

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06854

研究課題名（和文）大脳神経細胞分化における高頻度体細胞突然変異の分子メカニズム

研究課題名（英文）Mutagenesis in cortical development

研究代表者

菅生 紀之（Sugo, Noriyuki）

大阪大学・大学院生命機能研究科・特任准教授（常勤）

研究者番号：20372625

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）：マウスおよびヒトiPS細胞由来脳オルガノイドの発生過程の神経前駆細胞において、DNAポリメラーゼがエピジェネティックな遺伝子発現制御である能動的DNA脱メチル化に際してのゲノム安定性維持に不可欠であることを明らかにした。さらに、神経細胞の全ゲノム塩基配列を詳細に調べたところ、DNAポリメラーゼ欠損により神経細胞関連遺伝子のDNA脱メチル化を受けるCpG配列に高い頻度で挿入・欠失の突然変異が誘発されることを明らかにした。また、その制御に細胞内ビタミンC濃度調節が重要である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発生発達段階の神経細胞における突然変異が自閉症スペクトラ障害など脳発達障害や精神神経疾患の原因になることが示されている。しかし、いつ・どこで・どのような過程により神経細胞ゲノムにDNA損傷さらに突然変異が惹き起こされるのか、またその環境要因に関しては多くの点が不明であり学術的に極めて重要な問いである。本研究において明らかとなった神経細胞の発生・分化に不可欠な能動的DNA脱メチル化の過程におけるDNAポリメラーゼの役割は、そのメカニズム解明に向けて極めて重要な発見であり、細胞内ビタミンC濃度調節の重要性が示唆されたことは疾患の予防介入に向けた研究に貢献できる成果である。

研究成果の概要（英文）：Our research demonstrates that DNA polymerase is essential for maintaining genome stability during active DNA demethylation, which is an epigenetic control of gene expression, in neural progenitor cells of developing mouse cortex and human iPS cell-derived brain organoids. Furthermore, a comprehensive mutation analysis of the whole genome sequence of neurons revealed that DNA polymerase deficiency induces a high frequency of insertion/deletion mutations in the CpG sequences of neuronal genes. Our results also suggest that regulation of intracellular vitamin C levels may be important in controlling this mutagenesis and gene expression during cortical development.

研究分野：神経科学 分子生物学

キーワード：神経発生・分化 DNA修復 突然変異 DNAメチル化・脱メチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでの研究で DNA ポリメラーゼ β (Polβ) の神経前駆細胞での役割としてエピジェネティックな遺伝子発現制御であるメチル化シトシンの能動的 DNA 脱メチル化経路においてシトシンの再合成に寄与していること、Polβ を欠損すると重篤な DNA 損傷である DNA 2 本鎖切断 (DSBs) が蓄積して神経細胞に分化した直後にアポトーシスが誘導されることを明らかにしている (Sugo N, et al., EMBO J, 2000; Onishi K, et al., J Neurosci, 2017)。さらに、生後発達期においても再び同様の役割が海馬神経細胞の分化に必要であり、その影響は遺伝子発現や樹状突起形態の異常、成体における学習・記憶や不安様行動の異常に繋がることを明らかにしている (Uyeda A, et al., J Neurosci, 2020)。これらの結果は、発生と発達初期の神経細胞においてゲノム不安定な時期が一過的にあり、それは長期的に成体での脳機能に影響を及ぼす可能性を示唆するものである。この一過的なゲノム不安定性は体細胞突然変異の起因となり、重度の場合は精神神経疾患に結びつくが、正常な脳でのわずかな調節領域における変異は逆に神経細胞の遺伝子発現に多様性を導くメカニズムとしてプラスに働き長期的に脳機能に寄与しているのかもしれないと本研究を着想するに至った (図 1)。

(2) 加えて、環境要因としてビタミン C の重要性を考えるに至っている。モルモットはヒトと同様にビタミン C を生合成できないが、ビタミン C 不含栄養条件で飼育発達させると学習・記憶能力が低下することが知られている。ビタミン C を生合成できない遺伝子改変マウスでも不安様行動の異常が示されている。注目すべきことに、脳組織と脳脊髄液は他の組織に比べてビタミン C 濃度が 10 倍程度と極めて高い上に、神経細胞内への取込みに重要とされるトランスポーター Slc23a2 の発現は神経細胞の発生分化と発現量に相関が認められる。詳細は不明であるが、欠損マウスは脳に異常を示し出生直後致死となる (Sotiriou S, Nat Med, 2002)。さらに申請者らの研究で、in vivo の Polβ 欠損神経細胞で観察される DSBs の蓄積は、組織を分散してビタミン C を含まない条件で細胞培養すると観察されないが、脳脊髄液と同程度の濃度で添加すると数多くの DSBs が観察されることが示された (Uyeda A, et al., J Neurosci, 2020)。つまり、神経細胞分化においてビタミン C の細胞内への積極的な取込みが TET タンパク質による能動的 DNA 脱メチル化の開始に不可欠であると共に、ゲノム不安定化の要因にも成り得ることが示唆される (図 1)。

