

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15204

研究課題名(和文)「幹細胞人類学」の確立を目指した機能ゲノム進化解析

研究課題名(英文)Functional evolutionary genomics for the establishment of "stem cell anthropology".

研究代表者

津山 淳(TSUYAMA, Jun)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・研究員

研究者番号：20760101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの大脳新皮質は高次脳機能を司っており、その拡大はヒト特有の高い認知能力や言語能力の基盤となっている。一方でヒトの中樞神経系は障害に対して脆弱であり、修復能に乏しい。近年、エンハンサーはこれまで考えられていた以上に高い組織特異性と進化速度を示し、その獲得や欠失は生物の複雑性や進化に大きく貢献していることが報告されている。本研究ではエンハンサーに着目し、神経幹細胞や自己複製能を持つミクログリアを対象したエンハンサーの解析を行い、同定したエンハンサーの機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトは大脳皮質の進化により、多くの高次機能を得たが、各種の精神疾患や、神経変性疾患などの疾患リスクをも得てしまった。また、ヒト中枢神経系は修復能に乏しく、脳卒中は手足の麻痺などの重度な後遺症をもたらす主な原因となっている。本研究では脳組織内で自己複製能を持つ神経幹細胞やミクログリアのエンハンサーに着目し機能解析を行った。これは、ヒト大脳皮質の進化・発生の理解が前進するのみならず、疾患の原因解明や治療法の開発においても重要な基盤データを提供し得るものである。

研究成果の概要(英文)：The human neocortex is responsible for higher-order brain functions and is the basis for high cognitive and language abilities unique to humans. On the other hand, the human central nervous system is fragile to damage and has poor repair potential. Recently, it has been reported that enhancers exhibit high tissue and interspecies specificity, and that their acquisition or deletion contributes significantly to the complexity and evolution of organisms. In this study, I focused on enhancers in neural stem cells and microglia with self-renewal capacity, and analyzed the functions of the identified enhancers.

研究分野：細胞生物学

キーワード：エンハンサー 機能ゲノム進化 エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

ヒトは脳皮質の進化により、優れた高次機能を得たが、各種の精神疾患や、神経変性疾患などの疾患リスクをも得てしまった。また、ヒト中枢神経系は修復能にも乏しく、その損傷は後遺症をしばしば残す。近年、そのようなヒトの脳の特異性を解明するため、発生期の幹細胞に着目した脳進化研究が成果を挙げはじめている。しかしながら、これらの多くの研究において種間の差異をもたらす遺伝子はマウスにおいても保存されている。進化を真に理解するためには、ゲノム配列の種間差から表現型の種間差を説明できなければならないが、脳皮質の拡大に貢献したと思われるゲノム配列の差異はほとんど分かっていない。一方で、ゲノム配列から脳の進化を明らかにするという試みも行われているが、それらゲノムワイドな解析から表現型まで辿り着いた例は乏しい。そこで本研究では、遺伝子発現の時間的・空間的な発現制御において中心的役割を持つエンハンサーに着目した。エンハンサーはこれまで考えられていた以上に高い組織特異性と進化速度を示し、その獲得や欠失は生物の複雑性や進化に大きく貢献していることが報告されている。しかしながら、種間の差異や神経修復に重要なエンハンサー領域は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究ではマウスの神経幹細胞および神経幹細胞の増殖やシナプス成熟に関与するマイクログリアにおいてヒトで欠失しているエンハンサーを同定し、その機能解析を行うことでヒトの進化の原因となったゲノム配列を同定することを目的とする。また、同定したエンハンサーを起点として種間で差異のある機能の付加あるいは除去することによる医学への発展・応用の可能性を模索する。

