

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14820

研究課題名(和文) 神経幹細胞エイジングを誘発する最初期因子の同定

研究課題名(英文) Identification of the initial factors that induce neural stem cell aging

研究代表者

松田 泰斗 (Matsuda, Taito)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：10756993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：出生5日、12週齢、24週齢のNestin-GFPマウスの成体脳海馬から、蛍光を指標に神経幹細胞を単離し、RNA-seq解析を実施した。その結果、神経幹細胞エイジングを誘発する因子を複数同定した。さらに同定した遺伝子を、成体海馬神経幹細胞特異的に欠損させると、神経幹細胞とニューロン新生が減少することがわかった。さらにこの遺伝子欠損マウスでは、加齢に伴って、通常よりも早く神経幹細胞が減少することも見出した。現在、この遺伝子を過剰発現することで、加齢に伴う神経幹細胞の減少を止めることが可能か解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経幹細胞は海馬で新しいニューロンを産生することで、学習・記憶を制御しているため、ニューロン新生能の低下は海馬組織の老化、さらには個体の老化につながる事が分かっている。しかし、神経幹細胞エイジングの起点となる要因(あるいは因子)が明らかになっていない。本研究では、幼齢期、若齢期、中齢期の各段階における神経幹細胞の遺伝子発現変化に着目し、神経幹細胞エイジングの起点と考えられる因子の同定に成功した。今後は、同定した遺伝子の発現を制御することで、神経幹細胞の機能回復、ならびに海馬学習記憶低下の改善法創出につなげたい。

研究成果の概要(英文)：We performed RNA sequencing using EGFP-positive neural stem cells (NSCs) isolated from Nestin-EGFP mice [postnatal day (P) 5, 12w and 24w]. We have identified multiple factors that induce NSC aging. Loss of one of the identified genes, specifically in adult hippocampal NSCs, decreased NSCs and subsequent neurogenesis. Furthermore, we also found that in this gene-deficient mouse, NSCs deplete faster than usual with aging. We are now investigating whether the overexpression of this identified gene prevents the reduction of NSCs with aging.

研究分野：神経科学

キーワード：神経幹細胞 成体脳 老化 エイジング トランスクリプトーム解析

1. 研究開始当初の背景

マウスおよびヒトの海馬に存在する神経幹細胞は、生涯にわたってニューロンを産生することで、学習・記憶の維持に貢献している。この海馬神経幹細胞の増殖能は加齢に伴って低下し、その結果ニューロン新生が減少することが、老化に伴う記憶・学習能力低下の原因の一つと考えられている。これまでに、神経幹細胞を取り巻く細胞群の挙動の変化は、加齢に伴う神経幹細胞の機能低下(神経幹細胞エイジング)を引き起こす原因であることが明らかにされてきたものの(Fuentealba et al., Cell Stem Cell, 2012)、神経幹細胞自身の遺伝子発現を調節するネットワークが、どのように破綻しているのかは、わかっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、神経幹細胞エイジングを誘発する遺伝子発現ネットワーク変容機構を明らかにするとともに、鍵となる因子の発現を制御することで、神経幹細胞の若返り、ニューロン新生能の回復、並びに記憶・学習能力低下の改善をねらった。

3. 研究の方法

申請者は、この神経幹細胞エイジングのメカニズムを解明するために、神経幹細胞特異的遺伝子 Nestin プロモーター制御下で EGFP を発現するマウスの海馬から、FACS により神経幹細胞を直接単離し、RNA-seq 解析を行った。その結果、幼齢期(出生後5日)、若齢期(12週)、中齢期(24週)において、ニューロン新生に関与する遺伝子群の発現は段階的に変化していることを見出した。これは、ニューロン新生が加齢に伴って段階的に低下することと一致する。本研究では、この RNA-seq の結果から神経幹細胞エイジングに関与する候補因子を選定し、in vitro および in vivo 実験から神経幹細胞エイジングを誘導する因子の同定を目指した。

4. 研究成果

(1) 神経幹細胞エイジングを誘発する候補因子選定

申請者は、これまでに、幼齢期、若齢期、中齢期の Nestin-EGFP マウス海馬から、EGFP の蛍光を指標に神経幹細胞を単離し、RNA-seq 解析を実施した。その結果、加齢に伴って有意に発現上昇・低下する遺伝子(それぞれ n=232 と n=48)を同定した。転写因子ネットワークによる細胞運命制御機構が近年明らかになってきていることを考慮して、本研究では、これらの遺伝子のうち転写因子に着目した。そのため、ここで得られた候補因子は、発現上昇した転写因子 13 個と、発現低下した転写因子 6 個であった。さらなる絞り込みのため、in vitro において神経幹細胞増殖能評価、SA-β-gal 染色、老化関連遺伝子発現解析を実施した。その結果、エピジェネティクス制御因子 X が候補として浮上した(図1)。

