様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ４ 月 １４ 日現在

機関番号：１４６０３
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2023～2024
課題番号：２３Ｋ１８４５１

研究課題名（和文）幹細胞老化機構の解明とリプログラミングに基づく健康脳機能の再生

研究課題名（英文）Elucidation of stem cell aging mechanisms and regeneration of brain functions based on reprogramming technology

研究代表者
松田　泰斗（Matsuda, Taito）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：１０７５６９９３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、成体海馬の神経幹細胞（NSC）が加齢とともに機能低下する分子基盤を明らかにした。シングルセルRNA-seqおよびATAC-seqにより、加齢初期からNSCの転写・クロマチン構造に段階的な変化が生じることを明らかにし、その原因としてヒストンH4K20me1修飾酵素Setd8の発現低下を同定した。Setd8を欠損させるとNSCの増殖能や神経新生が低下し、記憶機能が障害される。Setd8の発現低下は加齢に伴う遺伝子発現・エピゲノム変化を再現し、早期老化を引き起こすことが示された。本研究は、加齢初期におけるNSC老化の新たなエピゲノム制御機構を明らかにしたものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究は、成体海馬の神経幹細胞における加齢初期の機能低下の分子基盤として、ヒストン修飾酵素Setd8の発現低下が転写・クロマチン変化を引き起こすことを初めて示した。老化は治療困難とされてきたが、本研究により可逆的なエピゲノム制御による若返りの可能性が示され、将来的な認知症予防や老化抑制の新たな標的分子の発見につながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated the early molecular mechanisms of neural stem cell (NSC) aging in the adult mouse hippocampus. Using integrated single-cell RNA-seq and ATAC-seq analyses, we discovered progressive transcriptional and chromatin changes from neonatal to mature stages. We identified that the downregulation of Setd8, an enzyme responsible for H4K20 monomethylation, plays a central role in this process. By conditionally deleting Setd8 in NSCs, we observed impaired proliferation, reduced neurogenesis, and hippocampus-dependent memory deficits. Furthermore, Setd8 knockdown in vitro reproduced age-like transcriptomic and epigenomic profiles, including quiescence and senescence signatures. Importantly, we demonstrated that Setd8-dependent loss of NSC function is reversible upon restoration. Our findings reveal that Setd8 downregulation drives early-stage NSC aging through epigenetic remodeling and suggest that targeting this pathway may prevent age-related cognitive decline.

研究分野：神経科学

キーワード：リプログラミング　神経幹細胞　エピジェネティクス　神経細胞

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　C－１９、F－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

超高齢化社会の到来に伴い、加齢に伴う認知機能低下のメカニズム解明および、健康脳機能を再生する、「ヘルスルネサンス」が強く求められている。これまでの研究から、成体脳海馬に存在する神経幹細胞の増殖能は、加齢に伴って低下し、その結果、幹細胞が枯渇するとともにニューロン新生が減少することが、老化に伴う学習・記憶能力低下の原因の一つと考えられている [Moreno-Jiménez1 et al., Nat Med, 2019]。しかし、多くの先行研究は成体ニューロン新生低下がほぼプラトーに達した生後１年以上のマウスを対象としていたため（図 1）、加齢に伴う神経幹細胞機能低下の起点となる最初期トリガー因子は明らかにされていない。また、神経幹細胞機能を継続的に改善する方法も見つかっていない。我々は、幼齢期（出生後５日）、若齢期（12 週）、中齢期（24 週）のマウス海馬から神経幹細胞を単離し、加齢に伴った段階的な scRNA-seq を実施することで、神経幹細胞機能低下を誘導する最初期トリガー因子の同定が可能ではないか、と着想した。また、細胞固有の遺伝子発現の根幹であるエピジェネティクスを制御する因子に着目することで、エピゲノムの巻き戻しによる継続的な神経幹細胞若返りが可能と考えた。

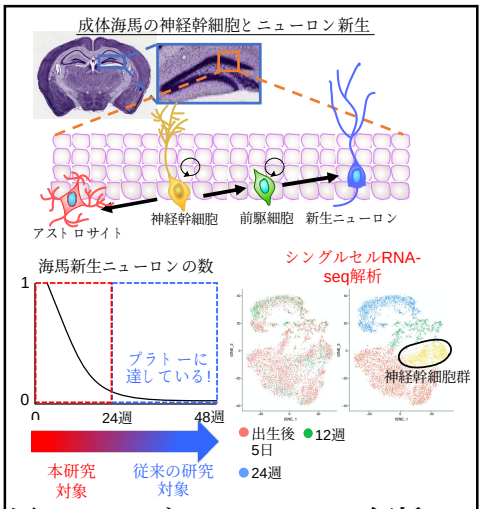

図 1: シングルセル RNA-seq 解析による神経幹細胞機能低下機構の理解

２．研究の目的

本研究は、加齢過程における神経幹細胞のシングルセル (sc) RNA-seq 解析により同定した、Setd8 (ヒストンメチル基転移酵素) に着目して、神経幹細胞機能低下の分子基盤を解明し、神経幹細胞若返り法を創出することで、加齢に伴う学習・記憶障害改善を目指した。

