

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640012

研究課題名(和文) 神経幹細胞の分化制御におけるJmjCヒストン脱メチル化酵素群の機能解析

研究課題名(英文) Functional roles of JmjC histone demethylase on neural stem cell differentiation

研究代表者

堅田 明子 (Katada, Sayako)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00615685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、発生段階依存的な神経幹細胞の分化様式について、特にエピジェネティック制御の観点から、分子メカニズムを解析している。ところで、胎生動物の脳内は一般的に低酸素状態にある。そこで、ヒストン脱メチル化酵素群の中でも、その酵素活性が細胞内の酸素濃度によって制御されるJmjCファミリー遺伝子群に着目、解析を行った。その結果、JmjCファミリー遺伝子群の中でも、ヒストンH3K27の脱メチル化酵素であるJMJD3が神経系への分化に伴い発現上昇すること、また神経幹細胞のアストロサイト分化を生体を模した低酸素培養条件下で促進することを見出した。

研究成果の概要(英文)：During corticogenesis, neural stem cells sequentially generate neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. The neural stem cell fate is known to be regulated by several epigenetic programs such as DNA methylations and histone modifications. We focused here on the JmjC-family genes, since oxygen levels in tissues including the embryonic brain are generally low compared with that in the atmosphere, and the demethylase activity of JmjC-family is regulated by the intercellular oxygen levels. We found that the expression of histone H3K27 specific demethylase JMJD3 is increased after neural induction of ES cells. Moreover, knockdown of Jmjd3 in neural stem cells, which were isolated from embryonic brain, reduces the generation of GFAP-positive astrocytes under hypoxic culture condition. We demonstrate here for the first time that JMJD3 regulate astrocyte differentiation in hypoxia, which mimic in vivo situation.

研究分野：神経科学一般

キーワード：神経幹細胞 ヒストン修飾 エピジェネティクス 低酸素

1. 研究開始当初の背景

胎生期の脳新皮質に存在する神経幹細胞は、グリア産生に先立ち、まずニューロンへと分化する。神経幹細胞の運命は、サイトカインや増殖因子等の細胞外シグナルとエピジェネティクス制御等の細胞内プログラムとの協調的な作用によって決定する。研究代表者が所属する研究室では、神経幹細胞のアストロサイト分化を制御するタイミングが、アストロサイト特異的遺伝子プロモーター領域における DNA のメチル化修飾の解離と相関することを報告している (引用文献 1)。また、通常はニューロンへと分化する胎生 11.5 日齢の神経幹細胞が、4 日間の低酸素環境 (酸素濃度 2%) 下での培養により、アストロサイトへの分化能を獲得し、サイトカイン (LIF: 白血球抑制因子) に応答しアストロサイトへと分化することを見出した (引用文献 2)。胎生 11.5 日齢の神経幹細胞を通常の大気中 (酸素濃度 21%) で 4 日間培養した際には、LIF 刺激によってもアストロサイトへと分化する細胞の割合は少ない。これは、アストロサイト特異的遺伝子プロモーター領域における DNA メチル化量の差に起因している。すなわち、母体内で発生過程に誘導されるエピジェネティックな変化が、*in vitro* においても低酸素濃度培養では適切に行われるが、大気酸素下では停滞することが示唆された。

2. 研究の目的

胎生動物の脳内は一般的に低酸素状態にある。そこで、研究代表者は神経幹細胞の発生段階依存的な性質変化に低酸素シグナルが関与することを提唱し、その分子機構を解明することを目指した。

ヒストン脱メチル化酵素の一つである JmjC ファミリー遺伝子群は、酵素反応に酸素分子を基質として用いるため、その活性が細胞内の酸素濃度によって制御される。そこでエピジェネティック制御の中でもヒストン修飾に注目し、神経幹細胞分化における酸素濃度の影響、およびその制御に関わる JmjC ファミリー遺伝子の同定とその機能解析を行うことを目的とした。これまでに、神経発生においてヒストン脱メチル化酵素の機能を生体における酸素濃度、およびその酵素活性に着目して解析した報告は皆無であるため、非常に挑戦的かつ独創的なプロジェクトであると考えている。