(2) 海馬の神経幹細胞エイジングを誘発する因子の同定

同定した候補因子が in vivo において、神経幹細胞エイジングに関与するのかどうかを明らかにするために、レンチウイルスを用いて、海馬の神経幹細胞で遺伝子 X の発現を抑制した。神経幹細胞増殖マーカーや新生ニューロンマーカーに対する抗体を用いた免疫染色の結果、in vivo においても遺伝子 X は神経幹細胞の増殖能及びニューロン新生能を制御していることがわかった。また、Nestin-CreERT2 マウスと、遺伝子 X 座に Flox 配列を有するマウスを交配し、タ

モキシフェンの投与により、任意のタイミングで神経幹細胞特異的に遺伝子 X を欠損可能なマウスを作製した。作製したマウスでは、8 週齢でのタモキシフェン投与依存的に、海馬神経幹細胞で遺伝子 X が欠損されることを確認した。さらに、神経幹細胞マーカーや新生ニューロンマーカーを用いた免疫染色により、神経幹細胞機能とニューロン新生の程度を測定した。その結果、この候補因子欠損マウスでは、海馬神経幹細胞の数が著しく減少し、それに伴ってニューロン新生がほとんど観察されなくなることを見出した。また、4 週齢でこの遺伝子を神経幹細胞特異的に欠損させると、8 週齢では神経幹細胞がほぼ消失することがわかった。これは、過去に報告されたどの遺伝子欠損マウスよりも表現型が大きく、まさに、候補因子が、神経幹細胞機能低下に関わる最初期因子であることを示唆していた (図 2)。

(3) エピジネティクス変動と海馬の神経幹細胞エイジングの関連性

さらに、いくつかのヒストン修飾抗体を用いた ChIP-seq も実施し、同定した因子 X が制御するヒストン修飾を明らかにすることができた。

現在も研究を継続し、この遺伝子 X の発現を操作することで、エイジングに伴う神経幹細胞の機能回復、ならびに海馬依存的記憶障害の改善が認められるのかどうか、確認している。

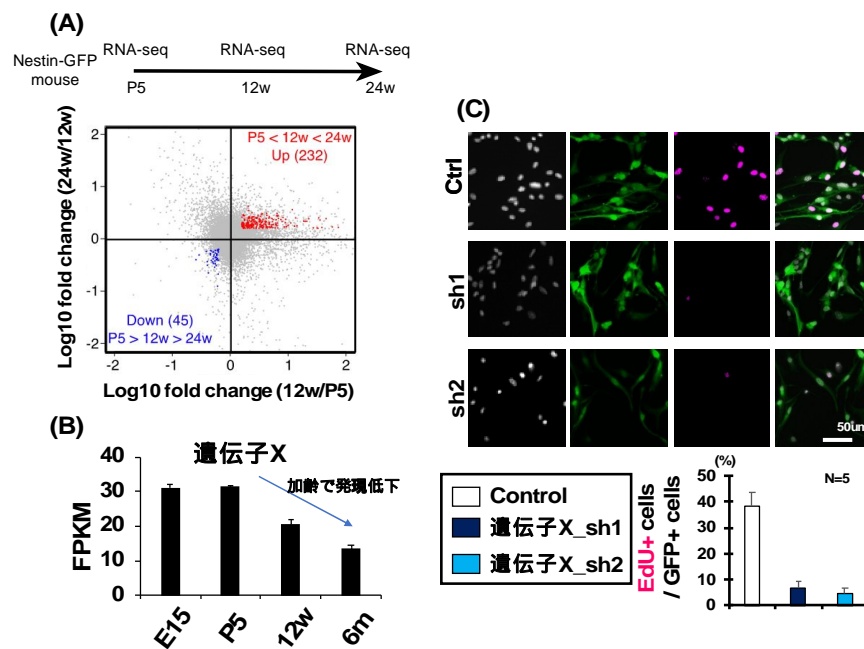


図 1. 神経幹細胞エイジングを誘発する候補因子選定

- (A) 遺伝子発現解析(RNA-seq)から神経幹細胞で加齢に伴って有意に発現上昇・低下する遺伝子(それぞれ n=232 と n=48)を同定した。
- (B) 神経幹細胞において遺伝子 X の発現は加齢とともに低下していた。
- (C) 遺伝子 X の発現を神経幹細胞において抑制すると、増殖能が低下した。