3. 研究の方法

(1) 神経幹細胞のレポーターマウスである Nestin-EGFP マウスを用いることで、胎生 11、14、18 日目それぞれの胎仔脳から fluorescence activated cell sorting (FACS) を用いて神経幹細胞を精製し、assay for transposase-accessible chromatin using sequencing (ATAC-seq) による神経幹細胞のオープンクロマチン領域を同定した。また、エンハンサーの標的遺伝子の予測は未だ困難である。そのため、ゲノム上の抗体結合領域と近接している他のゲノム領域を同定可能することができる [HiChIP](#) (Mumbach MR et al., *Nat Methods*, 2016) を、抗 H3K27ac 抗体を用いて実施することによって全エンハンサーの相互作用領域を検出した。ピークコールされたエンハンサー領域を UCSC LiftOver を用いて GRCm38/mm10 から GRCh38/hg38 のゲノムへリマッピングすることで、保存されている領域と保存されていない領域を分類した。

次に、ヒトとマウスの神経幹細胞の遺伝子発現を比較するために、ヒト脳皮質の遺伝子発現データを公開データより取得した (Lui JH et al, *Nature*, 2014; Johnson MB et al, *Nat Neurosci*, 2015)。取得したデータを用いて Weight Gene Co-expression Network Analysis により、神経幹細胞において発現しているとみられる遺伝子群をヒトとマウス間での比較解析を行い、マウス神経幹細胞で発現量のパーセントイルが 70 以上かつヒト神経幹細胞で発現量パーセントイルが 20 以上減少している 126 遺伝子を抽出した。これら 126 遺伝子を制御しているエンハンサーのうち、ヒトにおいて保存されていない 17 箇所のエンハンサーに着目し、CRISPR/Cas9 システムを用いた機能喪失実験を試みた。具体的には、エンハンサー領域を挟み込むように gRNA を 2 つ設計し、PX330 にクローニングを行った。PX330 と EGFP を発現可能なプラスミドを子宮内電気穿孔法によって胎仔期の神経幹細胞に導入し、エンハンサーを欠失させることで機能解析を行った。子宮内電気穿孔法は胎生 12 日目において実施し、72 時間後に親マウスに対して BrDU の腹腔内投与を実施した。BrDU 投与後 30 分で胎仔を摘出し、免疫染色によって解析を行った。

(2) 神経修復や神経幹細胞の装飾に関連があることが近年報告されている、マイクログリアの神経修復に関わる遺伝子群を制御するエンハンサーの探索を行った。IGF1 はマイクログリアが神経損傷時に放出する代表的な神経栄養因子であり、神経幹細胞の増殖やシナプス形成を含む神経細胞の成熟に関与することが知られる因子であることから着目した。神経症状の回復期である脳梗塞 6 日後のマイクログリアにおいて発現が高く、なおかつ Igf1-EGFP マウスの脳梗塞モデルから単離した Igf1 高発現マイクログリアにおいて高い発現を示した 208 遺伝子を修復関連遺伝子群として同定した。修復関連遺伝子群には炎症性サイトカインが含まれない一方で、発生・修復に関連する因子が濃縮されていた。このことは修復性因子と炎症性因子の発現制御機構が異なることを示している。そこで、脳梗塞モデルマウス(中大脳動脈一過性脳虚血マウス)から単離したマイクログリアにおいて ATAC-seq および HiChIP を実施し、同定された脳梗塞特異的なエンハンサーについて機能解析を行った。同定されたエンハンサーの制御候補因子を HOMER (<http://homer.ucsd.edu/homer/>) によるモチーフ解析により抽出した。AP-1 阻害剤(T-5224)および ETS 転写因子の阻害剤(YK-4-279)はそれぞれ脳梗塞作製 1~2 時間前に胃内投与し、24 時間後に FACS によってマイクログリアを単離し、解析を行った。

