

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20622

研究課題名（和文）ヒト神経分化モデルにおける網羅的エンハンサー制御アトラスから迫る病態解明

研究課題名（英文）A comprehensive enhancer atlas of a human neuronal differentiation model to elucidate the pathophysiology of neuronal disorders

研究代表者

吉原 正仁 (Yoshihara, Masahito)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：70807065

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト神経分化モデルとして、中脳由来神経前駆細胞株（LUHMES）の分化段階におけるプロモーターの活性変動の計測、エンハンサー領域の網羅的同一・活性変動の計測を行った。これにより、4万以上のエンハンサー領域が神経分化段階で活性化していることが明らかとなった。さらに高次クロマチン構造解析により、プロモーター・エンハンサーの相互作用も明らかにした。同一されたエンハンサー領域には神経・精神疾患関連遺伝子多型が高密度に濃縮しており、神経発生・分化に關与する遺伝子の発現を制御することが示唆された。これらの成果は現在、筆頭著者論文として国際誌に投稿中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノムワイド関連解析（GWAS）により、多くの疾患関連一塩基多型（SNP）が同一されてきたが、疾患関連SNPによる疾患発症の機序は殆どが明らかとなっていない。本研究により、神経分化段階で活性化するエンハンサー領域に神経・精神疾患関連SNPが濃縮していることが明らかとなり、それらのエンハンサーの標的候補遺伝子の検出にも成功した。本研究によって得られた知見は、これまで明らかとなっていなかった神経・精神疾患の病態解明や治療開発に貢献できることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Using a human mesencephalic neuronal cell differentiation model LUHMES, we measured the activities of promoters and enhancers and identified over 40,000 active enhancer regions. DNA conformation analysis further revealed the dynamics of promoter-enhancer interactions during neuronal differentiation. The identified enhancer regions showed a significant enrichment of neurological and psychiatric disease-associated polymorphisms, suggesting that they regulate the expression of genes related to neurological functions. These results are currently being submitted to an international journal.

研究分野：トランスクリプトーム

キーワード：エンハンサー プロモーター 転写制御 疾患関連SNP 神経分化 Hi-C

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノムワイド関連解析(GWAS)により、これまで様々な疾患に対して疾患関連一塩基多型(SNP)が同定されてきたが、その多くは遺伝子の非翻訳領域に存在し (Maurano et al. *Science*, 2012)、生物学的解釈が困難となっている。このため、病態解明や治療開発には十分な成果が得られていない。

近年、これらの SNP がエンハンサー領域に濃縮していることが明らかとなった (Farh et al. *Nature*, 2015)。エンハンサーの同定手法としては、ヒストン修飾に対する Chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) が主に用いられているが、高塩基解像度での同定が困難である。一方、Cap analysis of gene expression (CAGE) 法は、エンハンサー領域の両端から双方向性に転写されるエンハンサーRNA (eRNA) の転写開始点を一塩基レベルで検出するため、高解像度で同定できる。我々は CAGE 法により同定されたエンハンサー領域に、疾患関連 SNP が高密度に濃縮することを報告した (Murakawa, Yoshihara et al. *Trends Genet*, 2016)。さらに、より高感度に新生鎖 RNA を検出する Native Elongating Transcript (NET)-CAGE 法 (Hirabayashi et al. *Nat Genet*, 2019) をヒト ES 細胞に適用し、数万の新規エンハンサー領域を同定した (Vuoristo, Yoshihara et al. *iScience*, 2022)。

エンハンサーは概して細胞種特異的であり、自己免疫疾患においては血球細胞を容易に入手できるため、疾患関連 SNP の機能解析が進んでいるが、神経疾患においては未だ十分な検討がなされておらず、疾患関連 SNP の機能解析が望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究は、神経分化段階で活性化するエンハンサー領域に存在する神経疾患関連 SNP を網羅的に同定し、これらのエンハンサーの標的遺伝子の同定を目指す。これにより構築されたデータは、未だ明らかとなっていない神経疾患の病態解明や治療開発の基盤となりうる。