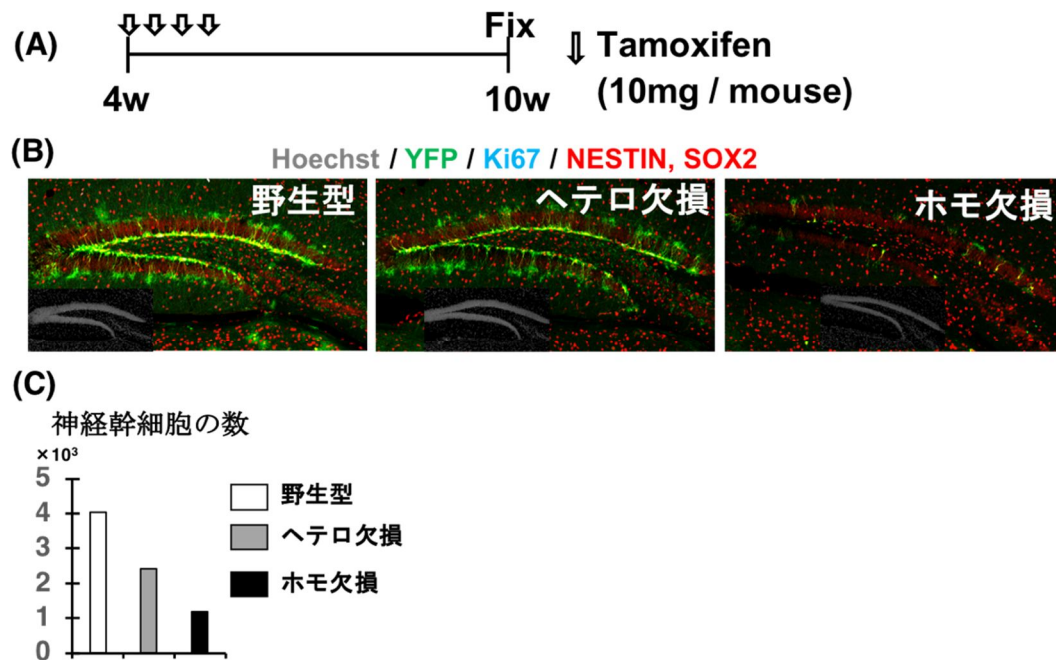


図 2. 海馬の神経幹細胞エイジングを誘発する因子の同定

(A) Nestin-CreERT2 マウスと、遺伝子 X 座に Flox 配列を有するマウスを交配、4 週齢でタモキシフェンを投与し、この遺伝子 X を神経幹細胞特異的に欠損させた。

