

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32202
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2020
 課題番号：17K08497
 研究課題名(和文) エピジェネティック制御因子による神経幹細胞の維持機構および神経分化に関する研究

研究課題名(英文) The role of epigenetic regulator in neural stem cell maintenance and differentiation

研究代表者
 富永 薫 (Tominaga, Kaoru)
 自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：20265242
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、神経幹細胞の維持や神経分化におけるヒストンアセチル化の役割を解明することを目的とし、脳で高発現するTip60ヒストンアセチル化酵素を神経幹細胞/前駆細胞で欠損するマウスを作製した。Tip60欠損マウスは、生後すぐに致死となった。Tip60欠損マウスは小頭症を示し、神経幹細胞の自己複製能や神経分化能の低下に起因すると考えられた。遺伝子発現解析では、Tip60欠損脳は、神経発生に關与する遺伝子群の発現が著しく低下していた。Tip60ヒストンアセチル化酵素によるヒストンアセチル化は、一連の遺伝子群の発現を制御することによって、神経幹細胞の維持や機能に重要な役割を担っていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経系の構築にはエピジェネティックな調節機構が関与し、その破綻が神経幹細胞の維持や神経発生、高次脳機能に大きな影響を与えると考えられる。近年、精神神経疾患の病態・発症機序の点においてもエピジェネティック因子が注目されている。本研究よりTip60を介したヒストンアセチル化制御は神経幹細胞の維持や神経発生に必須であることが明らかとなり、神経変性疾患や精神神経疾患への関与や病態解明への発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic mechanism via chromatin regulation is crucial for many aspects of biological processes including maintenance of stem cells. Histone acetylation is a major epigenetic modification for these processes. Tip60 is one of the histone acetyltransferases (HATs) and is expressed in brain at relatively high levels. To investigate the role of histone acetylation via Tip60 in brain, we have produced the neural stem/progenitor cell specific Tip60 deficient mice. Although Tip60 deficient mice were born in accordance with Mendelian ratio, they died soon after delivery. The Tip60 deficient mice were microcephaly, and this was caused reduced self-renewal ability of their neural stem/progenitor cells and reduced neurogenesis. Analysis of gene expression in Tip60 deficient brain showed reduced expression in a subset of genes relating to neurogenesis. These results suggest that gene regulation controlled by Tip60 has a pivotal role in maintenance and function of neural stem/progenitor cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：神経幹細胞 エピジェネティクス ヒストンアセチル化 神経発生 神経分化 マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティックな調節機構を介したクロマチン制御は種々の細胞機能に重要である。現在クロマチン制御に関与する多くの因子が同定され、その役割も明らかになってきている。細胞内の DNA はクロマチン構造を形成し保護されていることから、DNA の転写、複製、修復にはクロマチン構造変換が必須である。脳は、適切な数の神経幹細胞を維持しながら、神経幹細胞から神経細胞とグリア細胞を必要ときに必要な場所で必要な数だけ産生することで構築される。例えば哺乳類の脳では、神経幹細胞から産生された様々な神経前駆細胞や神経細胞が適切な位置に移動することによって、層構造が形成される。脳の構築においてもエピジェネティック因子が関与することが知られており、これらのエピジェネティック因子は、外的内的な刺激に応答し、クロマチンのヒストン修飾を介して転写因子群の転写活性を調節する。このような協同的な転写調節機構は、神経幹細胞の細胞系譜を決定し、生み出された神経細胞やグリア細胞の分化や細胞移動を制御することで、機能的な脳の構築に寄与している。近年、小頭症などの神経発生異常や、自閉症などの精神・神経疾患の発症に関与するエピジェネティック因子がいくつか同定されており、神経発生のみならず、精神神経疾患の病態・発症機序の点においてもエピジェネティック因子が注目されている。しかしながら、エピジェネティックな転写調節制御を基盤とした神経幹細胞の維持や分化の分子機構は、未だ十分に理解されていない。本研究では脳で高発現する Tip60 ヒストンアセチル化酵素に着目し、神経発生におけるエピジェネティック制御機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

神経系の構築にはエピジェネティックな調節機構が関与し、その破綻が神経幹細胞の維持や神経発生、高次脳機能に大きな影響を与えられていると考えられている。しかしながら、エピジェネティック因子により、これらの事象がどのように制御されるのかについての詳細な分子機構は、未だ不明である。我々は、ヒストンアセチル化酵素 Tip60 の神経幹細胞特異的欠損マウスを作製し、大脳皮質形成に異常が生じることを明らかにした。そこで本研究では、大脳皮質形成における Tip60 の役割を解明する。Tip60 欠損マウスにおける神経発生異常がどのような分子細胞機序により生じるのかを、組織化学、初代培養系、さらに標的遺伝子の網羅的解析により明らかにする。本研究により、Tip60 を介した神経発生制御の解明を通じて、神経幹細胞の維持と分化におけるエピジェネティック因子を介したクロマチン制御機構の新規分子基盤が明らかとなり、神経変性疾患の病態解明や神経幹細胞を利用した細胞治療応用への発展が期待される。

