個々の細胞に固有のものであり、例えば iPS 細胞ではその元となる体細胞の DNA メチル化パターンを一部持ち越すことも知られていることから、DNA メチル化パターンを自在に制御することは極めて重要な課題である。

【本研究について】

本共同研究は、科学研究費補助金（挑戦的萌芽研究・新学術領域研究「性差構築の分子基盤」公募研究：研究代表者 今村拓也、グローバル COE プログラム「生物の多様性と進化研究のための拠点形成」：京都大学）からの研究費を受け、新学術領域研究「ゲノム支援」の支援課題の一部として行われました。

【お問い合わせ】

大学院医学研究院 助教 今村 拓也

電話：092-642-6196

FAX：092-642-6561

Mail：imamura@scb.med.kyushu-u.ac.jp



海馬の免疫担当細胞ミクログリアは てんかん発作後の症状を緩和することを発見 ～神経系と免疫系細胞の新たな相互作用を解明～

概要

九州大学大学院医学研究院の中島欽一教授と、大学院医学系学府博士課程4年の松田泰斗らの研究グループは、大阪大学の審良静男教授、奈良先端科学技術大学院大学の河合太郎准教授らとの共同研究により、海馬に存在する免疫担当細胞であるミクログリア（※1）がてんかん発作後に起こる異常ニューロン（神経細胞）新生を抑制することで、てんかん症状を緩和することを世界に先駆けて発見しました。本研究成果は、通常患者と考えられている体内の炎症反応が、実は脳の正常機能維持に重要であることを示しており、てんかん発作発症やそれによって生じる脳機能障害の新たな改善法開発につながることを期待されます。

本研究成果は、2015年3月9日（月）に、国際学術雑誌『Nature Communications』に掲載されました。

背景

てんかんは、ニューロンが過剰な興奮を示すことで誘発される痙攣や意識障害（てんかん発作）を伴う慢性神経疾患です。世界での患者数は5,000万人以上にのぼり、約30%のてんかん患者は、既存の薬剤治療では十分な効果が得られず、発作を繰り返す難治性てんかんを患っています。そのため、これまでとは異なる因子を標的とした治療薬の開発が求められています。

脳の主な細胞を生み出す元となる神経幹細胞（※2）は大人の脳にも存在し、特に海馬における神経幹細胞からの新たなニューロン産生は、学習・記憶に重要であることが示されています。これまでの研究から、側頭葉てんかんの患者及びその動物モデルの海馬では、神経幹細胞から新生されたニューロンは形態的に異常だけでなく、通常とは異なり不適切な場所へと（異所性の）配置されることが報告されていました。また、この異常ニューロンが、異所性の興奮性神経回路を形成することで、てんかん原生及び病態の慢性化並びに海馬依存的な学習・記憶の障害につながるということがわかってきています。

ところで、私たちの体は、免疫システムに代表されるように、異常なもの／不要なものを感じし、それを除去しようとする本質的な仕組みを備えています。しかし、私たちの脳がてんかん発作後の異常ニューロン新生を感じし、それを制御しようとする仕組みを備えているのかどうかはわかっていませんでした。

内容

研究グループは、本来、病原体由来DNAを認識するはずのToll様受容体（TLR）9（※3）遺伝子を欠損したマウスでは、野生型マウスと比較して、てんかん発作依存的な異常ニューロン新生がより増大していることを発見しました。そこで、TLR9遺伝子欠損マウスを用いてこの現象を詳細に調べてみると、TLR9は、てんかん発作後に変性を起こしたニューロンから放出される自己DNAを認識して活性化されることがわかりました。さらに、活性化されたTLR9はミクログリアからの炎症性サイトカインの一種（TNF- α ）の産生を促すことで、てんかん発作依存的な異常ニューロン新生を積極的に抑制しようとしていることを突き止めました。また、薬剤投与によってTLR9遺伝子欠損マウスのてんかん再発作を誘発したところ、野生型マウスと比較して、発作の程度および海馬依存的な学習・記憶障害が重篤化していることがわかりました。

これらのことから脳内の免疫担当細胞ミクログリアは、異常興奮によって変性したニューロンから放出されるDNAをTLR9により認識し、炎症性サイトカインを産生することでてんかん発作依存的な神経幹細胞からの異常ニューロン新生を抑制することにより、てんかん再発作の程度および学習・記憶障害を軽減するために重要な役割を果たしていることが明らかになりました。

