

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21661

研究課題名(和文) 領域特異的エピゲノム編集技術を用いた精神疾患創薬スクリーニング系の基盤構築

研究課題名(英文) Establishment of drug screening system for mental disorder by generation of novel epigenome editing proteins

研究代表者

平野 和己(Hirano, Kazumi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号：40707709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ジンクフィンガータンパク質を用いた独自のDNAメチル化編集技術(ZF-DNMT)を確立し、DNAメチル化異常と関連する精神疾患発症の分子機構を解析すること、さらにヒト神経幹細胞におけるエピジェネティクス修飾の生理的機能を解明することを目的とし、研究を行った。その結果、ZF-DNMTは標的ゲノム領域のメチル化を惹起し、標的の遺伝子の発現を低下させることを明らかにした。また、DNMTとの相互作用や、ヒストンメチル化編集の新たな材料としても期待されているヒストン脱メチル化酵素LSD1に着目した解析も行い、ヒト神経幹細胞のニューロン分化においてLSD1が必須であることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recently, the relationship between mental disorder and abnormal DNA methylation in neuron has been reported. However, this detail mechanism remains unknown. To address this issue, we generated novel epigenome editing system using zinc finger protein (ZF) and DNA methyltransferase (DNMT). This system, named ZF-DNMT, induced DNA methylation on target genome region and reduced the expression level of target gene in human neural stem cells. Furthermore, we focused on histone demethylase LSD1, which is used for epigenome editing and interacts DNMT, and found that LSD1 is necessary for human neurogenesis.

研究分野：神経科学

キーワード：精神疾患 エピジェネティクス DNAメチル化 エピゲノム編集 DNMT LSD1 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

統合失調症や双極性障害の国内での発症数は年々増加しており、現在では、特に統合失調症は100人に1人弱がかかる頻度の高い病気となっている[1]。このため、発症原因の解明と根本的な治療薬の開発が急務とされている。ところが、それらの精神疾患は発症が思春期以降、又は成体期となる場合が多いため、発症時期に併せたヒトモデル細胞やモデル動物の作製が必須であるが、未だその確立には至っていない。

哺乳類におけるDNAメチル化は、DNAメチル化酵素群(DNMT1、DNMT3a及びDNMT3b)によって行われ、メチル化が施された遺伝子座の転写活性を阻害し、遺伝子発現を抑制する。近年、統合失調症と双極性障害患者の死後脳解析により、GABA作動性ニューロンにおけるDNMT1及びDNMT3aの高発現が示されている[2,3]。さらに、統合失調症やアルツハイマーなどの神経精神疾患患者の死後脳の解析から、神経機能関連遺伝子をコードしている遺伝子領域において異所的なDNAメチル化が施されていることが報告された[4]。また、養育環境の違いにより仔ラット脳内における糖質コルチコイド受容体(GR)遺伝子のプロモーター領域のメチル化が変化し、生後のストレス反応性に影響を及ぼすことが知られている[5]。これらの報告は、環境変化に伴った脳内における領域特異的なDNAメチル化の異常が、精神疾患の発症に関与している可能性を示唆している。従って、精神疾患に対するヒトモデル細胞やモデル動物の作製には、特異的領域のみDNAメチル化を施す技術とその利用が必須であると考えられる。

近年、ゲノム編集技術は発展を遂げ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEN、CRISPR/Cas9など様々な手法が開発されている[6]。これらの技術の内、特にジンクフィンガータンパク質は、それ自体が細胞膜・核を透過するという特殊な性質を有していることが知られている[7]。本研究課題では、この特殊な性質に着目し、新規エピゲノム編集技術のDNA結合ドメインとしてジンクフィンガータンパク質を用いることとした。

[1] 厚生労働省 患者調査 (H23年), [2] Ruzicka WB, et al., Mol Psychiatry, 12, 385-97 (2007), [3] Zhubi A, et al., Schizophr Res., 111, 115-22 (2009), [4] Grayson DR, et al., Neuropsychopharmacology, 38, 138-66 (2013), [5] Weaver IC, et al., Nat Neurosci., 7, 847-54 (2004), [6] Li M, et al., J Biol Chem., 289, 4594-4599 (2014), [7] Gaj T, Kato Y, et al., Nat Methods., 9, 805-807 (2012)

