

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26710003

研究課題名(和文) 神経幹細胞の発生段階依存的な分化能変換の分子機構解明

研究課題名(英文) Developmental stage-dependent change of SMAD target genes defines the direction of neural stem cell differentiation induced by bone morphogenetic proteins

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) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：発生過程において神経幹細胞の運命は、サイトカインを含む細胞外因子とエピジェネティクス修飾など細胞内在性機構の協調的な働きにより決定づけられる。研究代表者はアストロサイト分化を誘導するサイトカインとして知られる骨形成因子(BMP)が、胎生中期の神経幹細胞に対してはニューロン分化を促すことを利用し、発生段階依存的なBMPの応答性の違いから、神経幹細胞の時期特異的な産生細胞種の決定機構の解析を行なった。これまでに、プロニューラル遺伝子Neurog1/2を含む、神経幹細胞の分化制御に重要な複数の転写因子の発現制御領域に新規のエピジェネティック修飾を見出ししている。

研究成果の概要(英文)：During brain development, tight regulation of neurogenesis to astrocytogenesis switching of NSCs is critical. Accumulating evidence has indicated that epigenetic modifications and extracellular factors control the timing of neuronal and astrocytic differentiation of NSCs, however, complete understanding is still far from clear. Although BMPs are one group of well-characterized factors to induce astrocytic differentiation, we have recently found that BMPs induce neuronal differentiation of NSCs at mid-gestational stages. To elucidate molecular mechanism underlying this developmental stage specific responsiveness of NSCs, we have performed ChIP-seq and RNAseq analyses of E11 and E14 NSCs after BMP2 stimulation. Genome-wide mapping for the P-SMADs binding sites revealed that SMAD target genes were altered dramatically. By analyzing stage-specific P-SMADs binding sites, we identified several novel epigenetically regulated regions, which may contribute NSC's fate choice.

研究分野：神経科学

キーワード：神経幹細胞 BMP エピジェネティクス 分化

1. 研究開始当初の背景

大脳新皮質を構成するニューロンやアストロサイト、オリゴデンドロサイトは胎生期に共通の神経幹細胞から産生される。しかし、神経幹細胞は初めからこれら全ての細胞に分化するのではなく、胎生中期にはまず深層ニューロンを、その後浅層に配置されるニューロンを産生し、最後にアストロサイト、オリゴデンドロサイトといったグリアを産生する。この過程では、サイトカインや増殖因子等の「細胞外因子」と転写因子やエピジェネティック因子等の「細胞内在性因子」とが協調的に作用し、そのわずかなバランスを感知することで、個々の細胞の分化方向は運命づけられる。研究代表者は、アストロサイト分化を誘導するサイトカインとして知られる骨形成因子 (BMP) が、胎生中期の神経幹細胞に対しては、プロニューラル遺伝子である *Neurog1/2* や浅層ニューロンの機能に重要な転写因子 *Cux1/2* の発現を誘導し、ニューロン分化を促すことを見出した (図 1)。そこで、発生段階依存的な BMP の応答性の違いから、神経幹細胞の時期特異的な産生細胞種の決定機構を解明することを目指した。

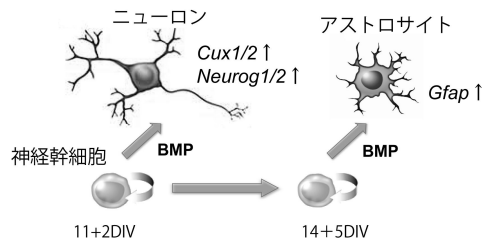


図 1 発生段階依存的な神経幹細胞の産生細胞種

2. 研究の目的

BMP はオーガナイザー因子の 1 つとして発生初期より豊富に発現し、一般に胎生期の神経幹細胞に対しては、アストロサイト分化を誘導し、ニューロン分化を抑制することが知られていた。しかしながら、胎生中期では BMP がニューロン分化を誘導する事実は、発生過程の各段階で神経幹細胞がクロマチンリモデリング等により BMP の標的遺伝子を大幅に変化させることが伺える。しかしながら、神経幹細胞において BMP の標的遺伝子を網羅的に解析した報告はこれまでにない。そこで、BMP の下流で機能する転写因子 Smad1 の標的遺伝子を、ニューロン分化を誘導する胎生 11 日 (E11.5) とアストロサイト分化を誘導する E14.5 の 2 つの発生時期由来