3. 研究の方法

まず (1) 神経幹細胞が産生する細胞種と培養時酸素濃度の影響を解析する。研究代表者が所属する研究室では、ES 細胞から神経系細胞への分化誘導法が確立できている。そ

こでまず、ES 細胞を用いて神経幹細胞分化と培養時酸素濃度の関係を解析する。また、

(2) ES 細胞から神経系細胞への分化過程における遺伝子発現動態に基づき、神経幹細胞の分化制御に関わる JmjC ヒストン脱メチル化酵素群を探索、実際にその候補遺伝子の発現減弱を誘導することで機能解析を行う。最後に、(3) ES 細胞だけでなく、目的時期の神経幹細胞を胎仔終脳より単離し *in vitro* で培養、培養時酸素濃度と産生する細胞種を解析、産生細胞で特異的に発現する標的遺伝子の発現制御機構をヒストン修飾の観点から解析することで、脳新皮質神経幹細胞の分化制御機構を明らかにする。

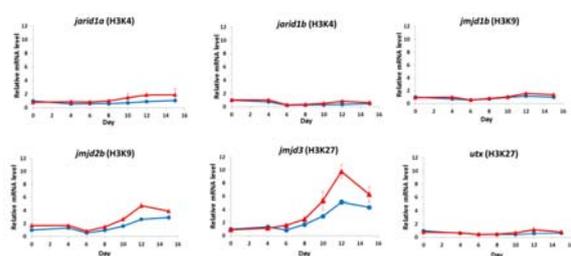
4. 研究成果

(1) ES 細胞の神経系分化と培養時酸素濃度の影響

ES 細胞の神経系分化に対する酸素濃度の影響を解析するため、分化誘導の 1 日前から、酸素濃度 2% (Hypoxia) もしくは 21% (Normoxia) で培養を行い、神経系への分化誘導後 2 日おきに細胞を回収、RNA 抽出を行った。定量 PCR により、神経幹細胞、ニューロン、アストロサイト特異的遺伝子の発現量を解析した結果、分化誘導 2 日後には神経幹細胞に特異的な *sox1* 遺伝子が Normoxia, Hypoxia の両培養条件において同程度発現することを確認した。この結果は、ES 細胞の神経系への分化誘導効率には培養時の酸素濃度が影響しないことを示唆している。その一方、生体においても発生の後期に神経幹細胞から産生する浅層ニューロンやアストロサイトに特異的な *cux1* や *gfap* 遺伝子の発現は Hypoxia 培養によって顕著に上昇することが明らかとなった。

(2) 神経系分化に関与する JmjC ファミリー遺伝子群の同定

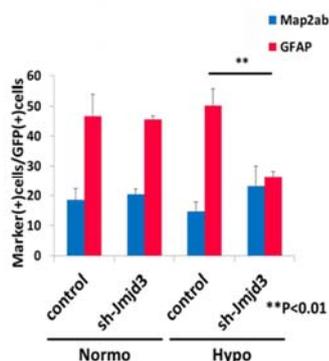
神経系への分化、また神経幹細胞の分化制御に関与するヒストン脱メチル化酵素を探索するため、上と同様に ES 細胞から神経系へと分化する過程で発現が上昇する JmjC ファミリー遺伝子を探索した。その結果、Hypoxia (赤線)、Normoxia (青線) 両条件下において、ヒストン H3K27 の脱メチル化酵素である *jmjd3* の発現が神経系細胞への分化に伴い顕著に上昇することが明らかとなった。



すなわち、神経幹細胞において Jmjd3 がヒストン H3K27 の脱メチル化を介して、分化運命を制御する可能性が考えられた。実際に、胎生 11 日、14 日齢のマウス胎仔終脳より神経幹細胞を単離し、*jmjd3* 遺伝子の発現を定量した結果、先に神経幹細胞の分化制御への機能が報告されているエピジェネティック因子である MLL1 や EZH2 と同程度、もしくはそれ以上に発現することを確認した。

