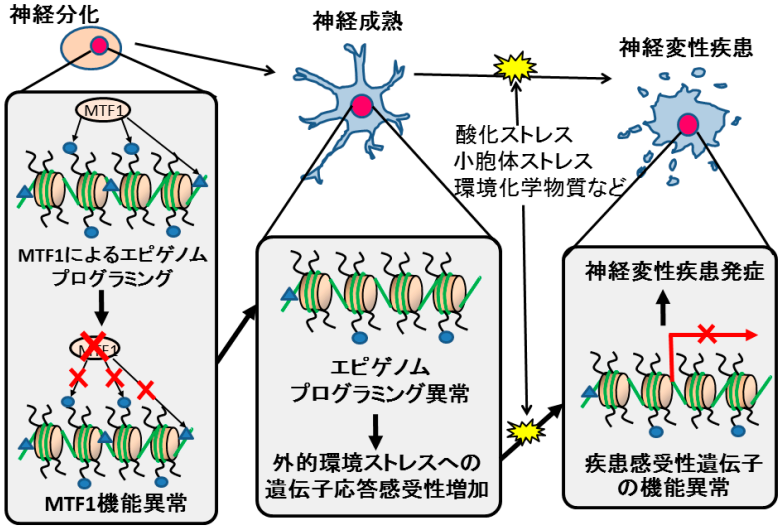
113　金属応答転写因子を介した疾患胎児起源説の解明	栗田　尚佳

【目的】神経変性疾患は、特定の神経細胞が変性、脱落することで起こる難治性の疾患である。また、神経変性疾患において、患者の大多数は家族的な遺伝歴を持たない孤発性である。これまでに、亜鉛、銅などの重金属と神経変性疾患との関わりが示唆されている。孤発性神経変性疾患発症の原因は、未だ解明されていないが、生活習慣、環境、化学物質の曝露などの外的な要因が考えられる。したがって、何らかの環境要因が引き起こす、脳神経における金属代謝異常が、孤発性の神経変性疾患発症に関わっている可能性が示唆される。近年、胎生期の環境要因が生後の疾患発症のリスクとなる「疾患胎児起源説：Developmental Origins of Health and Disease（DOHaD）説」が提唱され、注目されている。DOHaD による次世代影響は、胎生期に受ける環境要因によるエピゲノムプログラミング攪乱によって引き起こされると考えられている。神経変性疾患でも、DOHaD を基盤とした胎児発生期の環境を起源とする疾患発症の可能性が考えられる。以上より、胎生期における金属代謝関連遺伝子のエピゲノム変化の異常が、成人後の孤発性の神経変性疾患発症のリスクとなると考えられる。また、金属応答転写因子（MTF1）は、亜鉛、銅などの必須微量金属による刺激により活性化され、生体内金属恒常性維持に働いている。また、MTF1 は正常な個体発生に必要不可欠と考えられており、以上から MTF1 による金属代謝関連遺伝子の胎生期エピゲノムプログラミング異常が、後天的な疾患発症のリスクとなることが予想される。本研究では、胎生期における金属応答転写因子 MTF1 に注目し、神経分化への影響ならびに MTF1 の神経分化におけるエピゲノムプログラミングの役割を解明し、金属代謝異常を基にした神経変性疾患と DOHaD 仮説との関連を明らかにする。

【方法】神経分化における MTF1 の役割を解明するために、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y を用い、レチノイン酸 10 μM、2% FBS を含む DMEM 培地中で 3 日間分化誘導した。分化後の神経突起伸長を蛍光免疫染色、ならびに MTF1 発現量をウエスタンブロットで解析した。また *MTF1* を siRNA でノックダウンし、同様に神経分化させ、神経突起伸長を評価した。また、金属代謝異常として亜鉛に注目し、金属キレート樹脂を用いて FBS から亜鉛を除去し、亜鉛除去培地を作製した。その培地中で SH-SY5Y を神経分化させ、神経突起伸長ならびに MTF1 発現量を評価した。

【結果】神経分化後の MTF1 発現量は未分化時と比較して減少した。また、*MTF1* をノックダウンした場合、神経突起伸長が抑制された。亜鉛除去培地を用いて、低亜鉛条件下で神経分化誘導した結果、低亜鉛により神経突起伸長の減少、ならびに MTF1 発現量も減少した。以上より、MTF1 は神経分化に関与していること、また低亜鉛条件下の神経突起伸長抑制には MTF1 が関与している可能性が示唆された。