３．研究の方法

(1) 神経幹細胞トランスクリプトーム解析と機能低下を誘発する候補因子選定

我々は、神経幹細胞特異的遺伝子 Nestin のプロモーター制御下で EGFP を発現する Nestin-EGFP マウスを用いて、幼齢期、若齢期、中齢期の海馬から、EGFP の蛍光を指標に神経幹細胞を単離し、scRNA-seq 解析を実施することで、神経幹細胞の増殖能低下を招く原因因子を探索した。

(2) 成体海馬神経幹細胞における Setd8 の機能解析

Setd8 flox/flox マウスと Nestin-CreERT2 マウスを交配させ、タモキシフェン投与により、幼齢期および若齢期の神経幹細胞特異的に Setd8 を欠損させることで、神経幹細胞機能低下が観察されるのかどうかを免疫染色により明らかにした。また、Setd8 欠損マウスを用いて、海馬依存的記憶試験を実施し、学習・記憶障害の有無を調べた。

(3) Setd8 による神経幹細胞制御機構解明

Setd8 の発現を抑制した神経幹細胞を用いて、ATAC-seq および H4K20me1 に対する ChIP-seq を行い、Setd8 活性低下に伴う遺伝子発現・クロマチン構造の変化を詳細に解析した。さらに、Setd8 阻害剤を用いた可逆性の検討も実施した。

４．研究成果

本研究では、成体マウス海馬の神経幹細胞（NSC）が加齢とともに示す分子変化に着目し、エピゲノム・トランスクリプトームの両面から老化機構を包括的に解析した。まず、Nestin-EGFP マウスの海馬より、幼若期（P5）、若齢期（12 週齢）、中齢期（24 週齢）の神経幹細胞およびその分化系列を単離し、scRNA-seq および scATAC-seq を実施した。その結果、NSC やその子孫細胞において、年齢とともに転写プロファイルおよびクロマチンアクセシビリティに連続的な変化が生じることが明らかとなった。特に、NSC ではヒストン H4 のリジン 20 番目のモノメチル化（H4K20me1）を担う唯一の酵素である Setd8 の発現が加齢とともに顕著に低下しており、これに伴い H4K20me1 レベルも減少していた。*in vitro* の NSC 培養系において Setd8 を shRNA や CRISPR-Cas9 により抑制あるいは欠損させたところ、細胞の増殖能が有意に低下し、細胞死を伴わずに老化様のトランスクリプトーム・エピゲノム変化が誘導された。これにより、Setd8 の発現低下が NSC 機能の初期低下に寄与することが示唆された。

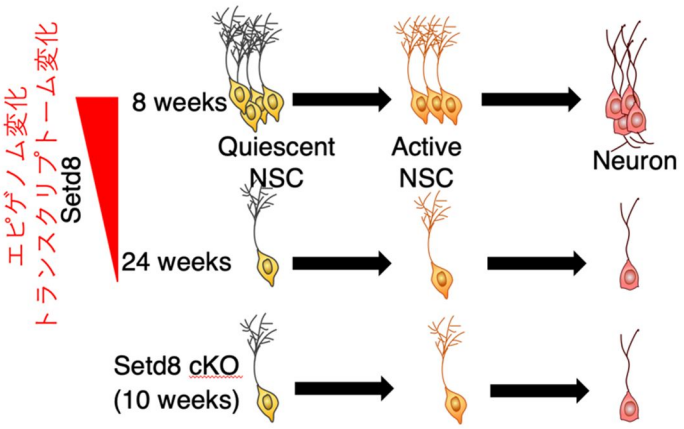

図 2：Setd8 発現低下は加齢に伴う神経幹細胞の機能低下の原因となる

Setd8 flox/flox マウスと Nestin-CreERT2 マウスを交配し、成体 NSC 特異的に Setd8 を欠損させた条件付きノックアウト（cKO）マウスを作製した。タモキシフェン投与により Setd8 を欠損させたマウスでは、NSC の数が有意に減少し、さらに新生ニューロンや神経分化細胞の数も低下していた。また、海馬依存的な行動試験（場所認識記憶試験）を実施した結果、記憶機能の障害が観察された。これらの結果は、Setd8 の機能喪失が神経幹細胞の活性および海馬神経新生を阻害し、脳機能の低下を招くことを示していた。

さらに、Setd8 の発現を抑制した NSC の RNA-seq および ATAC-seq、ChIP-seq 解析により、H4K20me1 修飾の減少が遺伝子発現の抑制と対応し、特に幹細胞性維持や神経分化に関わる転写因子結合部位においてクロマチンが閉鎖的になることが確認された。Setd8 ノックダウンにより誘導される遺伝子発現変化は、加齢に伴う NSC の自然な遺伝子変化と有意に一致しており、Setd8 の発現低下が加齢様変化を駆動する因子であることが強く示された。