(B, C) この候補因子ホモ欠損マウスでは、海馬神経幹細胞の数が著しく減少していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5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 Atsuhiko Sakai, Taito Matsuda, Hiroyoshi Doi, Yukiko Nagaishi, Kiyoko Kato, and Kinichi Nakashima | 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 無 |
| 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 Haruka Sekiryu, Taito Matsuda | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 In vivo direct reprogramming as a therapeutic strategy for brain and retina repair | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Neural Regeneration | 6. 最初と最後の頁 1998-1999 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4103/1673-5374.308093 | 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 Taito Matsuda, Kinichi Nakashima | 4. 巻 S0168-0102 |
| 2. 論文標題 Natural and forced neurogenesis in the adult brain: Mechanisms and their possible application to treat neurological disorders | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Neuroscience Research | 6. 最初と最後の頁 30225-X |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2020.05.011. | 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 Matsuda Taito, Irie Takashi, Katsurabayashi Shutaro, Hayashi Yoshinori, Nagai Tatsuya, Hamazaki Nobuhiko, Adefuin Aliya Mari D., Miura Fumihito, Ito Takashi, Kimura Hiroshi, Shirahige Katsuhiko, Takeda Tadayuki, Iwasaki Katsunori, Imamura Takuya, Nakashima Kinichi | 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.e7 |
| 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 Murao Naoya, Matsubara Shuzo, Matsuda Taito, Noguchi Hirofumi, Mutoh Tetsuji, Mutoh Masahiro, Koseki Haruhiko, Namihira Masakazu, Nakashima Kinichi | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 Np95/Uhrf1 regulates tumor suppressor gene expression of neural stem/precursor cells, contributing to neurogenesis in the adult mouse brain | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Neuroscience Research | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2018.05.007 | 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 Uezono Naohiro, Zhu Yicheng, Fujimoto Yusuke, Yasui Tetsuro, Matsuda Taito, Nakajo Masahide, Abematsu Masahiko, Setoguchi Takao, Mori Shuji, Takahashi Hideo K., Komiya Setsuro, Nishibori Masahiro, Nakashima Kinichi | 4. 巻 36 |
| 2. 論文標題 Prior Treatment with Anti-High Mobility Group Box-1 Antibody Boosts Human Neural Stem Cell Transplantation-Mediated Functional Recovery After Spinal Cord Injury | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 STEM CELLS | 6. 最初と最後の頁 737 ~ 750 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.2802 | 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16件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 松田 泰斗 |
| 2. 発表標題 成体脳における自然/人為的なニューロン新生のエピジェネティック制御 |
| 3. 学会等名 第14回エピジェネティクス研究会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 松田 泰斗 |
| 2. 発表標題 発達期エピゲノム変化の記憶は長期的な神経幹細胞機能異常を誘発する |
| 3. 学会等名 成体脳ニューロン新生懇談会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 松田 泰斗 |
| 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 |
| 3. 学会等名 第63回神経化学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 松田 泰斗 |
| 2. 発表標題 成体マウス脳ミクログリアから機能的なニューロンへのダイレクトリプログラミング |
| 3. 学会等名 第43回神経科学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 松田 泰斗 |
| 2. 発表標題 成体脳における自然/人為的なニューロン新生のエピジェネティック制御 |
| 3. 学会等名 エピジェネティクス研究会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 松田 泰斗 |
| 2. 発表標題 発達期エピゲノム変化の記憶は長期的な神経幹細胞機能異常を誘発する |
| 3. 学会等名 成体脳ニューロン新生懇談会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 松田 泰斗 |
| 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 |
| 3. 学会等名 神経化学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 松田 泰斗、入江 剛史、中島 欽一 |
| 2. 発表標題 成体マウス脳ミクログリアから機能的なニューロンへのダイレクトリプログラミング |
| 3. 学会等名 神経科学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Matsuda T., Irie T., Katsurabayashi S., Hayashi Y., Nakashima K. |
| 2. 発表標題 Pioneer factor NeuroD1 rearranges transcriptional and epigenetic architecture in microglia to excute neuronal reprogramming. |
| 3. 学会等名 NEUROSCIENCE 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 松田泰斗 |
| 2. 発表標題 成体海馬神経幹細胞の働きを制御する腸内細菌の同定と神経疾患治療への応用基盤の構築 |
| 3. 学会等名 2019 年度理研-九大科学技術ハブ共同研究プログラム公開キックオフセミナー (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 松田 泰斗、入江 剛史、中島 欽一 |
| 2. 発表標題 成体脳ミクログリアから機能的な神経細胞へのダイレクトリプログラミング |
| 3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 松田 泰斗 |
| 2. 発表標題 加齢に伴う神経幹細胞機能低下のメカニズム解明 |
| 3. 学会等名 「先進ゲノム支援」2019年度拡大班会議 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 松田 泰斗、入江 剛史、中島 欽一 |
| 2. 発表標題 成体脳ミクログリアから機能的な神経細胞へのダイレクトリプログラミング |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 松田 泰斗、中島 欽一 |
| 2. 発表標題 加齢に伴う神経幹細胞機能低下を誘導する原因因子の同定 |
| 3. 学会等名 「先進ゲノム支援」2018年度拡大班会議 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 松原 周蔵、村尾 直哉、松田 泰斗、中島 欽一 |
| 2. 発表標題 ヘミメチル化DNA認識因子Np95による神経幹/前駆細胞のがん抑制遺伝子及び様態の制御 |
| 3. 学会等名 次世代脳プロジェクト冬のシンポジウム |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 松原 周蔵、村尾 直哉、松田 泰斗、中島 欽一 |
| 2. 発表標題 The hemi-methylated DNA recognition factor, Np95 maintains adult hippocampal neurogenesis |
| 3. 学会等名 第16回幹細胞シンポジウム |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計3件

| | |
|---------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 松田花菜江、松田泰斗、中島欽一 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 医歯薬出版株式会社 | 5. 総ページ数 200 |
| 3. 書名 週刊医学のあゆみ | |

| | |
|---------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 松田花菜江、松田泰斗、中島欽一 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 エヌ・ティー・エス | 5. 総ページ数 270 |
| 3. 書名 ダイレクトリプログラミング | |

| | |
|---------------------|-----------------|
| 1. 著者名 松田泰斗、中島欽一 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 羊土社 | 5. 総ページ数 147 |
| 3. 書名 実験医学 | |

〔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 https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/307 |
|--|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|