MTF1 による神経発達期エピゲノムプログラミング異常を基盤とした神経変性疾患発症仮説



113. 金属応答転写因子を介した疾患胎児起源説の解明

栗田　尚佳

岐阜薬科大学 医療薬剤学大講座 薬物治療学研究室

Key words：神経分化，DOHaD，亜鉛，MTF1

緒　言

神経変性疾患は、特定の神経細胞が変性、脱落することで起こる難治性の疾患である。また、神経変性疾患において、患者の大多数は家族的な遺伝歴を持たない孤発性である。これまでに、亜鉛、銅などの重金属と神経変性疾患との関わりが示唆されている［1］。孤発性神経変性疾患発症の原因は、未だ解明されていないが、生活習慣、環境、化学物質の曝露などの外的な要因が考えられる。したがって、何らかの環境要因が引き起こす、脳神経における金属代謝異常が、孤発性の神経変性疾患発症に関わっている可能性が示唆される。近年、胎生期の環境要因が生後の疾患発症のリスクとなる「疾患胎児起源説：Developmental Origins of Health and Disease（DOHaD）説」が提唱され、注目されている。DOHaD による次世代影響は、胎生期に受ける環境要因によるエピゲノムプログラミング攪乱によって引き起こされると考えられている［2］。神経変性疾患でも、DOHaD を基盤とした胎児発生期の環境を起源とする疾患発症の可能性が考えられる［3］。以上より、胎生期における金属代謝関連遺伝子のエピゲノム変化の異常が、成人後の孤発性の神経変性疾患発症のリスクとなると考えられる。また、金属応答転写因子（MTF1）は、亜鉛、銅などの必須微量金属による刺激により活性化され、生体内金属恒常性維持に働いている［4］。また、MTF1 は正常な個体発生に必要不可欠と考えられており［5］、以上から MTF1 による金属代謝関連遺伝子の胎生期エピゲノムプログラミング異常が、後天的な疾患発症のリスクとなることが予想される。本研究では、胎生期における金属応答転写因子 MTF1 に注目し、神経分化への影響ならびに MTF1 の神経分化におけるエピゲノムプログラミングの役割を解明し、金属代謝異常を基にした神経変性疾患と DOHaD 仮説との関連を明らかにする。

方　法

1.　神経分化における MTF1 発現量の変化の解析

ヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞を用いて、レチノイン酸 10 μM、および 2% FBS を含む DMEM 培地で 3 日間分化誘導した。分化後の神経突起伸長を、Tuj1 抗体による蛍光免疫染色を行い、IN CELL ANALYZER 2000 を用いて網羅的に解析を行った。また、神経分化後の MTF1 発現量を蛍光免疫染色法、ならびにウエスタンブロット法で解析を行った。

2.　神経分化における MTF1 の役割についての検討

MTF1 の神経分化における役割を検討するために、SH-SY5Y 細胞に MTF1 の siRNA を一過性に導入し、*MTF1* をノックダウンし、3 日間神経分化誘導を行った。上記 1. と同様に、分化後の神経突起伸長を評価した。ノックダウン効率についてはウエスタンブロットで評価した。

3.　亜鉛除去培地の作製

亜鉛除去培地の作製のために、FBS を金属キレート樹脂である、Chelex100 にて一晩攪拌し、亜鉛を除去した。Chelex100 処理後および未処理の FBS を、湿式灰化法で分解し、金属量について原子吸光度法を用いて測定した。Chelex100 処理後の FBS を DMEM 培地に加え、亜鉛除去培地とした。

4.　低亜鉛による神経分化への影響についての検討

亜鉛除去培地を用いて、SH-SY5Y 細胞を神経分化し、分化 3 日後の神経突起伸長と、MTF1 発現量をウエスタンブロット法で解析した。

結　果

1. 神経分化における MTF1 発現量の変化

神経分化段階における MTF1 の発現量の変化はこれまで分かっていない。そこでヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞を用いて、神経分化誘導を行った。すると未分化に比較し、神経突起伸長が認められ、神経分化は上手くできていることを確認した（図 1a)。蛍光免疫染色で神経分化前後の MTF1 発現量を測定したところ、経分化後に発現量の減少が認められ、また未分化では核内に MTF1 は局在しているが、神経分化後には細胞質に局在していることが確認された（図 1b)。また、神経分化後の MTF1 発現量をウエスタンブロット法で測定したところ、未分化と比較し有意な発現量の減少が確認された（図 2)。