2. 研究の目的

近年、神経細胞(ニューロン)における特定領域の過剰なDNAメチル化等のエピゲノ

ム異常と精神疾患との関連が報告されているが、実験動物やモデル細胞等を用いた直接的な証明は行われていない。そこで本研究ではまず、特定のゲノム領域をメチル化する新規人工タンパク質を開発し、それを用いたエピゲノム編集技術を確立する。次に、それを用いてエピゲノム異常を惹起させたヒト神経幹細胞をニューロンへと分化させることで精神疾患ヒトモデル細胞を作製し、精神疾患発症の分子機構を解明する。将来的には、エピゲノム編集タンパク質を強制発現させた精神疾患モデルマウスを作製し、エピゲノム異常と精神疾患病態との関連を実験的に明示する。これらのモデル細胞とモデル動物を用いて精神疾患治療のための創薬基盤技術の構築に貢献する。

3. 研究の方法

本研究においては、まず標的となるヒトゲノム配列を認識するジンクフィンガータンパク質とDNAメチル化酵素が融合した人工タンパク質(ZF-DNMT)を作製し、*in vitro*での特異的ゲノム領域のメチル化を評価する。さらに、ZF-DNMTをヒト神経幹細胞に導入し標的遺伝子プロモーターのメチル化亢進と標的遺伝子の発現抑制を確認することで、ZF-DNMTを用いた新規エピゲノム編集技術を確立し、細胞内での作用を明らかにすることを旨とした。

4. 研究成果

(1)SOX2を標的としたZF-DNMTの設計

ZF-DNMTを用いたエピゲノム編集技術の開発にあたり、神経幹細胞で高発現しているSOX2遺伝子の既知の発現制御領域を標的としたジンクフィンガータンパク質を設計した(SOX2-ZF)。このSOX2-ZFとDNMT3aの活性部位を繋ぐリンカーの長さを長短2種類作成した。さらに、ZFのN末側には、核移行シグナル(NLS)とGFP、Hisタグが挿入されている(図1)。また、DNMT3a活性部位を含まないものをコントロールとした。

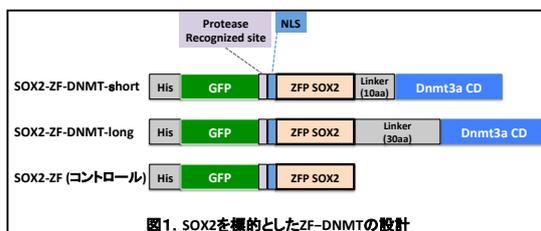
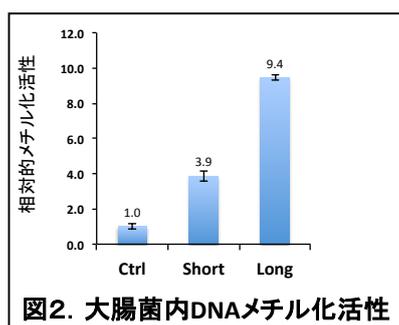


図1. SOX2を標的としたZF-DNMTの設計

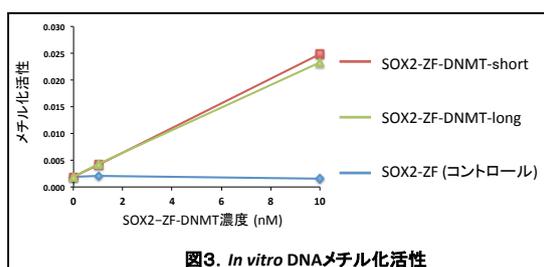
(2)SOX2-ZF-DNMTはメチル化を亢進する

(1)で設計したSOX2-ZF-DNMTのメチル化活性を確認するために、まず、Siddiqueらが報告した大腸菌内におけるメチル化アッセイ法を試みた[1]。すなわち、各種SOX2-