加えて、Setd8 阻害剤を用いた実験では、H4K20me1 の低下と NSC 増殖抑制が可逆的であり、阻害剤除去後にこれらが回復することが示された。これは、初期段階における NSC 老化が介入可能であることを示唆していた。

以上の結果より、Setd8 は成体海馬 NSC の加齢初期における機能低下を引き起こす中核的なトリガー因子であり、その発現の減少が転写・エピゲノム変化を通じて老化表現型を誘導することが明らかとなった（図 2）。これらの結果は論文として投稿した(印刷中)。本研究は、NSC の機能的老化の起点となる分子機構を初めて明らかにしたものであり、老化の予防的介入や、加齢性認知症の新たな治療標的探索に資する重要な知見を提供する。

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　2件／うちオープンアクセス　2件）

１．著者名 Irie T., Matsuda T* (co-corresponding author), Hayashi Y., Kamiya A., Kira J.I. & Nakashima K*.	４．巻 120
２．論文標題 Direct neuronal conversion of microglia/macrophages reinstates neurological function after stroke.	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA	６．最初と最後の頁 e2307972120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2307972120	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 Irie T#., Matsuda-Ito K#., Matsuda T* (co-corresponding author)., Masuda T., Prinz M., Isobe N. & Nakashima K*.	４．巻 28
２．論文標題 Lineage tracing identifies in vitro microglia-to-neuron conversion by NeuroD1 expression.	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Genes Cells	６．最初と最後の頁 526-534
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.13033	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10件（うち招待講演　0件／うち国際学会　3件）

１．発表者名 Matsuda T., Irie T., Matsuda-Ito K., Hayashi Y., Kamiya A., Masuda T., Prinz M.R., Isobe N., Kira J.I. and Nakashima, K.
２．発表標題 Direct neuronal conversion of microglia reinstates neurological function after stroke.
３．学会等名 The 50th Naito Conference（国際学会）
４．発表年 2023年

１．発表者名 Matsuda-Ito K., Matsuda T., Irie T., Masuda T., Prinz M.R. and Nakashima K.
２．発表標題 Lineage tracing using CreERT2::stop-YFP mice identifies neuronal reprogramming form microglia by NeuroD1 expression.
３．学会等名 The 50th Naito Conference（国際学会）
４．発表年 2023年

１．発表者名
Kunoh, S., Zhu, Yicheng., Kai, S., Matsuda T. and Nakashima, K.

２．発表標題
Neurogenesis in the adult hippocampus decreases after spinal cord injury.

３．学会等名
The 50th Naito Conference（国際学会）

４．発表年
2023年

１．発表者名
甲斐翔太朗、松田泰斗、中島欽一

２．発表標題
発達期の腸内細菌がけいれん感受性に与える影響、日本発達神経科学回第12回学術集会

３．学会等名
日本発達神経科学回第12回学術集会

４．発表年
2023年

１．発表者名
野村真優子、松田泰斗、和泉自泰、松田花菜江、中島孝輔、馬場健史、中島欽一

２．発表標題
神経幹細胞の増殖再開の可否を規定するG0期誘導の分子基盤解明

３．学会等名
第９６回日本生化学会大会

４．発表年
2023年

１．発表者名
中島孝輔、松田泰斗、土井浩義、山浦健、中島欽一

２．発表標題
胎生期麻酔曝露による神経幹細胞の挙動変化とメカニズムの解明

３．学会等名
第９６回日本生化学会大会

４．発表年
2023年

１．発表者名
野村真優子、松田泰斗、和泉自泰、松田花菜江、中島孝輔、馬場健史、中島欽一

２．発表標題
神経幹細胞の静止状態と分化における増殖停止機構の違いの解明

３．学会等名
若手支援技術講習会

４．発表年
2023年

１．発表者名
中島孝輔、松田泰斗、土井浩義、山浦健、中島欽一

２．発表標題
胎仔期ミダゾラム曝露による神経幹細胞挙動変化とそのメカニズムの解析

３．学会等名
日本麻酔科学会第７０回学術集会

４．発表年
2023年

１．発表者名
松田泰斗

２．発表標題
ヒストン修飾酵素Setd8の発現低下は成体海馬の神経幹細胞老化を開始させる

３．学会等名
第20回成体脳のニューロン新生懇談会・第17回神経発生討論会

４．発表年
2024年

１．発表者名
松田 泰斗

２．発表標題
ミクログリアから神経細胞へのダイレクトリプログラミングは脳梗塞モデルマウスの神経機能を回復させる

３．学会等名
先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会

４．発表年
2024年

〔図書〕　計0件

〔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