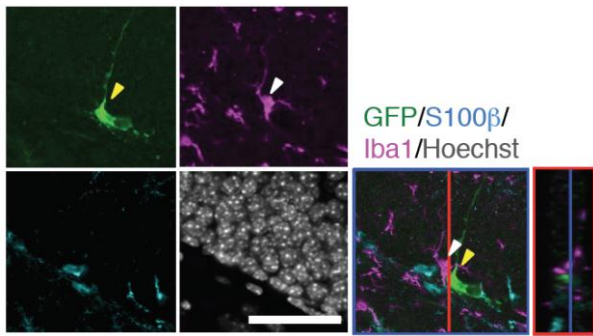


図 1

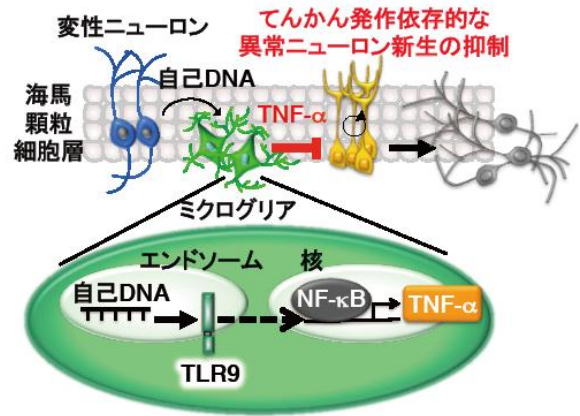


図 2

図 1 :
海馬に存在するミクログリア (紫) は神経幹細胞 (緑) と隣接して存在している。

図 2 :
てんかん発作後、ミクログリアは、てんかん発作によって変性したニューロンから放出される自己 DNA を認識する。この自己 DNA は TLR9 によって認識されることで、TNF- α の転写が促進される。その結果、ミクログリアは TNF- α を細胞外へ放出し、神経幹細胞へと働きかけることで、異常ニューロン新生を抑制する。

■効果・今後の展開

本研究成果で、これまで抑えることが大事だと考えられていた炎症反応が、実は、正常な脳機能維持に重要な役割を果たしていることが明らかになりました。今後は、難治性てんかん患者の脳で TLR9 シグナルが働いているかどうかをさらに詳しく調べることも大切であり、これまで考慮されていなかった自然免疫分子に着目し、炎症反応のバランスを考えた上で、新たなてんかん治療法を開発することが肝要であると考えられます。

【用語解説】

(※1) ミクログリア

中枢神経系に存在する免疫担当細胞。中枢神経系の組織損傷や細菌感染が起こると、TLR シグナルを介して炎症性サイトカインを産生する。

(※2) 神経幹細胞

自己増殖能とともに、ニューロンへの分化能を持った幹細胞。成人でも海馬にその存在が認められ、1 日約 700 個のニューロンを新たに作り出している。

(※3) Toll 様受容体 (Toll-like receptor : TLR)

病原体の構成成分を認識し、炎症性サイトカインを産生する自然免疫 (※4) 受容体。TLR はその一種。

(※4) 自然免疫

病原体の感染後、速やかに病原体由来の分子を認識して病原体を攻撃する仕組み。

【お問い合わせ】

大学院医学研究院 教授
中島 欽一 (なかしま きんいち)
電話 : 0 9 2 - 6 4 2 - 6 1 9 5
FAX : 0 9 2 - 6 4 2 - 6 5 6 1
Mail : kin1@scb.med.kyushu-u.ac.jp



神経発達障害の原因となる遺伝子の新たな機能を発見 ～様々な精神疾患・発達障害の発症メカニズムの解明と新規治療法開発への糸口～

概要

九州大学大学院医学研究院の中島欽一教授、辻村啓太特任助教らの研究グループは、同志社大学の高森茂雄教授、国立精神神経医療センターの伊藤雅之室長、立命館大学の深尾陽一郎准教授らとの共同研究により、自閉症やてんかん、失調性歩行、特有の常同運動(手もみ動作)を主徴とする進行性の神経発達障害レット症候群(※1)の原因遺伝子であり、様々な精神疾患との関連が指摘されているMeCP2遺伝子(※2)が、細胞内の遺伝子発現制御において重要な役割を持つマイクロRNA(miRNA)(※3)の生成過程を促進することを世界に先駆けて発見しました。研究グループは、MeCP2標的miRNAとしてmiR-199aを同定することに成功し、このmiR-199aが種々の精神疾患に深く関わるmTOR(※4)シグナルを正に制御すること、遺伝学的にmiR-199aの発現を減少させたマウスではMeCP2欠損マウスに類似した表現型を示すことを明らかにしました。本研究成果は、正常な脳の発達および機能には、MeCP2によるmiR-199aを介したmTORシグナルの制御が重要であることを示しており、幅広い精神疾患・発達障害の発症原因の解明や新たな治療薬開発につながることを期待されます。