3. 研究の方法

(1) 神経幹細胞特異的 Tip60 欠損マウスの作製

酵素活性に必須であるアセチル CoA 結合部位をコードするマウス Tip60 遺伝子の第 10 および 11 エキソンを loxP ではさんだ Tip60 マウスラインとネスチンプロモーターにより神経幹細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現するマウスを掛け合わせ、神経幹細胞特異的 Tip60 欠損マウスを作製した。

(2) 脳の組織学的解析

妊娠マウスより胎児を取り出し、還流固定の後、脳を分離した。20% ショ糖液で置換した後、OCT compound で凍結包埋した。14- μm の冠状連続凍結切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色により病理変性評価をするとともに、各種マーカータンパク質に対する免疫染色を行い、細胞系

譜の追跡を行った。また、胎児脳における増殖細胞の解析は、プロモデオキシウリジン(BrdU)の取り込みを指標とした免疫染色法を用いた。妊娠マウスに 100 µg/g 体重で BrdU を腹腔内に投与し、2 時間後に胎児脳を調整し、凍結切片を作製した。脳に取り込まれた BrdU は、抗 BrdU 抗体を用いた蛍光免疫染色法で検出し、BrdU 陽性細胞の数を計測した。

(3) ニューロスフェア法

胎生期 14.5 日の神経幹細胞特異的 Tip60 欠損マウス胎児脳より神経幹細胞を分離し、線維芽細胞増殖因子(FGF2)および上皮細胞増殖因子(EGF)を含む培地で培養し、神経幹/前駆細胞を増幅した。増幅された神経幹/前駆細胞をトリプシン処理により単細胞化し、1 穴当たり 1000 個の細胞を 96 穴プレートに継代した。10 日間の培養後、新たに形成されたスフェアの大きさと数を顕微鏡下で計測し、自己複製能を測定した。ニューロスフェア法で増幅された細胞を分化促進培地で培養し、分化した細胞系譜をマーカータンパク質に対する免疫染色により分化能を評価した。

(4) Tip60 欠損胎児脳における遺伝子発現の検討

Tip60 欠損による遺伝子発現の影響を検討するために網羅的 RNA-seq 解析を行い、Tip60 の標的遺伝子候補の検索を行った。胎齢 14.5 日の Tip60 欠損胎児終脳およびコントロール終脳より RNA を調整し、網羅的 RNA-seq 解析を行なった。

4. 研究成果

神経幹細胞特異的 Tip60 欠損マウスは、メンデルの法則に従って生まれてきたが、誕生直後に致死となった。出産直前の胎齢 18.5 日の胎児では生存が確認できたことから、神経幹細胞特異的 Tip60 欠損マウスの死因は、自発呼吸ができないなどの可能性が考えられた。神経幹細胞特異的 Tip60 欠損マウスの頭部はコントロールマウスの頭部と比べ平で、小頭症を示した。誕生直後の神経幹細胞特異的 Tip60 欠損マウス脳の組織病理学的解析では、大脳皮質の菲薄化が認められ、脳室の肥大化も顕著だった(図1)。

神経幹細胞特異的 Tip60 欠損胎児脳へ

の BrdU の取り込みは胎齢 14.5 日で既に減少しており、胎齢が進むに連れて顕著になった。脳内の増殖細胞は胎齢 14.5 日以降、顕著に減少していることが明らかとなった。また、細胞周期 M 期のマーカーであるリン酸化ヒストン H3(Ser10)の蛍光免疫染色により、特に脳室下帯で M 期の細胞が蓄積していることが分かった。神経前駆細胞の細胞周期の異常が示唆された。これらの結果は、Tip60 が神経幹細胞/前駆細胞の維持や分化に関与することを強く示唆していた。種々の分化マーカータンパク質に対する蛍光免疫染色では、神経幹細胞特異的 Tip60 欠損胎児脳の神経分化が著しく低下していることが分かった。面白いことに、正常な胎齢 18.5 日脳ではほとんど検出できない GFAP 陽性のアストロサイトが、神経幹細胞特異的 Tip60 欠損胎児脳では蓄積していることが分かった。神経発生過程において Tip60 は、神経分化を促進するとともに、アストロサイトへの分化を抑制することが考えられた。以上の結果は、神経幹細胞特異的 Tip60 欠損マウスが小頭症を呈することを反映していると考えられる。