ZF-DNMT をクローニングしたカナマイシン耐性 pET プラスミドと、標的配列を含むアンピシリン耐性プラスミドを共に、大腸菌 (DE3) に形質転換させ、両抗生物質を含む培地でセレクションした。得られたコロニーを 2xYT 培地で前培養し、その後、IPTG を用いてタンパク質の発現誘導を行った。この時、大腸菌内では、発現した SOX2-ZF-DNMT が、標的配列を認識し、その近傍にメチル基を付加することが予想される。発現誘導後、大腸菌からプラスミド抽出を行い、メチル化感受性制限酵素 HpaII により処理した。処理後、DNA を精製し、メチル化部位を含む領域を増幅するように設計したプライマーを用いてリアルタイム PCR 法により検出した。その結果、SOX2-ZF-DNMT は、図 2 に示すような DNA ナメチル化活性を有することが明らかになった。ポジティブコントロールとして、CpG メチル化酵素 (M.SssI) で処理したサンプルを用いた。メチル化が施されている領域は HpaII による切断は行われず、PCR により増幅するが、メチル化が施されない場合には、HpaII により切断され、PCR により増幅されない。



次に、試験管内 (*in vitro*) DNA メチル化アッセイを行うために、大腸菌 (DE3) を用いて SOX2-ZF-DNMT タンパク質の発現誘導を行い、Ni-NTA カラムを用いて精製した。その精製 SOX2-ZF-DNMT と標的配列を含むプラスミド、メチル化基質 (SAM) を 16 時間反応させた。反応後、プラスミドを抽出し、先ほどのアッセイと同様にメチル化感受性制限酵素 HpaII を用いて、解析を行った。その結果、図 3 で示すように SOX2-ZF-DNMT の濃度に依存したメチル化活性を有することを見出した。

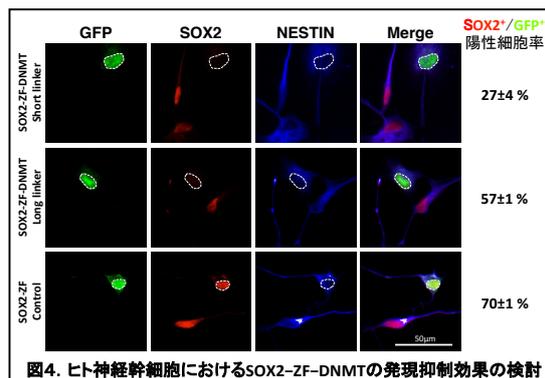


[1] Kearns NA et al., J Mol Biol, 425, 479-491 (2013)

(3) SOX2-ZF-DNMT はヒト神経幹細胞内において SOX2 の発現を抑制する

次に、作成した SOX2-ZF-DNMT が実際に細胞内で標的の遺伝子の発現の抑制効果を発揮するかを検討した。研究代表者は、胎児大脳皮質由来ヒト神経幹細胞を用いた、ヒトの神経発生を模倣した培養技術を有している。このヒト神経幹細胞に SOX2-ZF-DNMT をレンチウイルスを用いて導入した。導入された細胞には、GFP が発現している。標的遺伝子である SOX2 の発現を免疫蛍光染色法により評価し、SOX2-ZF-DNMT の SOX2 発現抑制効果を検討した。その結果、コントロールにおける SOX2 陽性細胞率は、 $70 \pm 1\%$ であるのに対し、SOX2-ZF-DNMT では、Short リンカーでは、 $27 \pm 4\%$ 、Long リンカーでは、 $57 \pm 1\%$ であった (図 4)。

これらのことから、SOX2-ZF-DNMT は、ヒト神経幹細胞内において、SOX2 の発現制御領域のメチル化を惹起し、SOX2 の発現を抑制することが明らかになった。興味深いことに、SOX2 の発現抑制効果には、リンカーの長さに関与しており、短いリンカーを持つ SOX2-ZF-DNMT の方が、効率的に発現を抑制することも明らかになることができた。



本研究課題で開発した ZF-DNMT は、細胞内でもその効果を発揮することが実験的に証明することができた。今後、疾患関連遺伝子の発現制御領域を標的とした ZF-DNMT を作成し、ヒト神経幹細胞へと導入し、その病態を確認する。また、現在ジンクフィンガーが持つ膜透過性を利用した簡易なエピゲノム編集法の開発にも取り組んでいる。