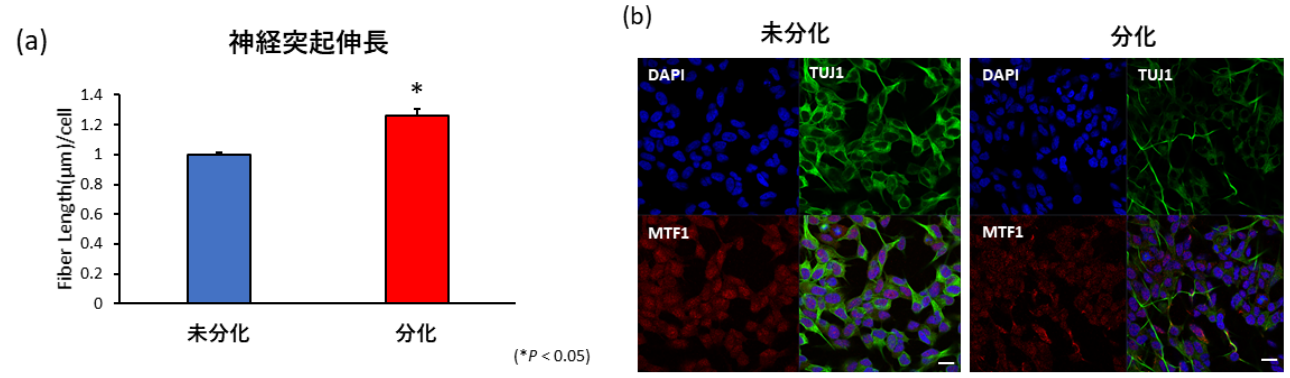


図 1.　SH-SY5Y 細胞における神経分化と MTF1 局在

(a) SH-SY5Y 細胞の神経分化前後の神経突起伸長変化（Student's t-test、*P< 0.05)。

(b) SH-SY5Y 細胞における神経分化前後の MTF1 局在変化（スケールバー：10 μm)。

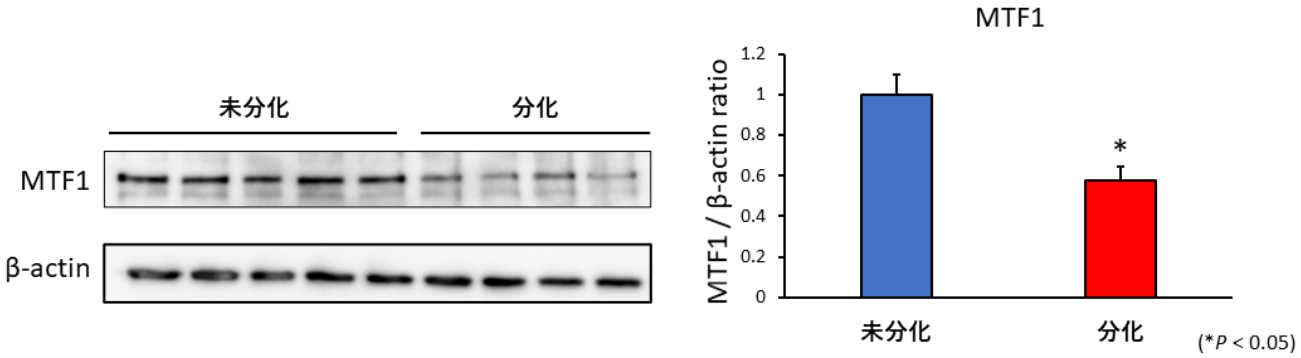


図 2.　SH-SY5Y 細胞における神経分化による MTF1 発現量変化

SH-SY5Y 細胞の神経分化前後の MTF1 発現量変化（Student's t-test、*P< 0.05)。

2. 神経分化における MTF1 の役割の検討

神経分化における MTF1 の役割は全く分かっていない。そこで、*MTF1* の siRNA を用いて SH-SY5Y 細胞に一過性に *MTF1* をノックダウンし、神経分化誘導を行った。*MTF1* のノックダウンは 24 時間後において、上手く行われていることを確認した（図 3a)。この *MTF1* ノックダウン後に神経分化誘導を行ったところ、NC 群と比較し siMTF1 群において、有意な神経突起伸長の抑制が認められた（図 3b)。