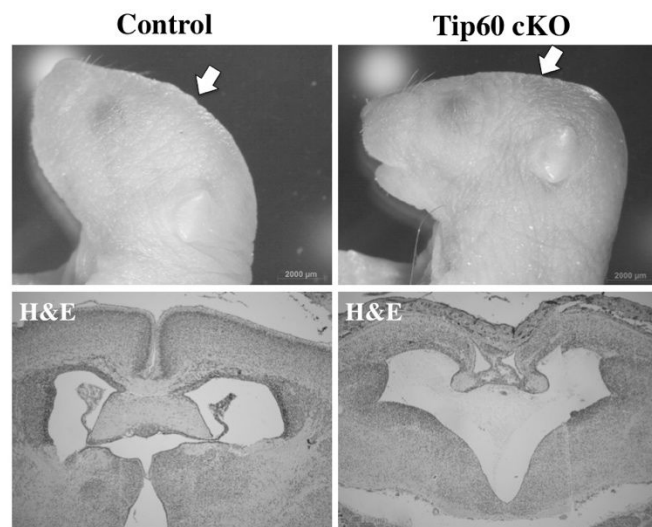


図1. 神経幹細胞特異的 Tip60 欠損新生児の頭部は平で、大脳皮質も菲薄化している。

ニューロスフェア法を用いて *in vivo* の結果をさらに検証した。神経幹細胞特異的 Tip60 欠損胎児脳由来の神経幹細胞/前駆細胞の増殖能は、コントロールに比べ著しく低下していた。また、神経分化が著しく低下しているいっぽう、アストロサイトへの分化が促進していた。ニューロスフェア法を用いた *in vitro* の解析結果は、胎児脳を用いた *in vivo* の結果を強く支持していた。

Tip60 ヒストンアセチル化酵素は転写制御に関わることから、神経発生過程における Tip60 の標的遺伝子候補を探索するために、脳の異常が確認され始まる胎齢 14.5 日終脳より分離した RNA を用いて、網羅的 RNA-seq 解析を行なった。Scrt1 をはじめ神経分化や神経成熟に関連する重要な遺伝子群の発現低下が認められた。本解析では、アストロサイトへの分化に関連する遺伝子群に有意な差は認められなかったが、アストロサイトへの分化はより後半のステージで活性化されることから、アストロサイトを標的とした解析には胎齢後期の脳を用いる必要があると考えられる。

以上の結果は、Tip60 ヒストンアセチル化酵素が神経幹細胞/前駆細胞の適切な維持や神経発生に必須であることを示しており、神経発生過程におけるヒストンアセチル化を介したエピジェネティック制御ネットワークの重要性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Miyata S, Tominaga K*, Sakashita E, Urabe M, Onuki Y, Gomi A, Yamaguchi T, Mieno M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K, Watanabe E, Kawai K, Endo H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Comprehensive Metabolomic Analysis of IDH1(R132H) Clinical Glioma Samples Reveals Suppression of α -oxidation Due to Carnitine Deficiency.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 9787
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-46217-5	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 Kawasaki Y, Sato K, Mashima K, Nakano H, Ikeda T, Umino K, Morita K, Izawa J, Takayama N, Hayakawa H, Tominaga K, Endo H, Kanda Y.	4. 巻 27
2. 論文標題 Mesenchymal stromal cells inhibit aerobic glycolysis in activated T-cells by negatively regulating hexokinase II activity through PD-1/PD-L1 interaction.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transplantation and Cellular Therapy.	6. 最初と最後の頁 231.e1-231.e8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtct.2020.11.012	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富永 薫、宮田 五月、坂下 英司、澤口 武尊、黒田 林太郎、川合 謙介、遠藤 仁司
2. 発表標題 変異型イソクエン酸脱水素酵素1（IDH1）を有するグリオーマ臨床検体における低カルニチンと脂肪酸酸化の抑制
3. 学会等名 がんと代謝研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富永 薫、宮田 五月、坂下 英司、澤口 武尊、黒田 林太郎、川合 謙介、遠藤 仁司
2. 発表標題 変異型イソクエン酸脱水素酵素1（IDH1）を持つグリオーマは、低カルニチンにより 酸化が抑制されている
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Rintaro Kuroda, Kaoru Tominaga, Katsumi Kasashima, Eiji Sakashita, Kenji Kuroiwa, Yutaka Inoki, Takeru Sawaguchi, Toshiro Hamamoto, Hitoshi Endo
2. 発表標題 Neuronal stem cell-specific mitochondrial dysfunction affects neurogenesis in mice.
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

自治医科大学医学部生化学講座機能生化学部門ホームページ https://www.jichi.ac.jp/kinou/
--

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

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
---------	---------