

令和 3 年 4 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2016～2020

課題番号：16H06527

研究課題名(和文)個性を創発する神経幹細胞におけるエピジェネティックメモリーとその制御

研究課題名(英文)Epigenetic memory in neural stem cells establishing individuality

研究代表者

中島 欽一(Nakashima, Kinichi)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：80302892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 110,700,000円

研究成果の概要(和文)：個性というバリエーションを考えるにあたり、各個体DNA配列の差異に加えて、遺伝的な差異に依らない、エピジェネティックな差異を考慮することは重要である。本研究では、ヒストンアセチル化亢進というエピジェネティック変化によるけいれん感受性増大という「負の個性」の誘発メカニズムの解明とその改善法を開発した。また、細胞の個性変換とも言ふべき「ミクログリアからニューロンへの直接分化転換」のエピジェネティックなメカニズムを明らかにすると同時に、それを利用した新規脳梗塞治療法を創出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個性創発にエピジェネティック修飾が関与すると同時に、自発的運動によりけいれん感受性増大という「負の個性」を完全できることを示した。また脳内の非ニューロン細胞をニューロンへと変換しうるとともに、それを利用した新規脳梗塞治療法を開発した。これらは、種々の神経疾患における治療法開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：It is important to consider the concept of epigenetics for development of the individuality. By focusing on the property of neural stem/progenitor cells (NS/PCs) residing in the adult hippocampus, we identified the mechanism of increased seizure sensitivity in prenatally HDAC inhibitor VPA-exposed adult mice. Furthermore, we found that voluntary exercise can overcome the adverse effects through normalizing VPA-induced transcriptome alterations in NS/PCs. We also elucidated the mechanism whereby a transcription factor NeuroD1 converts microglia into induced neuronal (iN) cells accompanied by global remodeling of microglial epigenetic signature. Furthermore, iN cells were functionally integrated into brain circuits through synaptic connections with other neurons like endogenous neurons. These findings bring us one step closer to developing therapeutic strategies for nerve injury and disease by reprogramming microglia that accumulate at lesion sites into neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 エピゲノム 神経幹細胞 個性 ダイレクトリプログラミング てんかん 脳梗塞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現は、遺伝子 (DNA) 配列だけでなく、DNA 自体の修飾、及びそれが巻きつくヒストンの修飾などによる制御 (エピジェネティクス) の影響を強く受ける。そのため、個性というバリエーションを考えるにあたり、各個体 DNA 配列の差異に加えて、遺伝的な差異に依らない、このエピジェネティックな差異を考慮することは重要である。本代表者は、抗てんかん薬かつヒストン修飾酵素阻害剤であるバルプロ酸 (VPA) に、マウス胎仔が曝露されエピジェネティック状態が攪乱されると、成体になって、神経細胞 (ニューロン) を生み出す元となる、神経幹細胞の数と質が低下するとともに、認知機能低下、すなわち、負の個性発現を示すことを発見していた (Juliandi et al. *Stem Cell Rep* 2015)。これは、個性に立脚する認知能力を DNA 配列改変なしに操作できたことを表しており、ヒトにおける IQ 低下傾向とも一致していた。また、この胎生期 VPA 酸曝露が、産仔マウスのけいれん感受性増大という負の個性を誘発することも見出していた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、エピジェネティック修飾の変化が、どのように個性創発へ影響を及ぼすのかを明らかにし、またその個性が望ましくないものであった場合 (負の個性)、その改善法を開発することである。そこで、本研究では、前述の胎生期バルプロ酸曝露によるけいれん感受性増大のメカニズムの解明とその改善法の開発、及び細胞の個性変換とも言うべき「ミクログリアからニューロンへの直接分化転換」のメカニズムの解明を行った。

3. 研究の方法

1) けいれん感受性は胎仔期 (胎生 12 日から胎生 14 日まで) に VPA 曝露を受けた 12 週齢の成体マウス (VPA マウス) に対してけいれん誘発性の薬剤であるカイニン酸を投与し、評価した。分子基盤解明はマウス脳を用いた免疫組織化学染色や神経幹細胞 (NS/PCs) を用いた網羅的遺伝子発現解析などを行った。さらに、海馬ニューロン新生を亢進することが知られている回し車を用いた自発的運動がマウスのけいれん感受性や NS/PCs の遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。