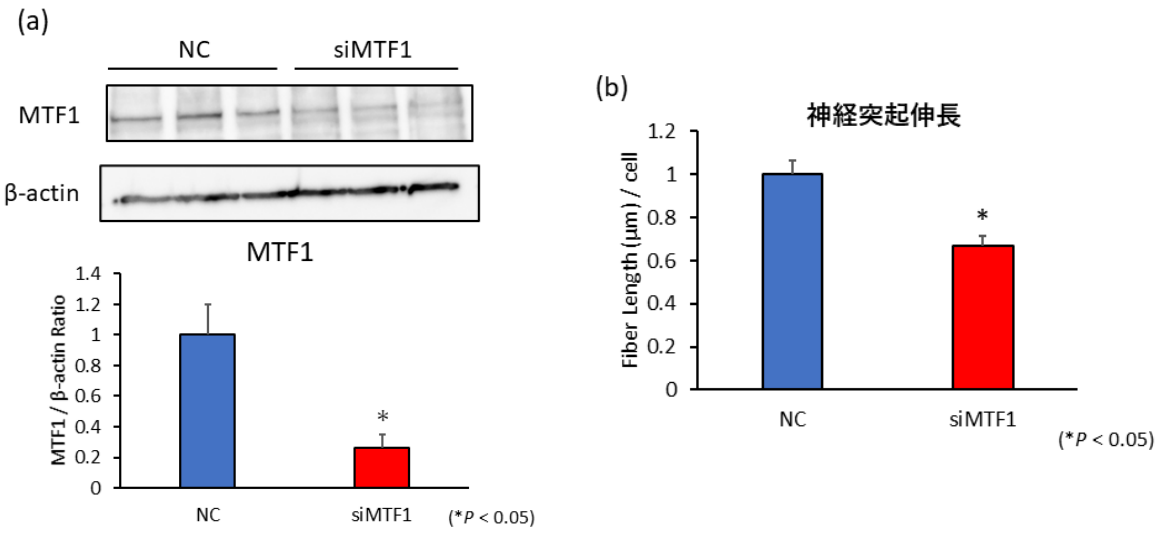


図 3. 神経分化における *MTF1* ノックダウンの影響

(a) SH-SY5Y 細胞の MTF1 siRNA 導入後の MTF1 発現量変化（Student's t-test、$*P < 0.05$）。

(b) *MTF1* ノックダウンによる神経突起伸長への影響（Student's t-test、$*P < 0.05$）。

NC：Negative control。

3. 低亜鉛による神経分化への影響と MTF1 の関与

低亜鉛による神経分化への影響を検討するために、金属キレート樹脂である Chlex100 を用いて FBS 中の亜鉛を除去し、亜鉛除去培地を作製した。この亜鉛除去培地を用いて、SH-SY5Y 細胞を用いて神経分化誘導を行ったところ、低亜鉛条件において、神経突起伸長の減少が認められた（図 4b）。また、その際の MTF1 発現量を測定したところ、低亜鉛条件下においてその発現量は減少していた（図 4a）。