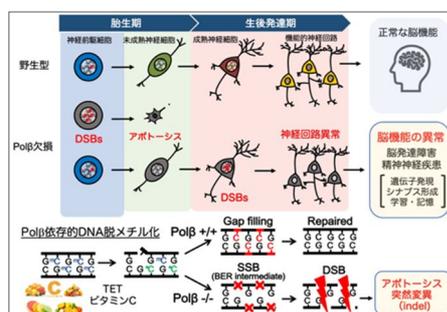


図 1 発生発達期の神経細胞における Pol 依存の能動的 DNA 脱メチルの破綻によるゲノム不安定性は脳機能に異常をもたらす。ビタミン C 調節がどのように関わるのだろうか

(3) 米国国立精神衛生研究所 NIMH を中心に Brain Somatic Mosaicism Network と称した研究チームにより精神疾患患者の死後脳を材料にシングルセル全ゲノム塩基配列解析 (WGS) が進められており、疾患に関連する体細胞突然変異が数多く同定されることが期待されている (McConnell MJ, et al., Science, 2017)。しかし、なぜ神経細胞の発生分化に際して高頻度突然変異が誘発されるのかという根本的な問題を残しており、周産期の DNA 修復や栄養環境の観点から取組むべき数多くの問題を含んでいるが不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) 次世代シーケンサー (NGS) によるゲノム塩基配列の解析能力向上によって、ヒト神経細胞の発生発達において孤発的な体細胞突然変異 (塩基変異、挿入や欠失、遺伝子コピー数変化) が免疫系に次いで他の組織に比べて非常に高頻度で誘発されることが示されている (1 塩基変異の場合で 50 ~ 100 倍以上、Bae T, et al., Science, 2018)。これは脳のモザイク性として知られており、精神疾患においては、そのような突然変異が通常より多く生じたことが起因となることが近年明らかとなってきている (McConnell MJ, et al., Science, 2017)。例えばヒト死後脳の神経細胞を用いたシングルセルゲノム解析により、大脳皮質の僅か数 ~ 10% 程度の数の神経細胞における体細胞突然変異が起因と考えられる発達障害や精神疾患が示唆されている (Poduri A, et al., Science, 2013)。しかし、いつ・どこで・どのような過程により神経細胞ゲノムに DNA 損傷さらに体細胞突然変異が高頻度で惹き起こされ、遺伝子発現や神経回路形成に影響するのか、またその環境要因に関しては多くの点が不明でありメカニズムの解明は学術的に極めて重要な問いである (図 2)。

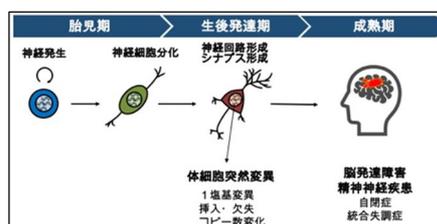


図 2 神経細胞の発生発達期のいつ・どこで・なぜ高頻度に体細胞突然変異は誘発されるのか。

(2) ゲノム安定性を担う DNA 修復酵素のノックアウトマウスは、神経細胞分化において異常な細胞死を示すことが知られている。この時期のゲノム不安定性が体細胞突然変異の起因となる可能性を調べることは極めて重要であると考えられる。申請者らのこれまでの研究において、そのような DNA 修復酵素の一つである Polβ は神経細胞分化にプログラムされたエピジェネティック制御である能動的 DNA 脱メチル化(DNA 複製を必要とせずメチル化シトシン mCpG から CpG に変換する)においてゲノム安定性維持に必要であることを示している(Onishi K, et al., J Neurosci, 2017; Uyeda A, et al., J Neurosci, 2020)。本研究では、神経細胞分化における高頻度体細胞突然変異の発生メカニズムの解明を目的とし、大脳特異的 Polβ 欠損マウスとヒト iPS 細胞由来大脳オルガノイドを高感受性モデルとして神経細胞ゲノムにどのように突然変異を誘発し、発生発達に影響するのかを調べる。さらに、環境要因としてこの過程の開始に必要な酵素 TET の補因子であるアスコルビン酸(ビタミン C: ヒトは生合成できない)に着目し、胎児期および発達期の栄養環境がエピゲノム調節に加えてゲノム安定性維持に及ぼす影響を調べ、脳発達障害や精神疾患の予防に向けた研究に展開する。