神経幹細胞において同定する。その後、エピジェネティクス修飾やクロマチン構造を解析することで、神経幹細胞が発生段階依存的に産生細胞種を変化させる仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

分化細胞種の異なる二つの発生時期、E11.5 および E14.5 のマウス終脳より細胞を単離し、それぞれ *in vitro* で 2 日、5 日 bFGF 存在下で培養を行うことで神経幹細胞を濃縮した後、BMP2 で刺激 1 時間後に抗 P-Smad 抗体を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。この試料からライブラリーを作製、次世代シーケンサーにより配列解読 (ChIP-seq) を行うことで、発生時期特異的な P-Smad 標的遺伝子を網羅的に同定した。また、同様にして調整した神経幹細胞に対して BMP2 刺激 3 時間、24 時間後の細胞から RNA を抽出し、RNA-seq を行うことで、BMP 応答遺伝子を網羅的に同定した。エピジェネティクス解析には、所属研究室で既に得られている Post-Bisulfite adaptor tagging (PBAT) 法による網羅的 DNA メチル解析の結果と自身で行ったヒストン修飾抗体 (H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3) を用いた ChIP-seq 解析を対応させることで、P-Smad 標的遺伝子および BMP 応答遺伝子のクロマチン構造を明らかにした。

4. 研究成果

ChIP-seq 解析の結果、E11.5 では 3219、また E14.5 では 696 箇所の P-Smad 結合領域を同定した。そのうち、発生時期に関わらず P-Smad が結合する領域はわずかであり、E11.5 においては 88%、E14.5 では 46% が発生時期特異的な P-Smad 結合領域であることが明らかとなった (図 2)。一方、BMP2 刺激後発現変動する遺伝子群を E11.5 と E14.5 において RNA-seq により同定したが、P-Smad 標的遺伝子に対して、遺伝子発現が相関 (上昇) する割合は各発生時期において 2-3 割と比較的低いことが明らかとなった。しかしながら、RNA-seq による発現上昇と ChIP-seq による P-Smad 結合が確認された BMP の標的遺伝子の一例として、E11.5 と E14.5 で共通する *Id1/2* や *Hes5*、また E14.5 特異的に、アストロサイト特異的遺伝子であ

る *Gfap*, *E11.5* 特異的にはニューロン分化に関わる転写因子 *Neurog1/2* など神経幹細胞の分化制御に重要な遺伝子を見出した。

そこで、各標的遺伝子のプロモーター領域におけるエピジェネティクス修飾を解析したところ、*E14.5* 特異的な BMP 標的遺伝子である *Gfap* は、*E14.5* において P-Smad 結合を認める領域およびその近傍配列が *E11.5* では高度に DNA メチル化修飾を受けることが明らかとなった。一方、*E11.5* 特異的 BMP 標的遺伝子である *Neurog1/2* においても TSS 上流 2-7kbp に渡って *E11.5* から *E14.5* へと発生が進行するに伴い DNA メチル化修飾を獲得する領域を見出した。すなわち、BMP 標的遺伝子の発生時期選択的に DNA メチル化修飾が関与することを見出した(図2)。

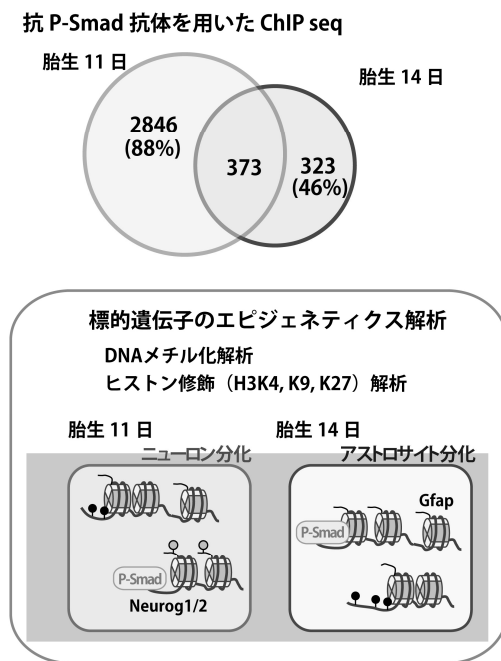


図2 各発生時期における P-Smad 結合領域の数とその代表的遺伝子の DNA メチル化修飾の割合

しかしながら、*Neurog1/2* 遺伝子においては P-Smad 結合配列自体は DNA メチル化修飾を認めず、なぜ *E11.5* 特異的に P-Smad がこれらの領域へと結合するのか、その分子機構は依然として不明である。ヘテロクロマチン領域の同定を目的に行った H3K9me3 修飾抗体の ChIP-seq 解析では、免疫沈降される DNA の割合が非常に少なく、明確な修飾領域を特定することが叶わなかった。そこで今後は、ATAC-seq