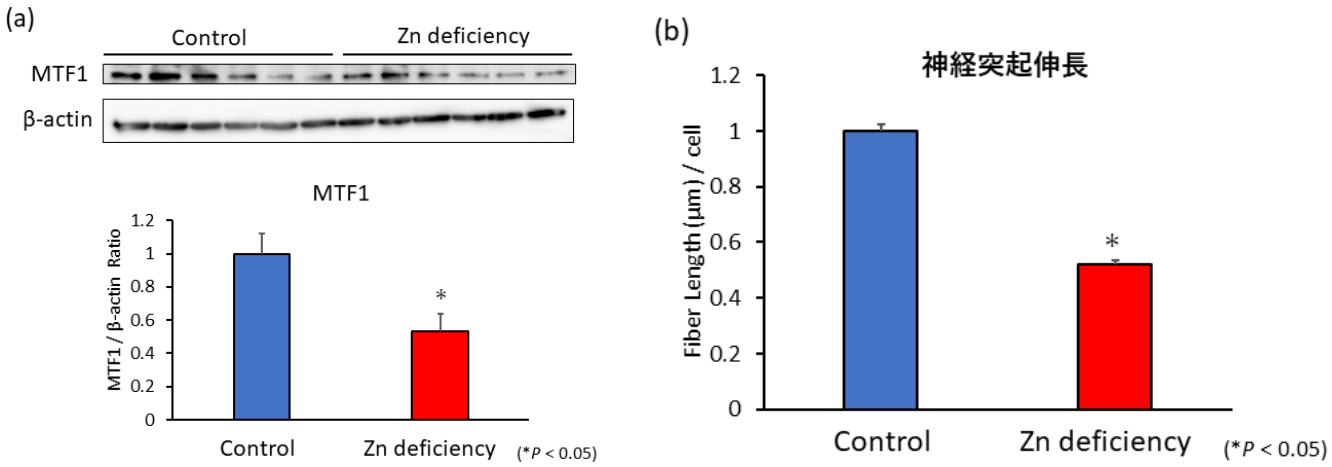


図 4. 低亜鉛の神経分化への影響と MTF1 発現量の変化

(a) 低亜鉛による神経分化における MTF1 発現量変化（Student's t-test、$*P < 0.05$）。

(b) 低亜鉛の神経突起伸長への影響（Student's t-test、$*P < 0.05$）。

考　察

これまでに、発達期の低亜鉛環境がエピジェネティクス変化の攪乱を介して、出生後の疾患発症に影響を及ぼす可能性が示唆されている。また、亜鉛などの恒常性維持に必要な、亜鉛トランスポーターや、亜鉛結合タンパクであるメタロチオネインを制御している、主要な転写因子として MTF1 が報告されている［4]。MTF1 は発生に不可欠であることが分かっているが［5]、その神経分化における役割はほとんど分かっていない。本研究では、胎生期における金属応答転写因子 MTF1 に注目し、神経分化への影響ならびに MTF1 の神経分化におけるエピゲノムプログラミングの役割を解明し、金属代謝異常を基にした神経変性疾患と DOHaD 仮説との関連を明らかにする。この仮説の検証のために、まずは MTF1 の神経分化における役割と、低亜鉛による神経分化の影響、ならびに MTF1 の関与について検討を行った。SH-SY5Y 細胞を用いて、神経分化誘導したところ、未分化に比べて、神経分化後の MTF1 発現量が減少した。このことから、MTF1 の役割として 2 つの可能性が考えられた。1 つ目は未分化状態の維持に必要、2 つ目は神経分化において何らかの役割を持っているということである。前者については、未分化において MTF1 は核内に局在し、分化後には細胞質へと局在が変化していたこともあり、未分化性を保つ遺伝子群の制御に、何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。しかしながら、今回は後者の MTF1 の神経分化における役割を検証することとした。

siRNA で *MTF1* をノックダウンした SH-SY5Y 細胞を神経分化し、神経突起伸長を測定したところ、有意な減少が認められた。したがって、神経分化によって MTF1 発現量は、減少はするものの、神経分化自体には必要であることが示唆された。さらに、神経発達期の亜鉛の影響を検討するために、亜鉛除去培地を作製し、この培地を用いて SH-SY5Y 細胞の神経分化誘導を行った。その結果、低亜鉛によって神経突起伸長は有意に抑制された。加えて、低亜鉛による神経突起伸長抑制時の MTF1 発現量は対照群と比較して、有意な低下を示した。このことより、神経分化には亜鉛が必要であり、その維持には MTF1 が関与する可能性が考えられる。

今後は、MTF1 の神経発達時のエピジェネティクスプログラミングへの関与、または低亜鉛による神経分化への影響におけるエピジェネティクスメカニズムと MTF1 の関与の検討が必要と考えられる。また、さらに神経変性疾患に関連する遺伝子群について、胎生期亜鉛環境異常による、MTF1 を介したエピジェネティクスな攪乱が引き起こされているかの検証も課題である。

文　献

1) Hozumi I, Hasegawa T, Honda A, Ozawa K, Hayashi Y, Hashimoto K, Yamada M, Koumura A, Sakurai T, Kimura A, Tanaka Y, Satoh M, Inuzuka T. Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. J Neurol Sci. 2011 Apr 15;303(1-2):95-9. Epub 2011 Feb 2. PMID: 21292280 DOI: 10.1016/j.jns.2011.01.003.

2) Gillman MW, Barker D, Bier D, Cagampang F, Challis J, Fall C, Godfrey K, Gluckman P, Hanson M, Kuh D, Nathanielsz P, Nestel P, Thornburg KL. Meeting report on the 3rd International Congress on Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). Pediatr Res. 2007 May;61(5 Pt 1):625-9. PubMed PMID: 17413866.

3) Kaus A, Sareen D. ALS Patient Stem Cells for Unveiling Disease Signatures of Motoneuron Susceptibility: Perspectives on the Deadly Mitochondria, ER Stress and Calcium Triad. Front Cell Neurosci. 2015 Nov 19;9:448. PMID: 26635528 DOI: 10.3389/fncel.2015.00448. eCollection 2015. Review.

4) Günther V, Lindert U, Schaffner W. The taste of heavy metals: gene regulation by MTF-1. Biochim Biophys Acta. 2012 Sep;1823(9):1416-25. Epub 2012 Jan 20. Review. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.01.005. PMID: 22289350.

5) Wang Y, Wimmer U, Lichtlen P, Inderbitzin D, Stieger B, Meier PJ, Hunziker L, Stallmach T, Forrer R, Rülicke T, Georgiev O, Schaffner W. Metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) is essential for embryonic liver development and heavy metal detoxification in the adult liver. FASEB J. 2004 Jul;18(10):1071-9. PMID: 15226267.