4. 研究成果

(1) 生体内から精製したマウス神経幹細胞の ATAC-seq 解析から得られたオープンクロマチン領域を UCSC LiftOver tool を用いてヒトゲノムのマッピングしたところ、ヒトにおいて保存されていない領域が $16.9 \pm 1.2\%$ 含まれていることが分かった(図 1)。次に、ヒト神経幹細胞とマウス神経幹細胞の発現比較データを公開データから取得し、ヒト神経幹細胞に置いて発現低下が見られた遺伝子の制御エンハンサーを標的とした。これらのエンハンサーを標的とした gRNA を PX330 vector にクローニングすることによって CRISPR/Cas9 システムによる破壊を行った。その結果、第 17 染色体に存在するエンハンサーによってマウス神経幹細胞の増殖促進および PAX6 陽性細胞の発現が脳室下帯まで観察されることを確認した。ヒトの脳のようなシワ構造の観察には至らなかったものの、このエンハンサーによるシグナル伝達経路の変異は神経幹細胞の増殖を促進することでヒトの脳の進化に重要な役割を果たすと考えられた。

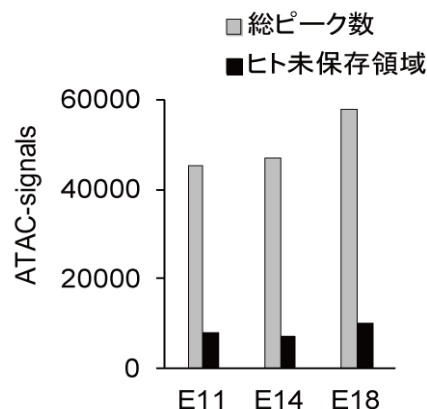


図 1. 胎生 11, 14, 18 日目のマウス神経幹細胞のオープンクロマチン領域の総数. ヒトにおいて保存されていない配列が $16.9 \pm 1.2\%$ 含まれた。

(2) 脳梗塞モデルマウスから FACS によって単離された虚血脳由来ミクログリアは対側の正常側のミクログリアと比較して特異的に活性化する領域が多数見られた。これらのエンハンサーの標的遺伝子は炎症や神経修復に関連した遺伝子を標的とするものが濃縮されていた。脳梗塞特異的エンハンサー群の保存度は高くなく、ヒトにおいては 60%ほどがヒトにおいて保存されていないゲノム領域であった。そこで神経修復能に着目し、神経修復遺伝子として知られる Igf1-EGFP マウスを用い、脳梗塞後に出現する Igf1 陽性ミクログリアの遺伝子発現から修復関連遺伝子を同定した。これらの修復関連遺伝子のエンハンサーを制御している転写因子を DNA モチーフ解析によって探索したところ、AP-1 および ETS 転写因子が非常に強く濃縮されていた。そこで、AP-1 の阻害剤である T-5224 および ETS 阻害剤である YK-4-279 をマウスに投与したところ、神経症状の増悪が見られ、脳梗塞に伴ったエンハンサーの確立が阻害された。以上のことからこれらのエンハンサーはミクログリアによる神経修復能に重要と考えられたが、意外なことにヒトにおいてはあまり保存されていなかった。これらのシグナルの増強によってヒトの中樞神経系の修復能を亢進できる可能性が示された。今後は同定したエンハンサーの進化的解析および、その制御因子を標的とした新規治療法の開発に結びつけるための研究へと発展させる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jun Tsuyama, Akari Nakamura, Hiroaki Ooboshi, Akihiko Yoshimura, Takashi Shichita	4. 巻 40
2. 論文標題 Pivotal role of innate myeloid cells in cerebral post-ischemic sterile inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Seminars in Immunopathology	6. 最初と最後の頁 523-538
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00281-018-0707-8	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 津山淳
2. 発表標題 Role of innate myeloid cells in cerebral post-ischemic sterile inflammation
3. 学会等名 神経科学学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津山 淳
2. 発表標題 エピゲノム情報から神経幹細胞のゲノム進化領域を探る
3. 学会等名 日本遺伝学会第89回大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 津山 淳
2. 発表標題 幹細胞から見た脳の発生進化
3. 学会等名 第19回 日本進化学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Achievement | 脳卒中ルネサンスプロジェクト
<http://www.igakuken.or.jp/stroke-renaiss/achievement.html>

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