## 3. 研究の方法

本研究では、ヒト神経分化モデルとして、ヒト中脳由来神経前駆細胞株 (LUHMES) を使用した。

我々はこれまでの研究で、LUHMES の分化段階における遺伝子発現変動が、生体内の神経発生段階を模倣することを示した (Lauter, Yoshihara et al. *J Cell Sci*, 2020)。そこで、分化誘導後 1 日目、3 日目、6 日目の細胞を回収し、CAGE 法ならびに NET-CAGE 法を用いた解析により、プロモーター・エンハンサー領域の網羅的同定・活性定量を行った。ただし、エンハンサー領域を同定できても、その標的遺伝子は何万塩基対も離れた位置に存在することもあるため、その同定は困難である。そこで、プロモーター・エンハンサーの相互作用の同定を目指し、Capture Hi-C 法による高次クロマチン構造解析を行った。最後に、同定されたエンハンサー領域と標的候補遺伝子について、ゲノム編集技術(CRISPR 遺伝子活性化システム)を用いた検証実験を行った。

## 4. 研究成果

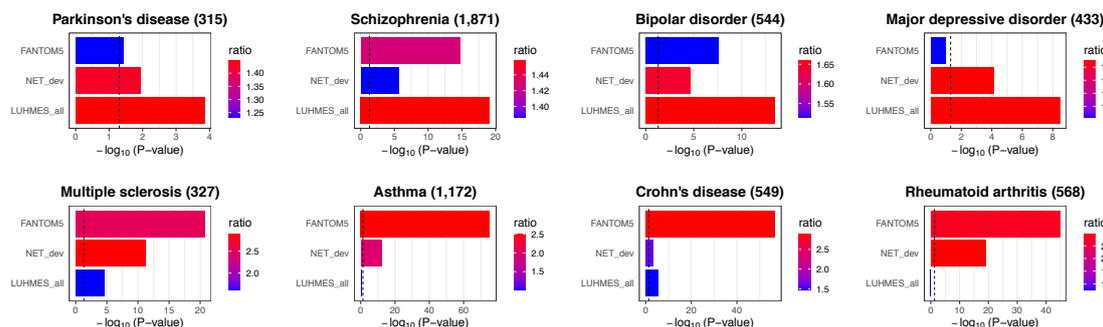
### (1) NET-CAGE 法を用いた神経分化段階で活性化するエンハンサー領域の網羅的同定

まず、LUHMES の分化段階に NET-CAGE 法を適用することで、これまで同定されていなかった新規エンハンサー領域を含む、47,350 もの活性化エンハンサー領域の同定に成功した。FANTOM5 データベースを参照したところ、既知のエンハンサー領域は脳特異的に活性化するエンハンサー領域が濃縮しており、一方、新規に同定されたエンハンサー領域は神経前駆細胞で高発現する転写因子である NEUROD1 の結合モチーフが有意に濃縮していた。FANTOM5 データベースには神経前駆細胞や分化段階の神経細胞が含まれてないことから、新規に同定されたエンハンサー領域の多くは、神経分化段階に特異的に活性化するものであることが示唆された。

### (2) 神経分化段階で活性化するエンハンサー領域と神経疾患関連 SNP の統合解析

次に、既報のエンハンサー領域および本研究で同定された神経分化段階で活性化するエンハンサー領域における疾患関連 SNP の分布を検討した。既報のエンハンサー領域としては、i) 多種多様な正常組織・細胞に CAGE 法を適用して同定された FANTOM5 プロジェクトの 65,423 領域 (Andersson et al. *Nature*, 2014; Arner et al. *Science*, 2015) および ii) 5 種のがん細胞株に NET-CAGE 法を適用して同定された 20,363 領域 (Hirabayashi et al. *Nat Genet*, 2019) を使用した。

その結果、Parkinson 病や統合失調症、双極性障害などの神経・精神疾患関連 SNP は本研究で同定された神経分化段階で活性化するエンハンサー領域に有意に濃縮していた。一方、多発性硬化症や関節リウマチといった自己免疫疾患関連 SNP は既報のエンハンサー領域、特に FANTOM5 プロジェクトで同定されたエンハンサー領域に高密度に濃縮していることが明らかとなった。