2) マウスミクログリアに転写因子 NeuroD1 (ND1) を発現させ、免疫染色、電気生理学的解析、RNA-seq 及び ChIP-seq 解析を行った。脳内に ND1 を発現させるレンチウイルスを注入し、in vivo における効果についても検討した。また、中大脳動脈閉塞 (MCAO) により脳梗塞モデルマウスにおける ND1 発現による神経機能回復効果も調べた。

4. 研究成果

1) 胎仔期 VPA 曝露は成体マウスのけいれん感受性を有意に増加させた。免疫組織化学染色の結果、VPA マウスの海馬では、コントロールマウスのそれと比較して、異所性に配置される DCX 陽性の未成熟ニューロンや Prox1 陽性の顆粒細胞の数が多く、異所性ニューロン新生を認めた。次に、各発生段階 (胎生 15 日、生後 5 日、12 週) のコントロールマウスと VPA マウスの脳から NS/PCs を単離し、その遺伝子発現を比較した。その結果、各発生段階におけるコントロールマウスと VPA マウスの NS/PCs 間では数百個の遺伝子に有意な発現変化を認めた。しかしながら、発生段階を通して発現が変化し続けている遺伝子は 1 つだけであった。そこで、異所性ニューロン新生を認めた 12 週齢 VPA マウスの海馬 NS/PCs における遺伝子発現を詳細に検討したところ、CXC motif chemokine receptor 4 (Cxcr4) の発現低下といった細胞移動関連遺伝子群の発現変化を認めた。Cxcr4 は海馬における新生ニューロンの適切な配置のために重要な働きをすることが報告されており、この遺伝子に着目した。また、自発的運動は VPA マウスにおける異所性ニューロン新生とけいれん感受性亢進を抑制し、NS/PCs における Cxcr4 を含む遺伝子群の発現変化を概ね正常化した。さらに、4 週齢の VPA マウスの海馬に Cxcr4 発現レトロウイルスを投与することで、増殖性 NS/PCs において Cxcr4 を補充し、12 週齢で新生ニューロンの移動やけいれん感受性を評価した。その結果、Cxcr4 の過剰発現は VPA マウスにおける異所性ニューロン新生やけいれん感受性亢進を抑制した (図 1)。

2) マウスミクログリアに ND1 を強制発現させることによって、機能的ニューロンへと直接分化転換できることが明らかとなった。また RNA-seq や ChIP-seq 解析により、ND1 は、ミクログリアのヒストンバイバレント修飾 (転写抑制性 H3K27me3 と活性化 H3K4me3 を同時に持つ) 領域に結合し、ニューロン特異的遺伝子群の発現を上昇させることがわかった。また、ミクログリア特異的遺伝子群には、ND1 によって発現が誘導された転写抑制因子が結合し、H3K4me3 修飾を減少させ、H3K27me3 修飾を増加させることで、その発現を抑制することがわかった (図 2)。さらに、ND1 発現ウイルスをマウス線条体に注入することにより、生体内でもミクログリアからニューロンへの直接分化転換が可能であることも明らかとなった。さらに、MCAO 脳梗塞モデル

マウスにおいて、ND1 発現によりミクログリアからニューロンへと分化転換した細胞が、神経機能回復に直接的に寄与していることを明らかにした。

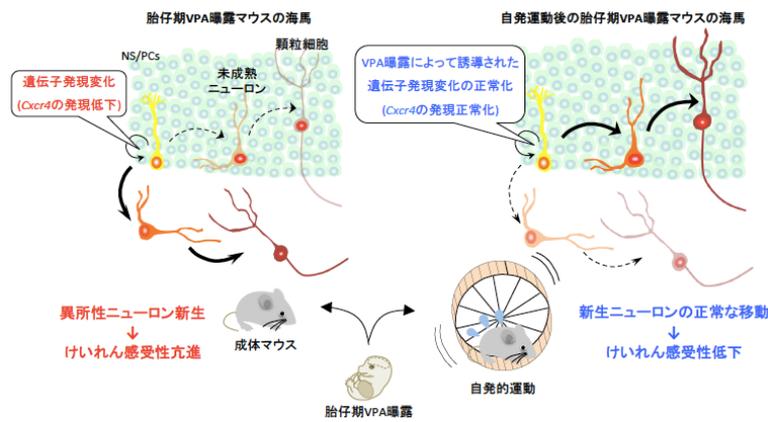


図1：胎仔期 VPA 曝露によって誘導される成体ニューロン新生障害とけいれん感受性増加の模式図。胎仔期 VPA 曝露は成体海馬 NS/PCs において *Cxcr4* を含む細胞移動関連遺伝子群の発現を変化させ、異所性ニューロン新生を誘導し、その結果けいれん感受性が増加する。自発的運動はこれらの異常を概ね改善した。