本研究成果は、2015年9月3日(木)午後12時(米国東部時間)に国際学術雑誌『Cell Reports』のオンライン版で公開されました。

背景

発達障害・精神神経疾患は様々な社会問題の一因となることが多く、近年社会的関心が急速に高まっています。しかしながら、これらの精神疾患の発症メカニズムはいまだにほとんど解明されていません。

X染色体上に存在するMeCP2遺伝子の変異は、レット症候群の原因となるだけでなく、自閉症、双極性障害、認知障害、統合失調症患者にも認められることなどから、種々の発達障害・精神疾患に関与することが指摘されています。レット症候群は自閉症スペクトラム障害の一つであり、獲得された運動・言語能力の喪失、精神遅滞などによって特徴づけられる神経発達障害です。MeCP2遺伝子を欠損したマウスではレット症候群患者と同様の表現型を示すことから、レット症候群モデルとしてこのマウスを用いた組織・細胞レベルでの多くの研究が展開されています。例えば、レット症候群患者・モデルマウスの脳組織では、特にニューロンの細胞体サイズの減少及び興奮性シナプス伝達の異常などがみられます。しかし、レット症候群はMeCP2遺伝子の変異が原因で発症することは分かっているものの、発症機序の詳細はわかっていませんでした。

一方で近年の研究により、発達障害を含めた種々の精神疾患の発症には、mTORシグナルの制御不全が深く関与することが示唆されています。最近、レット症候群およびモデルマウスにおいても、このmTORシグナルの減弱がみられることが相次いで報告されました。しかし、MeCP2がどのようにmTORシグナルを制御しているのかは明らかにされていませんでした。

そこで、本研究グループは生化学、分子生物学、遺伝学を用いた実験により、精神・発達障害発症に深く関与するMeCP2の分子作用機序、およびmTORシグナルとの分子相関を明らかにすることで、このMeCP2遺伝子の機能異常が原因で引き起こされる発達障害の発症メカニズムに迫ろうと考えました。

内容

先行研究では、MeCP2はメチル化されたDNAに結合し、標的遺伝子の発現を抑制すると報告されていました。そのため、世界中の多くの研究者により長い間、レット症候群は「メチル化されたMeCP2標的遺伝子の発現異常により発症する」と考えられていました。しかしこれまでにレット症候群の表現型と直結する標的遺伝子発現異常が見出されておらず、MeCP2の変異により重篤な神経機能障害が引き起こされる分子メカニズムを説明することができませんでした。

そこで本研究グループは、これまで知られていない MeCP2 の機能が存在する可能性を考慮し、プロテオミクス技術 (※5) や次世代シーケンス技術 (※6) を用いた網羅的な解析から、MeCP2 が miRNA マイクロプロセッサーである Drosha 複合体 (※7) と会合して、特定の miRNA の生合成 (プロセッシング) を促進することを見いだしました。さらに研究グループは、MeCP2 の下流標的 miRNA として miR-199a を同定し、この miR-199a が異常な興奮性シナプス伝達および興奮性シナプス密度、細胞体サイズの減少などの MeCP2 欠損ニューロンの代表的な各種表現型を改善できることを明らかにしました (図 1)。さらに詳細な解析により、miR-199a は mTOR シグナルを負に制御する因子の発現を抑制することで、最終的に mTOR シグナルの活性化を亢進することをつきとめました。また、この miR-199a の発現を遺伝学的に減少させたマウスを作製したところ、このマウスは MeCP2 欠損マウスに見られる多くの表現型を示すこと、脳において mTOR シグナルの減弱がみられることが明らかになりました。加えて、研究グループは、レット症候群患者の脳組織においても、miR-199a の発現が実際に低下していることを突き止めました。

これらのことから、MeCP2 が特定の miRNA プロセッシングを介して、mTOR シグナルを負に制御する因子群の発現を抑制することで mTOR シグナルを正に制御すること (図 2)、これらの分子メカニズムの破綻 (図 3) によりレット症候群の病態が引き起こされることが示されました。