(3) 神経幹細胞における Jmjd3 の機能解析

胎生 14 日齢の終脳より神経上皮細胞を単離し、自己増殖を誘導するサイトカイン bFGF 存在下で 4 日間培養した後、*jmjd3* の発現減弱を特異的な shRNA を導入することで誘導した。神経幹細胞で *jmjd3* をノックダウン後、これらの神経幹細胞が産生する細胞種を Normoxia, また Hypoxia 培養条件下で解析するため、LIF 存在下で 4 日間培養した後、細胞を固定、免疫細胞染色を行った。その結果、Normoxia ではコントロールと *jmjd3* ノックダウン間で神経幹細胞の分化傾向に差を認めない (Map2ab:ニューロンと GFAP: アストロサイト) が、Hypoxia 条件下では *jmjd3* のノックダウンにより、アストロサイトに特徴的な GFAP 陽性の細胞へと分化する割合が減少することが明らかとなった (赤色)。JMJD3 と同様にヒストン H3K27 の脱メチル化を触媒する JmJC ファミリー遺伝子の UTX をノックダウンした場合においても、Normoxia, Hypoxia 両条件下で神経幹細胞が産生する細胞種が変わらなかったことより、生体を模した Hypoxia 環境において、Jmjd3 が特異的に神経幹細胞のアストロサイト分化を促進することを突き止めた。



現在は、*gfap* プロモーター領域におけるヒストン H3K27 のトリメチル化修飾量を Normoxia, Hypoxia 両条件下においてクロマチン免疫沈降法を適用することで解析、アストロサイト分化制御機構の詳細を解析している。

(引用文献)

① Takizawa et. al. DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev. Cell*, 2001

② Mutoh et. al. Oxygen levels epigenetically regulate fate switching of neural precursor cells via hypoxia-inducible factor 1 α -notch signal interaction in the developing brain. *Stem cell*, 2012

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Goto T[#], Sato Y[#], Katada S[#], Kinameri E., Yoshihara S. Nishiyori A., Kimura M., Fujita H., Touhara K., Reed R., and Yoshihara Y. ([#]Equally contributed)

Goofy coordinates the acuity of olfactory signaling *J. Neurosci.*, 32, 12987-12996 (2013)

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4948-12.2013

② Aguilar L., Katada S., Orozco R., and Sassone-Corsi P.

NAD(+)-SIRT1 control of H3K4 trimethylation through circadian deacetylation of MLL1 *Nature Struct Mol Biol* 22 312-318 (2015)

DOI: 10.1038/nsmb.2990

[学会発表] (計 7 件)

① Katada S.,

Impact of oxygen levels on fate switching of neural stem cells during corticogenesis

第 36 回 日本神経科学大会

(口頭: 招待講演)

2013 年 6 月 23 日 京都

② 壑田明子

エピジェネティック修飾による時計遺伝子の発現制御機構

第 86 回 日本生化学大会

(口頭: 招待講演)

2013 年 9 月 11 日 横浜

③ 本田瑞季, 壑田明子, 大國紋, 中島欽一

胎生期マウス神経幹細胞の増殖・分化制御に関与する PRMT の同定とその機能解析

第 7 回 神経発生討論会 (ポスター発表)

2014 年 3 月 14 日 大阪

④ 本田瑞季, 壑田明子, 中島欽一

胎生期マウス神経幹細胞におけるタンパク

質アルギニンメチル基転移酵素 PRMT1 の機能解析

生化学若手九州支部

2014年5月20日 (口頭発表)

⑤本田瑞季、**堅田明子**、中島欽一

胎生期マウス神経幹細胞におけるタンパク質アルギニンメチル基転移酵素 PRMT1 の機能解析

第37回 日本神経科学大会 (ポスター発表)

2014年9月11日 横浜

⑥**堅田明子**、本田瑞季、中島欽一

神経幹細胞分化における発生期酸素濃度の影響

第37回 日本神経科学大会 (ポスター発表)

2014年9月12日 横浜

⑦**Katada. S.**, Honda. M. & Nakashima. K.

Oxygen regulates fate specification of neural stem cell during cortical development

Keystone Symposia: Neuroepigenetics, 2015.2.23, Santa Fe, USA

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.scb.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

堅田 明子 (KATADA, Sayako)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号: 00615685

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

大國 紋 (OOKUNI, Aya)

九州大学・医学系学府・修士課程学生

本田 瑞季 (HONDA, Mizuki)

九州大学・医学系学府・修士課程学生