などオープンクロマチン領域を特定する解析を行うことで、時期特異的 P-Smad 結合が各発生時期のクロマチン構造に由来することを示した後に、成果を論文投稿する。また、*Neurog1/2*, *Gfap* 以外の発生時期特異的 BMP 標的遺伝子に関しても、引き続きエピジェネティクス制御を解析することで、神経幹細胞の発生段階依存的な細胞分化制御機構の全容解明を目指す。

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 3 件)

Takouda J., Katada S., and Nakashima K.*
"Emerging mechanisms underlying astrogenesis in the developing mammalian brain"

Proc. Jpn. Acad., Ser. B., 93, (2017) in press

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)

本田瑞季、堅田明子、中島欽一

"エピジェネティクスの基礎" **アレルギー・免疫**, 21, 2-8 (2014)

[学会発表](計 11 件)

竹生田 淳、松田泰斗、佐野坂司、堅田明子、中島欽一

Transcription factor NFI-mediated DNA methylation regulatory network controlling neuron-glia fate switching of neural stem cells
第10回神経発生討論会、宮城県、秋保リゾート、2017年3月10-11日

堅田明子

脈絡叢の加齢性変化が成体ニューロン新生に与える影響

第 12 回 成体ニューロン新生懇談会、滋賀県、滋賀医科大学、2017 年 2 月 18 日

Sayako Katada, Rie Yamashita, and Kinichi Nakashima.

Implication of structure and functional changes of aging choroid plexus in neural stem cells regulation and brain functions

KEYSTONE SYMPOSIA Neurogenesis during development and in the adult brain
Jan 8-12 (2017) Olympic Valley, CA, USA

本田瑞季、堅田明子、大塚まき、山本直樹、五十嵐勝秀、今村拓也、中島欽一
胎生期の神経幹細胞における発生時期依存的な BMP 応答性変化の分子機構、
第 39 回日本分子生物学会年会、神奈川県、パシフィコ横浜、2016 年 11 月 30-12 月 2 日

堅田明子

中枢神経系の発生・発達から老化までを制御する組織としての脈絡叢
第 38 回日本分子生物学会年会、兵庫県、神戸ポートアイランド、2015 年 12 月 1-4 日

河村陽一郎、野口浩史、堅田明子
胎生期マウス終脳におけるアストロサイト分化誘導因子産生細胞の同定
第 38 回日本分子生物学会年会、兵庫県、神戸ポートアイランド、2015 年 12 月 1-4 日

Mizuki Honda, Sayako Katada, and Kinichi Nakashima
Protein arginine methyltransferase1 regulates astrocyte differentiation of neural stem cells
Society for Neuroscience
Oct 17-21 (2015) Chicago, IL, USA

Sayako Katada, Mizuki Honda, and Kinichi Nakashima
Oxygen regulates fate specification of neural stem cell during cortical development
KEYSTONE SYMPOSIA Neuroepigenetics
Feb 22-26 (2015) Santa Fe, NM, USA

堅田明子、本田瑞希、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、神奈川県、パシフィコ横浜、2014 年 9 月 11 - 13 日

本田瑞希、堅田明子、中島欽一
PRMT1 による神経幹細胞のアストロサイト分化およびニューロンの移動制御
第 37 回 日本神経科学大会、神奈川県、パシフィコ横浜、2014 年 9 月 11 - 13 日

本田瑞希、堅田明子、中島欽一
胎生期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、熊本県、熊本大学、2014 年 5 月 3 日

〔図書〕(計 1 件)
Honda M., Nakashima K., and Katada S.*
(*Corresponding)
"Human neural stem cells: from generation through differentiation to application"
Publisher: *Springer Verlag*, (2017) in press

〔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：
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
本田 瑞希 (HONDA, Mizuki)
九州大学・医学系学府・博士課程学生
竹生田 淳 (TAKOUDA, Jun)

九州大学・医学系学府・博士課程学生

河村 陽一郎 (KAWAMURA, Youichiro)
九州大学・医学系学府・博士課程学生

山下 りえ (YAMASHITA, Rie)
九州大学・医学系学府・修士課程学生