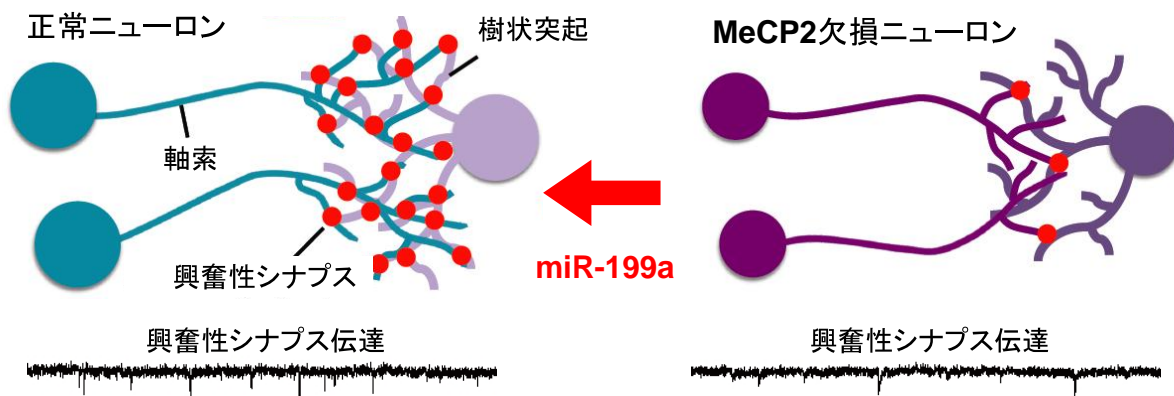


図 1 : miR-199a により MeCP2 欠損ニューロンの表現型が改善される。

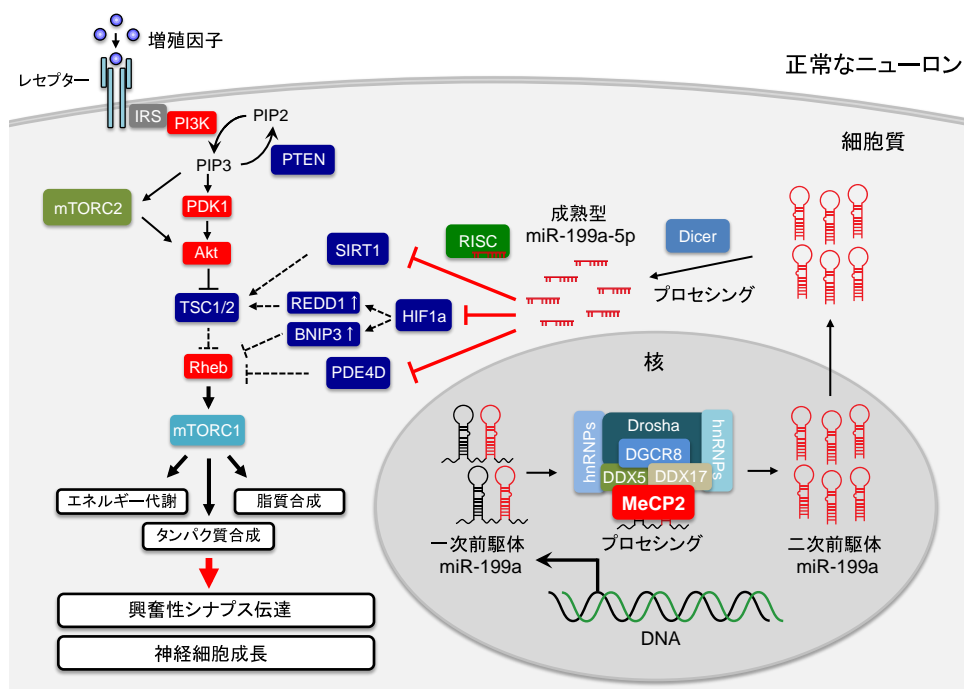


図 2 : 正常ニューロンにおける MeCP2 による mTOR シグナル制御。

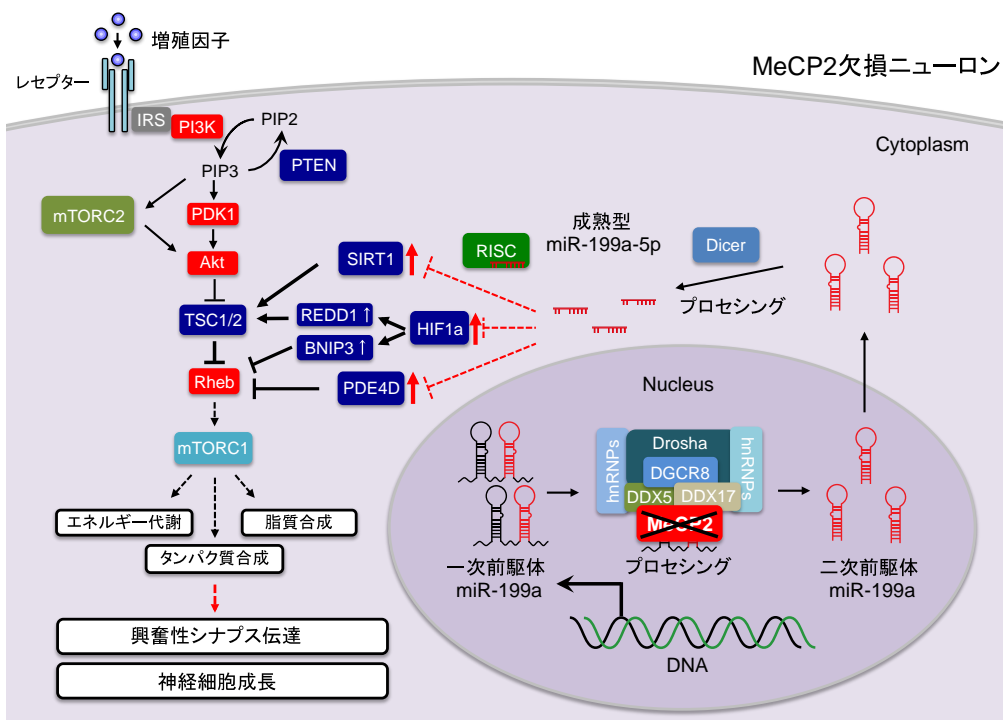


図3：MeCP2欠損によるmiR-199a発現減少を介したmTOR機能低下。

■効果・今後の展開

発達障害を含めた様々な精神疾患の発症に関与するMeCP2とmTORシグナルを結ぶ分子機序が明らかになったことから、本研究成果は、幅広い精神疾患の病態解明や新規治療法の開発へと波及されることが考えられます。さらに今後、本研究グループが同定したMeCP2の標的miRNAを用いた核酸医薬の開発や各種精神疾患の早期診断を補助するバイオマーカーへの応用も期待されます。

【用語解説】

(※1) レット症候群

自閉症やてんかん、失調性歩行、特有の常同運動(手もみ動作)を主徴とする進行性の神経発達障害である。X連鎖優性遺伝病であり、男性は胎生致死で女性のみが罹患する。レット症候群の80-90%にMeCP2遺伝子の変異がみられる。

(※2) MeCP2 遺伝子

X染色体上に存在し、MeCP2タンパク質をコードする。MeCP2はメチル化された遺伝子のプロモーター領域に結合し、標的遺伝子の発現を抑制する転写抑制因子として同定された。MeCP2遺伝子の変異は、レット症候群の原因となるだけでなく、自閉症、双極性障害、認知障害、統合失調症患者にも認められる。