(図) 上：神経・精神疾患関連 SNP、下：自己免疫疾患関連 SNP の各エンハンサー領域におけるエンリッチメント解析

FANTOM5: FANTOM5 プロジェクトで同定された 65,423 領域、NET\_dev: NET-CAGE 開発プロジェクトで同定された 20,363 領域、LUHMES\_all: 本研究で同定された 47,350 領域。

### (3) 神経分化段階におけるプロモーター・エンハンサーの相互作用の同定

最後に、同定されたエンハンサー領域とプロモーター領域の相互作用を確認するため、LUHMES の分化段階に Capture Hi-C 法を適用することで、高次クロマチン構造解析を行った。同定されたエンハンサー領域と相互作用する領域には神経発生・分化に関連する遺伝子が有意に濃縮していた。

ここでは 2 つの相互作用に着目した。i) Parkinson 病関連 SNP を含むエンハンサー領域と *SNCA* 遺伝子のプロモーター領域の相互作用、および ii) 統合失調症関連 SNP を含むエンハンサー領域と *POU6F2* 遺伝子のプロモーター領域の相互作用である。これらについて、CRISPR 遺伝子活性化システムを用いてプロモーター・エンハンサー領域を活性化させたところ、それぞれ、標的遺伝子である *SNCA* 遺伝子、*POU6F2* 遺伝子の発現が有意に上昇した。以上の結果から、同定されたエンハンサー領域がこれらの標的遺伝子の発現を制御することが示された。

本研究により、ヒト神経分化段階で活性化するエンハンサー領域が網羅的に同定され、それらの標的候補遺伝子の同定にも成功した。同定されたエンハンサー領域には神経・精神神経疾患関連 SNP が高密度に濃縮していたことから、これらの疾患関連 SNP がエンハンサーの標的遺伝子の発現に影響し、疾患発症に関与することが示唆される。本研究によって得られた知見は、未だ明らかとなっていない神経・精神疾患の病態解明や治療開発の基盤となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 10件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Coschiera Andrea, Yoshihara Masahito, Lauter Gilbert, Ezer Sini, Kere Juha, Swoboda Peter	4. 巻 -
2. 論文標題 Primary cilia promote the differentiation of human neurons through the WNT signaling pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.04.06.535895	査読の有無 無
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 該当する
1. 著者名 Coschiera Andrea, Yoshihara Masahito, Lauter Gilbert, Ezer Sini, Pucci Mariangela, Li Haonan, Kavsek Alan, Riedel Christian G., Kere Juha, Swoboda Peter	4. 巻 22
2. 論文標題 Primary cilia promote the differentiation of human neurons through the WNT signaling pathway	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-024-01845-w	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 該当する
1. 著者名 Yoshihara Masahito, Kere Juha	4. 巻 18
2. 論文標題 Transcriptomic differences between human 8-cell-like cells reprogrammed with different methods	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1621 ~ 1628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2023.06.009	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 該当する
1. 著者名 Hosaka Kayoko, Wang Chenchen, Zhang Shiyue, Lv Xue, Seki Takahiro, Zhang Yin, Jing Xu, Wu Jieyu, Du Qiqiao, He Xingkang, Fan Yulong, Li Xuan, Kondo Makoto, Yoshihara Masahito, Qian Hong, Shi Lihong, Zhu Ping, Xu Yuanfu, Yang Yunlong, Cheng Tao, Cao Yihai	4. 巻 43
2. 論文標題 Perivascular localized cells commit erythropoiesis in PDGF B expressing solid tumors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Communications	6. 最初と最後の頁 637 ~ 660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cac2.12423	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 該当する

1. 著者名 Gawriyski L, Jouhilahti EM, Yoshihara M, Fei L, Weltner J, Airene TT, Trokovic R, Bhagat S, Tervaniemi MH, Murakawa Y, Salokas K, Liu X, Miettinen S, Burglin TR, Sahu B, Otonkoski T, Johnson MS, Katayama S, Varjosalo M, Kere J.	4. 巻 26
2. 論文標題 Comprehensive characterization of the embryonic factor LEUTX	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106172 ~ 106172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106172	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 該当する