3. 研究の方法

(1) ゲノム不安定性を起因とした神経細胞の体細胞突然変異をクローンマウス作製技術を用いた WGS により明らかにする。

Polβ 欠損マウス神経細胞において DSBs は胎生期および発達期に一過的に観察され、その後消失することを見つけている。つまり DSB 修復されていると考えられるが、最終分裂を終えた神経細胞では正確な相同組換えは機能せず、挿入・欠失といったエラーが発生しやすい非同末端結合(NHEJ)によって修復されていると考えられる。神経細胞分化の遺伝子発現制御における DNA 脱メチル化の役割を考えると、メチル化 CpG の多い遺伝子のエンハンサー/プロモーター領域に体細胞突然変異が蓄積することが予想される。しかし、メチル化 CpG は 1 つの遺伝子に多数箇所存在し、細胞個々でメチル化パターンが異なることが想定される。そこで、シングルセル WGS(試験管内で 1 細胞のゲノム DNA を増幅する。)を行うことが一つの方法であるが、本申請では、大脳皮質神経細胞の核を用いてマウスクローン胚を作製し、その胚盤胞から ES 細胞を樹立(ES 細胞として神経細胞ゲノムを増幅する。より正確性が高いと考えられる。)して WGS を行うことを試みた(図 3)。

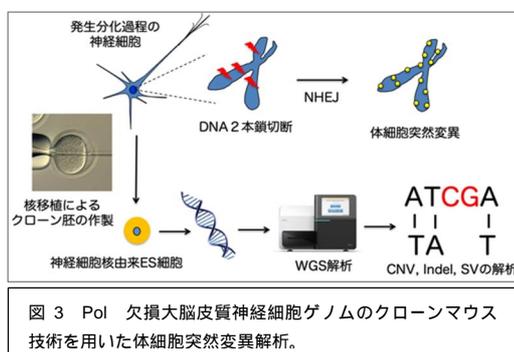


図 3 Polβ 欠損大脳皮質神経細胞ゲノムのクローンマウス技術を用いた体細胞突然変異解析。

(2) Polβ 欠損ヒト iPS 細胞由来大脳オルガノイドを用いて精神神経疾患の原因となる体細胞突然変異を *in vitro* で調べる。

ヒトとマウスのゲノムにおいては遺伝子座のシンテニーが認められるが、転写調節領域や染色体構造は大きく異なり、脳発生発達に必要な期間も違うことからマウスを用いた解析ではヒト精神神経疾患で同定されているゲノム異常を同様に発見することは困難であると考えられる。ヒト脳形成での研究を進めるため、ヒト iPS 細胞由来大脳オルガノイドを用いて Polβ 依存的 DNA 脱メチル化機構の破綻が疾患に繋がる突然変異の起因となる可能性を調べる。つまり、これまでに精神神経疾患と関連付けられデータベース化されている体細胞突然変異を試験管内で再現し解析することを試みた。

(3) TET タンパク質の酵素活性調節を担う補因子ビタミン C のトランスポーターに着目し、そのエピゲノムとゲノム安定性さらに脳機能への影響を明らかにする。

Polβ 依存的 DNA 脱メチル化において 5hmC 化を誘導する TET の補因子であるビタミン C のトランスポーター Slc23a2 の役割を神経細胞特異的遺伝子破壊によって調べる。CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術で Slc23a2 cKO マウスを作製し、PolβcKO マウスと掛け合わせることで遺伝学的に調べた。また、免疫組織化学的解析を行い脳機能に及ぼす影響を調べた。

4. 研究成果

(1) クローンマウス作製技術を用いて、胎生 18.5 日胚野生型および Polβ 欠損大脳皮質神経細胞由来の細胞核を持つ ES 細胞株を複数樹立した。それら細胞から抽出されたゲノム DNA を用いて、次世代シーケンサーにより WGS を行なった。その配列情報を用いて、個々の神経細胞に特有の体細胞突然変異を同定した。その結果、Polβ 欠損では DNA メチル化部位である CpG 配列の近傍において有意に高い頻度で挿入・欠失が発生していることを明らかにすることができた。また、神経系で発現する遺伝子領域で多数検出されたことから、神経発生・分化に際しての Polβ 依存的能動的 DNA 脱メチル化の破綻による突然変異であることが強く示唆される。この結果は学会にてポスター発表と口頭発表を行った。