(※3) マイクロRNA(miRNA)

細胞内に存在する長さ18から24塩基程度の1本鎖RNA。数百から数千塩基の一次前駆体(Primary-RNA)として転写され、核内でDrosha複合体にプロセシングされる。

(※4) mTOR

mTORは成長因子、グルコースやアミノ酸によって活性化される細胞内シグナル因子であり、タンパク質合成、脂質合成、エネルギー代謝など様々な生物学的プロセスを制御する。

(※5) プロテオミクス技術

広義には、細胞や組織における、タンパク質の構造や機能を総合的に研究するための技術であるが、ここでは、MeCP2と結合するタンパク質を網羅的に解析する技術(液相クロマトグラフィーとマスペクトロメトリーの併用)を使用した。

(※6) 次世代シーケンス技術

これまでのサンガー法によるものとは全く異なる方法を用いて、DNA 配列を決定する技術。開発企業によりその方法は異なるが、いずれも並行して大量の配列を同時に決定できる。今回はこの技術を野生型と MeCP2 欠損細胞において発現が異なる miRNA を網羅的に同定するために使用した。

(※7) Drosha 複合体

一次前駆体として転写された miRNA を二次前駆体へとプロセシングするタンパク質の複合体。miRNA はその後核外へ移行し、別の酵素によってさらに、18 から 24 塩基程度の成熟 miRNA へとプロセシングをうける。

【お問い合わせ】

大学院医学研究院 教授

中島 欽一 (なかしま きんいち)

電話 : 092-642-6195

FAX : 092-642-6561

Mail : kin1@scb.med.kyushu-u.ac.jp