1. 著者名 Kaemena Daniel F., Yoshihara Masahito, Beniazza Meryam, Ashmore James, Zhao Suling, Bertenstam Marten, Olariu Victor, Katayama Shintaro, Okita Keisuke, Tomlinson Simon R., Yusa Kosuke, Kaji Keisuke	4. 巻 14
2. 論文標題 B1 SINE-binding ZFP266 impedes mouse iPSC generation through suppression of chromatin opening mediated by reprogramming factors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-36097-9	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 該当する

1. 著者名 Yoshihara Masahito, Wagner Magdalena, Dandimopoulos Anastasios, Zhao Cheng, Petropoulos Sophie, Katayama Shintaro, Kere Juha, Lanner Fredrik, Dandimopoulou Pauliina	4. 巻 41
2. 論文標題 In Reply: Revisiting Claims of the Continued Absence of Functional Germline Stem Cells in Adult Ovaries	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 205 ~ 206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/stmcls/sxac084	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 該当する

1. 著者名 Yoshihara Masahito, Wagner Magdalena, Dandimopoulos Anastasios, Zhao Cheng, Petropoulos Sophie, Katayama Shintaro, Kere Juha, Lanner Fredrik, Dandimopoulou Pauliina	4. 巻 41
2. 論文標題 The Continued Absence of Functional Germline Stem Cells in Adult Ovaries	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 105 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/stmcls/sxac070	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 該当する

1. 著者名 Seki Takahiro, Yang Yunlong, Sun Xiaoting, Lim Sharon, Xie Sisi, Guo Ziheng, Xiong Wenjing, Kuroda Masashi, Sakaue Hiroshi, Hosaka Kayoko, Jing Xu, Yoshihara Masahito, Qu Lili, Li Xin, Chen Yuguo, Cao Yihai	4. 巻 608
2. 論文標題 Brown-fat-mediated tumour suppression by cold-altered global metabolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 421 ~ 428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-05030-3	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 該当する

1. 著者名 Yoshihara Masahito, Kirjanov Ida, Nyk?nen Sonja, Sokka Joonas, Weltner Jere, Lundin Karolina, Gawryiski Lisa, Jouhilahti Eeva-Mari, Varjosalo Markku, Tervaniemi Mari H., Otonkoski Timo, Trokovic Ras, Katayama Shintaro, Vuoristo Sanna, Kere Juha	4. 巻 17
2. 論文標題 Transient DUX4 expression in human embryonic stem cells induces blastomere-like expression program that is marked by SLC34A2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1743 ~ 1756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2022.06.002	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 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉原 正仁
2. 発表標題 ヒト8細胞期胚様細胞(8CLCs)の作製およびトランスクリプトーム比較解析
3. 学会等名 幹細胞を用いた化学物質リスク情報共有化コンソーシアム 第5回研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉原 正仁, Juha Kere
2. 発表標題 ヒト8細胞期胚様細胞 (8CLCs)の網羅的遺伝子発現比較解析
3. 学会等名 NGS EXPO 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉原 正仁
2. 発表標題 新規初期化因子によるヒト初期胚様幹細胞の作製
3. 学会等名 アステラス病態代謝研究会 第53回研究報告会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉原 正仁, Ida Kirjanov, Sonja Nykanen, Sanna Vuoristo, Juha Kere
2. 発表標題 シングルセルトランスクリプトームデータを活用したヒト8細胞期胚様細胞の作製
3. 学会等名 NGS EXPO 2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者：60名（吉原 正仁を含む）、技術情報協会	4. 発行年 2023年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 605
3. 書名 ゲノム編集の最新技術と医薬品・遺伝子治療・農業・水畜産物・有用物質生産への活用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

スウェーデン	Karolinska Institutet	KTH Royal Institute of Technology		
フィンランド	University of Helsinki			