(2) DNA ポリメラーゼ β 欠損ヒト iPS 細胞から大脳オルガノイドを作製して、神経細胞分化過程におけるゲノム不安定性を調べた。その結果、Polβ 欠損神経前駆細胞において DSBs が増

加し神経細胞死に至ること明らかにした。神経・発生分化におけるヒトとマウスの類似性と共に疾患に繋がる突然変異形成の分子メカニズムである可能性として学会にて招待講演を行った。突然変異解析は現在継続中である。

(3) 環境要因として能動的 DNA 脱メチル化に関わる因子であるビタミン C に着目して、ゲノム編集技術を用いて大脳皮質興奮性神経細胞特異的ビタミン C トランスポーターSlc23a2 欠損マウスの作製を試み、成功した。このマウスはこれまでに報告のあった Slc23a2 を全身性に欠損しているマウスとは異なり生存可能であった。詳細は現在解析中であるが、少なくとも発生過程において大規模な細胞死などは観察されていない。DNA メチル化への影響を現在解析中である。さらに、Slc23a2 と Polβ が共に欠損するマウスの作出にも成功した。Polβ 欠損で観察される神経細胞死が、Slc23a2 をさらに欠損させることで顕著に減少することを発見した。能動的 DNA 脱メチル化が抑制された結果であることが示唆される。この成果は、学会にてポスター発表を行なった。

<引用文献>

Bae T, et al., Different mutational rates and mechanisms in human cells at pregastrulation and neurogenesis. **Science**, 359:550-555 (2018)

McConnell MJ, et al., Intersection of diverse neuronal genomes and neuropsychiatric disease: The Brain Somatic Mosaicism Network. **Science**, 356: eaal1641 (2017)

Onishi K, et al., Genome Stability by DNA polymerase in Neural Progenitors Contributes Neuronal Differentiation in Cortical Development. **J Neurosci**, 37:8444-8458 (2017)

Poduri A, et al., Somatic mutation, genomic variation, and neurological disease. **Science**, 341: 1237758 (2013)

Sotiriou S, et al., Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival. **Nat Med**, 8: 514-517 (2002)

Sugo N, et al., Neonatal lethality with abnormal neurogenesis in mice deficient in DNA polymerase . **EMBO J** 19:1397-1404 (2000)

Uyeda A, et al., Suppression of DNA Double-Strand Break Formation by DNA polymerase in Active DNA Demethylation is Required for Development of Hippocampal Pyramidal Neurons. **J Neurosci**, 40, 9012-9027 (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅生紀之, 馬淵博基, 樋口真弓, 荒木喜美, 八木健
2. 発表標題 大脳皮質の神経発生においてビタミンCトランスポーターSlc23a2はDNAポリメラーゼ 依存的DNA脱メチル化経路を調節する
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 神吉暁, 馬淵博基, 樋口真弓, 荒木喜美, 八木健, 菅生紀之
2. 発表標題 大脳神経前駆細胞においてビタミンCはPol 依存的能動的DNA脱メチル化を調整しゲノム安定性に寄与する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菅生 紀之、松本 理沙、中山 宙、松本 敏幸、藤本 翔太、佐藤 康成、若山 清香、若山 照彦、内村 有邦、八木 健
2. 発表標題 DNAポリメラーゼ 欠損は大脳皮質神経細胞の発生において体細胞突然を誘発させる
3. 学会等名 NEURO2022 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅生 紀之
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来大脳オルガノイドの神経発生においてDNAポリメラーゼ 欠損はDNA 2本鎖切断を引き起こす
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第65回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千葉清歌、増田光起、恒松大翔、黒沢綾、足立典隆、山本亘彦、八木健、菅生紀之
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来大脳オルガノイドにおいてDNAポリメラーゼ 欠損は神経前駆細胞にDNA2本鎖切断を引き起こす
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本 理沙, 中山 宙, 松本 敏幸, 藤本 翔太, 佐藤 康成, 若山 清香, 若山 照彦, 内 村 有邦, 八木 健, 菅生 紀之
2. 発表標題 体細胞核由来クローンES細胞の全ゲノム解析によるDNAポリメラーゼ 欠損マウス大脳皮質神経細胞の突然変異解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本翔太、松本敏幸、植田堯子、山本亘彦、八木健、菅生紀之
2. 発表標題 大脳皮質神経細胞においてビタミンCトランスポーターSlc23a2の過剰発現は能動的DNA脱メチル化を介してDNA 2本鎖切断を誘発する
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅生紀之
2. 発表標題 DNA polymerase contributes to genome stability in developing cortical neurons
3. 学会等名 遺伝研研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院生命機能研究科
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp>

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