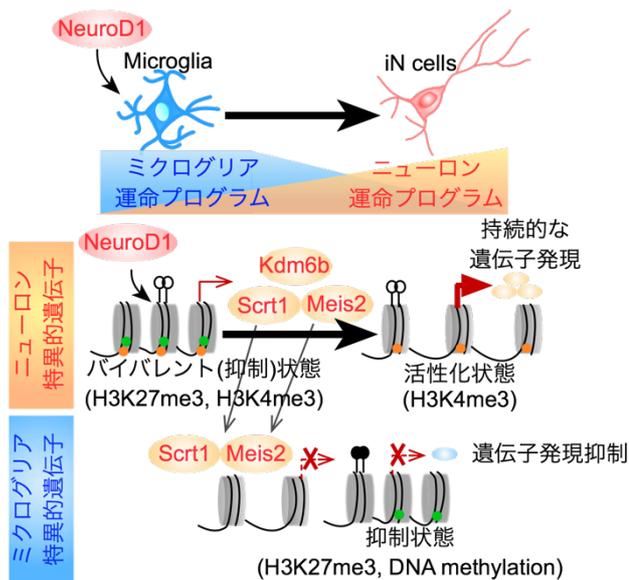


図2：NeuroD1 はミクログリア内のバイバレント状態にあるニューロン特異的遺伝子に結合し、ニューロン運命プログラムを発動する。ニューロン特異的遺伝子の中には転写抑制因子 (Sct1 や Meis2) も含まれ、それらはミクログリア特異的遺伝子発現に関わる転写因子の遺伝子を抑制し、ミクログリア運命プログラムを止める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsuda T, Irie T, Katsurabayashi S, Hayashi Y, Nagai T, Hamazaki N, Adefuin AMD, Miura F, Ito T, Kimura H, Shirahige K, Takeda T, Iwasaki K, Imamura T, Nakashima K.	4. 巻 101
2. 論文標題 Pioneer Factor NeuroD1 Rearranges Transcriptional and Epigenetic Profiles to Execute Microglia-Neuron Conversion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 472-485
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuron.2018.12.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakai A, Matsuda T, Doi H, Nagaiishi Y, Kato K, Nakashima K	4. 巻 115
2. 論文標題 Ectopic neurogenesis induced by prenatal antiepileptic drug exposure augments seizure susceptibility in adult mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA	6. 最初と最後の頁 4270-4275
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1716479115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sanosaka T, Imamura T, Hamazaki N, Chai M, Igarashi K, Ideta-Otsuka M, Miura F, Ito T, Fujii N, Ikeo K, Nakashima K	4. 巻 20
2. 論文標題 DNA Methylome Analysis Identifies Transcription Factor-Based Epigenomic Signatures of Multilineage Competence in Neural Stem/Progenitor Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell reports	6. 最初と最後の頁 2992-3003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2017.08.086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中島 欽一
2. 発表標題 ミクログリアからニューロンへのダイレクトリプログラミングによる脳梗塞治療法の開発
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kinichi Nakashima
2. 発表標題 Artificial generation of new neurons in adult central nervous systems
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kinichi Nakashima
2. 発表標題 Artificial neurogenesis in the adult central nervous system and it's effect on functional recovery after injury
3. 学会等名 2nd Neuroepigenetics & Neuroepitranscriptomics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島 欽一
2. 発表標題 胎生期バルプロ酸曝露によるけいれん感受性増大のメカニズムとその改善法
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島 欽一
2. 発表標題 転写因子 NeuroD1によるミクログリアからニューロンへの分化転換とそのメカニズム
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

脳内に存在する免疫細胞から機能的な神経細胞の作製に成功
<http://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/307>
妊婦への抗てんかん薬投与によって子どもはけいれんが起こりやすくなる!?
<https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/234>
脊髄損傷に対する神経幹細胞移植の治療効果を増強させる治療法の発見!
<https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/225>
ほ乳類神経幹細胞が変化するメカニズムを明らかに
<https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/171>
ヒトiPS細胞由来神経幹細胞の低酸素培養により、短期にアストロサイト分化を誘導
<https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/131>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	今村 拓也 (Imamura Takuya) (90390682)	広島大学・統合生命科学研究科(理)・教授 (15401)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協 力 者	松田 泰斗 (Matsuda Taito)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
アメリカ合衆国	UT Southwestern Medical Center		
米国	UCSD		