(4) LSD1 がヒト神経幹細胞の神経分化を制御している

2015 年に、ヌクレアーゼ活性を有さない Cas9 (dCas9) とヒストン脱メチル化酵素 LSD1 を融合させた、新たなエピゲノム編集技術が報告された [1]。この技術は、標的となるゲノム領域のヒストン修飾状態を改変することで、標的遺伝子の発現を制御することを可能とする。さらに LSD1 は、DNMT とも相互作用することも報告されており [2]、本

研究課題を遂行する上においても非常に興味深い因子となった。これまで、マウスやラットなどのげっ歯類のモデル動物において **LSD1** が大脳皮質形成に重要な役割を担っていることが報告されているが[3]、ヒトの神経発生においてはその役割が明らかになっていなかった。そこで、ヒトの神経発生における基礎的知見を得るために、ヒト神経幹細胞の神経分化における **LSD1** の役割の解析を行った。ヒト神経幹細胞の神経分化誘導時に **LSD1** 活性阻害剤 (**S2101**) 処理を施し、神経細胞マーカーである **DCX**、**CTIP2**、**8III** チューブリンを発現する細胞の割合をコントロールと比較した。その結果、**S2101** 処理した細胞では、神経細胞の割合が有意に減少していた。この結果は、**LSD1** がヒトの神経分化に必要なことを示している。さらに **LSD1** が制御する遺伝子の探索を行い、**Notch** 遺伝子の一つである **HEYL** を同定した。さらに、**HEYL** は未分化な神経幹細胞で発現が高く、分化に伴い発現が減少すること、**HEYL** の過剰発現細胞では神経分化が抑制されることも明らかにした。驚くべきことに、**LSD1** の **HEYL** の発現制御を介した神経分化機構は、マウス神経幹細胞では働いていなかった。このことから、今回明らかにした **LSD1** の働きは、霊長類特異的な働きであることを強く示している。

これらの研究成果は、学会発表や学術雑誌への掲載、プレスリリースなどを通じて社会に発信した。

[1] Kearns NA et al., Nat Methods, 12, 401-403 (2015),
[2] Wang J et al., Nat Genet, 41, 125-129 (2009), [3]
Fuentes P et al., Cereb Cortex, 22, 1431-1441, (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. New insight into **LSD1** function in human cortical neurogenesis, Hirano K, Namihira M. Neurogenesis, 3:e1249195, 2016 (査読・有り)
doi.org/10.1080/23262133.2016.1249195

2. **LSD1** mediates neuronal differentiation of human fetal neural stem cells by controlling the expression of a novel target gene, **HEYL**, Hirano K, Namihira M. Stem Cells, 34:1872-1882, 2016 (査読・有り)
doi: 10.1002/stem.2362

[学会発表] (計 4 件)

1. Lysine-Specific Demethylase 1 (**LSD1**) and its downstream target gene **HEYL** are important for neurogenesis of human fetal neural stem cells, Kazumi Hirano,

Masakazu Namihira, Keystone symposia Neurogenesis during Development and in the Adult Brain (J2), January 8—12, 2017, Olympic Valley (USA)

2. ヒストン脱メチル化酵素 **LSD1** はヒト神経幹細胞のニューロン分化を制御する、平野和己、波平昌一、第 10 回日本エピジェネティクス研究会年会、2015 年 5 月 19 日、千里ライフサイエンスセンター (大阪、豊中市)

3. Histone demethylase **LSD1** controls Notch signaling and GABAergic neuronal differentiation in human neural stem cell, Kazumi Hirano, Masakazu Namihira, Society for Neuroscience 2015, October 17-21 2015, Chicago (USA)

4. **LSD1** はヒト神経幹細胞の GABA 作動性ニューロンへの分化を制御する、平野和己、波平昌一、第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会、2015 年 5 月 25 日、一ツ橋学術総合センター (東京、千代田区)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

平野 和己 (HIRANO, Kazumi)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号：40707709

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし