

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300136

研究課題名(和文) エピジェネティクス制御される神経幹細胞の動態解析

研究課題名(英文) Epigenetic mechanisms regulating the maintenance and differentiation of neural stem cells

研究代表者

等 誠司 (Hitoshi, Seiji)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：70300895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)： 神経幹細胞の性質変化を司るエピジェネティクス解明を目的として、Gcm1/2およびRnf20遺伝子の機能を解析した。Gcm1/2発現によって神経前駆細胞がGFAP強陽性になること、それにはGFAP遺伝子のプロモーターDNAのメチル化率の減少が重要であることが分かった。一方、ヒストンH2BのE3ユビキチンリガーゼであるRnf20のノックダウンによって、神経幹細胞の未分化性が亢進するとともに細胞周期が延長し、分化のタイミングが遅れることが判明した。ChIP-seq法による網羅的エピゲノム解析により、Rnf20が発現修飾して神経幹細胞の未分化性維持や細胞周期の制御に関わる遺伝子群を明らかにした。

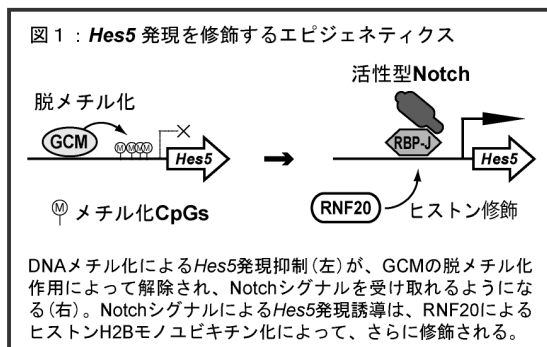
研究成果の概要(英文)： We have investigated the function of Gcm1 and 2, which catalyze the active demethylation of DNA, and Rnf20, a histone H2B ubiquitylation factor, in the maintenance and differentiation of neural precursor cells. We found that Gcm genes upregulate the expression of GFAP, through the demethylation of its promoter DNA. We also revealed that Rnf20 is expressed in most but not all neural precursor cells and is indispensable for the cell cycle progression and differentiation. The knockdown of Rnf20 in neural precursor cells lengthened their cell cycle through the action of p57kip2 and Cdk2. Furthermore, we demonstrate that Rnf20 controls differentiation of neural precursor cells through the promotion of Fezf1 and Fezf2 expression, which suppress the Notch signaling pathway. Our data suggest that Rnf20 could be a bifunctional gene that regulates both the differentiation status and cell cycle length of neural precursor cells.

研究分野：神経科学、幹細胞生物学

キーワード：神経幹細胞 エピゲノム DNAメチル化 ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景

発達期の哺乳類の脳において、大量の神経細胞・グリア細胞を産み出す装置としての神経幹細胞の重要性は言うまでもない。発生初期（マウスでは胎生 8.5 日）に神経幹細胞自身が形成され、対称分裂によって指数関数的に増殖した後、胎生中期には神経細胞を産生する。胎生後期にはオリゴデンドロサイト系譜細胞が産み出され、次いで胎生後期から生後にかけて、アストロサイトが産出される。生後に神経幹細胞は約 10%程度まで数を減らす、成体脳においても脳室下層や海馬歯状回において維持され、嗅球や海馬歯状回顆粒細胞層といった限局した脳領域に新生神経細胞を供給する(Hitoshi *et al.*, *Genes Dev* 18: 1806-1811, 2004)。このように、神経幹細胞は脳の発達段階に応じてその性質を変化させるが、その分子メカニズムには不明な点が多い。胎生期の脳における、神経幹細胞の増殖期から神経細胞産生期、神経細胞産生期からグリア細胞産生期への移行は、転写因子群のシーケンシャルな発現誘導や成長因子などの作用のみでは説明するのが困難で、エピジェネティクス制御の重要性が指摘されている。遺伝子の周辺、特にプロモーター領域にしばしば存在する CpG アイランドのシトシンのメチル化は転写の抑制に働き、プロモーター領域のヒストンの修飾は修飾のタイプによって様々な転写調節を行なっている。神経発生におけるエピジェネティクス制御として、神経細胞産生からグリア細胞産生への移行期に関わる DNA の脱メチル化(Namihira *et al.*, *Dev Cell* 16: 245-255, 2009)やヒストンのメチル化(Hirabayashi *et al.*, *Neuron* 63: 600-613, 2009)などが報告されているが、未だ未解明の点が多く残されていた。



研究代表者は、神経幹細胞の形成・維持・分化のメカニズムを研究してきて、Notch シグナルの活性化が神経幹細胞の未分化性の維持に不可欠であることを報告した(Hitoshi *et al.*, *Genes Dev* 16: 846-858, 2002)。さらに、Notch シグナル活性をよく反映する標的遺伝子 *Hes5* の発現が、エピジェネティクス制御を受けていることを見出した(図 1)。胎生初期（マウスで胎生 7.5 日）の神経上皮細胞において、*Hes5* 発現がプロモーター領域の DNA メチル化によって抑制されていること、胎生 7.5-8.5 日にこのメチル化が消失するとともに *Hes5* の発現誘導が起き、神経幹細胞

が形成されることを見出した。同時に、*Hes5* 遺伝子プロモーター領域の DNA 脱メチル化に、*Glial cells missing (Gcm)* 遺伝子が関わっていることを報告した(Hitoshi *et al.*, *Nat Neurosci* 14: 957-964, 2011)。一方、*Hes5* の発現調節に関わるヒストン修飾を司るものとして、*Ring finger protein 20 (Rnf20)* を同定した。*Rnf20* はヒストン H2B の E3 ユビキチンリガーゼとして知られ、H2B のモノユビキチン化を介してヒストン H3 のメチル化を制御し、転写調節を行なっている。これまで、酵母や培養細胞を用いた実験で、*Rnf20* が細胞増殖に関わるとの報告はあるが(例えば Shema *et al.*, *Genes Dev* 22: 2664-2676, 2008)、神経幹細胞や神経発生における機能は全く解明されていない。研究代表者は、予備的な結果として *Rnf20* が神経幹細胞の分化と移動を制御していることを示唆するデータを得た。神経発生において重要な機能を担うエピジェネティクス制御を統合的に理解するため、DNA のメチル化/脱メチル化とヒストン修飾の両者をテーマとする、本研究を提案するに至った。

2. 研究の目的

gcm 遺伝子は、*Drosophila* においてグリアと神経細胞間の運命決定を担う遺伝子として同定されたもので、哺乳類では 2 個のホモログ(*Gcm1*, *Gcm2*)が知られている。*Gcm1* ノックアウトマウスは胎盤機能不全によって胎生 9.5 日までに致死になるため、グリア細胞発生における役割は十分に解析されていない。本研究では、神経幹細胞の神経細胞産生期からグリア細胞産生期への移行における *Gcm1/2* の役割を、エピジェネティクス制御の観点から見直す。まず、GFAP を始めとするグリア細胞に特異的に発現する遺伝子群のプロモーター領域の DNA メチル化を解析し、DNA メチル化/脱メチル化による発現制御の有無を調べる。前述のように、GFAP 遺伝子の発現はプロモーター領域の DNA 脱メチル化に依存することが知られている。次いで、ノックアウトマウスの胎仔脳などを用いて、発生期の脳において *Gcm1/2* が関わる DNA 脱メチル化を網羅的に探索する。

一方、*Rnf20* 遺伝子についても過剰発現と機能喪失の遺伝子改変マウスを作製し、神経発生における *Rnf20* 遺伝子の機能の解析を行う。*Rnf20* の働きによるヒストン H2B のモノユビキチン化、これに引き続くヒストン H3 のメチル化と、転写活性とを対応させ、神経発生における *Rnf20* 遺伝子によるエピジェネティクス制御を明らかにする。当初は、神経幹細胞の維持に関わる *Hes5* 遺伝子や、*Neurogenin1/2* などの神経細胞分化に関わる遺伝子で解析を始め、その後モノユビキチン化ヒストン H2B を指標に網羅的解析を行う。さらに、*Gcm1/2* による DNA 脱メチル化と *Rnf20* によるヒストン修飾とが同時に働いている場を特定し、その相互作用を明らかにすることにより、胎生期脳における神経幹細胞

が、発生時期に応じて性質を変化させていく分子メカニズムを、エピジェネティクス制御の統合的観点から明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 神経幹細胞からグリア細胞が分化する過程における、*Gcm1/2* 遺伝子による DNA 脱メチル化の役割を解析する。アストロサイトのマーカーである GFAP 遺伝子のプロモーター領域には、leukemia inhibitory factor (LIF) シグナルを受け取る STAT3 結合領域があり、結合領域内とその周囲に存在する CpG がメチル化を受けることが知られている。胎仔期の大脳皮質の神経前駆細胞では、これら CpG は高度にメチル化されており、LIF シグナルが入っても GFAP の発現は抑制されている。子宮内電気穿孔法によって *Gcm1/2* を強制発現（同時に GFP 発現ベクターも共発現させる）させ、GFP 標識された細胞を FACS によって回収し、GFAP 遺伝子プロモーター領域のメチル化率を計測した。同様に、アストロサイト系譜細胞に特異的に発現する *S100β* や *GLAST* などの遺伝子や、オリゴデンドロサイト系譜細胞に特異的に発現する *PDGFRα*、*CNPase* などの遺伝子についても、その発現調節に DNA メチル化/脱メチル化が関与しているかどうか調べた。

(2) 神経幹細胞の自己複製能をコントロールする *Hes5* 遺伝子の、発現調節に関わるエピジェネティクス因子として同定したのが、*Rnf20* 遺伝子である。実際、*Hes5* 遺伝子プロモーター領域を用いたプロモーターアッセイにて、*Rnf20* の発現が Notch シグナルに対して抑制的に働くことを示唆する結果を得ている。*Rnf20* は、ヒストン H2B のモノユビキチン化を司る E3 ユビキチンリガーゼと考えられているが、その標的遺伝子は明らかになっていない。

Rnf20 の神経幹細胞における機能を明らかにするため、*Rnf20* 遺伝子の発現ベクターやノックダウンベクターを作製した。(1)同様に、子宮内電気穿孔法によってこれらのベクターを胎仔神経前駆細胞に導入し、表現型を観察した。また、胎仔脳より神経幹細胞を単離・培養し、発現抑制系や過剰発現系を用いた実験を行うことで、神経幹細胞の増殖・維持・分化における役割を詳細に解析した。

さらに、生体内での *Rnf20* 遺伝子の機能をより詳細に調べるために、機能喪失や過剰発現の遺伝子改変マウスが必要であると考え、ノックアウトマウスや神経幹細胞に *Rnf20* を発現するトランスジェニックマウスの作製を行うとともに、表現型の解析を行った。

4. 研究成果

(1) マウス胎生 14.5 日胚の大脳皮質に、子宮内電気穿孔法によって *Gcm1/2* を強制発現させたところ、3 日後には神経前駆細胞が GFAP

強陽性になることを見出した (図 2)。

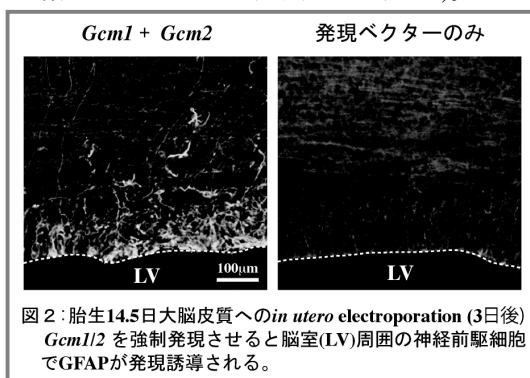


図 2: 胎生 14.5 日大脳皮質への *in utero* electroporation (3 日後) *Gcm1/2* を強制発現させると脳室(LV)周囲の神経前駆細胞で GFAP が発現誘導される。

そこで、*Gcm1/2* を過剰発現した神経前駆細胞を、GFP 陽性を指標としてセルソーターで回収し、DNA メチル化率を解析したところ、GFAP 遺伝子プロモーター内の CpG のメチル化が低下していることが判明した。すなわち、*Gcm1/2* が GCM モチーフを介して GFAP 遺伝子プロモーターに結合し、周囲の CpG を脱メチル化することにより、GFAP 遺伝子発現を促進していることが示唆された。以前の我々の研究から、*Gcm1/2* は能動的脱メチル化に関わると考え、能動的脱メチル化に関係すると言われていた他の因子との相互作用があるかどうか検討したが、現在までのデータではそのような相互作用は確認されていない。*Gcm1/2* が、これまでに報告されている DNA 脱メチル化機構とは全く異なるメカニズムで働いている可能性があり、今後の検討課題である。

(2) マウス胎生 13.5 日胚を用いて、子宮内電気穿孔法によって大脳皮質神経前駆細胞に遺伝子を導入し、*Rnf20* の過剰発現・ノックダウン実験を行った。その結果、*Rnf20* のノックダウンによって神経幹細胞の分化が抑制され、神経細胞への分化の過程で観察される放射状移動が減少することが判明した (図 3)。

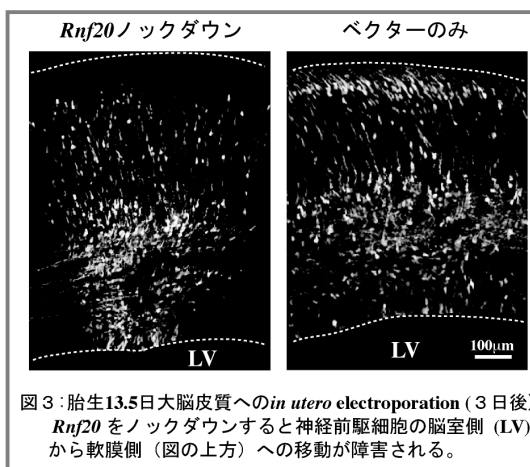


図 3: 胎生 13.5 日大脳皮質への *in utero* electroporation (3 日後) *Rnf20* をノックダウンすると神経前駆細胞の脳室側 (LV) から軟膜側 (図の上方) への移動が障害される。

また、*Rnf20* のノックダウンによって異性の *Hes5* 遺伝子発現が確認された (図 4)。*Hes5* は Notch シグナルの標的遺伝子であり、通常は神経幹細胞が存在する ventricular zone に発現が局限しているが、*Rnf20* ノックダウ

ンによって Notch シグナル活性が亢進し、異所性発現が観察されたと考えられる。Notch シグナルは神経幹細胞の未分化性維持に重要な働きをしており、*Rnf20* は *Hes5* の発現上昇を介して神経幹細胞の未分化性維持に関与していると考えられた。

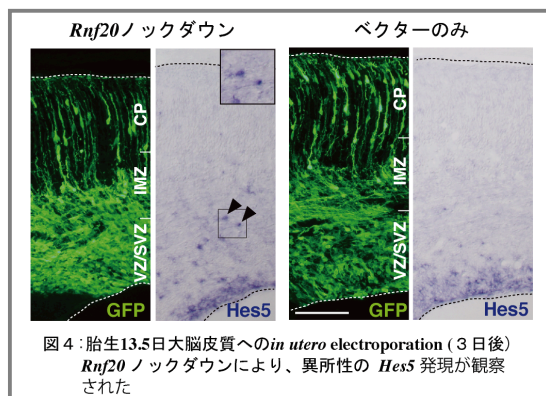


図4：胎生13.5日大脳皮質への*in utero* electroporation (3日後)
Rnf20 ノックダウンにより、異所性の *Hes5* 発現が観察された

神経幹細胞は、発生の時間軸に沿って細胞周期を伸ばしていき、成体脳ではほとんど分裂停止した状態(*quiescent*)になることが知られている。すなわち、神経幹細胞の未分化性維持は、細胞周期調節と密接な関係があると考えられるが、それらがどのように協調的に制御されているのかはわかっていなかった。子宮内電気穿孔法による大脳皮質神経前駆細胞への遺伝子導入の表現型解析により、*Rnf20* のノックダウンによって神経幹細胞の細胞周期が延長することを発見した。その結果、神経幹細胞から神経細胞への分化のタイミングも遅くなることが明らかになった(図5)。すなわち、*Rnf20* は神経幹細胞の未分化性維持と細胞周期調節を協調的に制御する、鍵となる因子であることが初めて解明された。

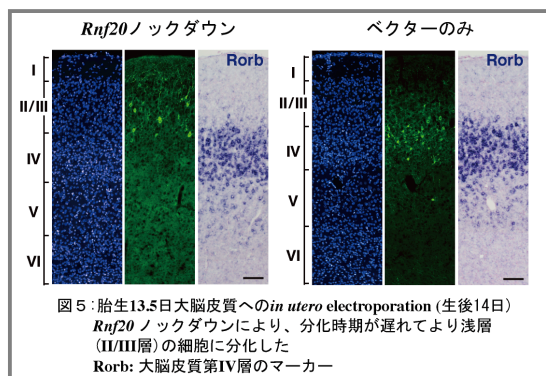


図5：胎生13.5日大脳皮質への*in utero* electroporation (生後14日)
Rnf20 ノックダウンにより、分化時期が遅れてより浅層(II/III層)の細胞に分化した
Rorb: 大脳皮質第IV層のマーカー

Rnf20 遺伝子のノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析したところ、ホモノックアウトは胎生早期に致死となることが判明した。従って神経発生の解析には不向きであることが分かったので、コンディショナルノックアウトマウスの作製・解析が必要であると考えられ、現在進めているところである。神経幹細胞特異的 *Rnf20* 過剰発現トランスジェニックマウスについては、マウスの作製には成功したものの、*Rnf20* の発現量は予想よりも少なく、大きな表現型を見るには至っていない。

最後に、*Rnf20* によるヒストン修飾について解析を加えた。*Rnf20* はヒストン H2B のモノユビキチン化を司る E3 ユビキチンリガーゼと考えられており、マウスでは 120 番目のリジンがモノユビキチン化された H2Bub1 の量を増やすことが知られている。そこで、抗 H2Bub1 抗体を用いた ChIP-seq 法を用い、H2Bub1 が集積しているゲノム部位を網羅的に探索した。その結果、多くの遺伝子の周囲に H2Bub1 の分布が確認されたが、特に細胞周期関連遺伝子やゲノムのリプログラミングに関わる遺伝子などに大きなピークが観察された。すなわち、*Rnf20* はこれらの遺伝子のプロモーター/エンハンサーを含む部位の H2B モノユビキチン化を調節することにより、これら遺伝子の発現制御し、神経幹細胞の未分化性維持や細胞周期調節をコントロールしていることが示唆された。今後さらに、これら遺伝子の発現解析を進めることにより、神経幹細胞の増殖・維持・分化のメカニズムの理解が深まることが期待された。

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8件)

- ① Torii T, Yoshimura T, Narumi M, Hitoshi S, Takaki Y, Tsuji S, Ikenaka K. (2014) Determination of major sialylated N-glycans and identification of branched sialylated N-glycans that dynamically change their content during development in the mouse cerebral cortex. *Glycoconj J* 31, 671–683 査読有
DOI: 10.1007/s10719-014-9566-2
- ② Fuke S, Kametani M, Yamada K, Kubota-Sakashita M, Kasahara T, Kujoth GC, Prolla TA, Hitoshi S, Kato T (2014) A heterozygous *Polg* mutation causes motor dysfunction due to mtDNA deletions. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 1, 909–920 査読有
DOI: 10.1002/acn3.133
- ③ †Zheng L-S, †Hitoshi S, †Kaneko N, Takao K, Miyakawa T, Tanaka Y, Xia H, Kalinke U, Kudo K, Kanba S, Ikenaka K, Sawamoto K (2014) Mechanisms for interferon- α -induced depression and neural stem cell dysfunction. *Stem Cell Reports* 3, 73–84 査読有(† equal contribution)
DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.05.015
- ④ †Ishino Y, †Hayashi Y, Naruse M, Tomita K, Sanbo M, Fuchigami T, Fujiki R, Hirose K, Toyooka Y, Fujimori T, Ikenaka K, Hitoshi S (2014) *Bre1a*, a histone H2B ubiquitin ligase, regulates the cell cycle and differentiation of neural precursor cells. *J Neurosci* 34, 3067–3078 査読有 († equal contribution)
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3832-13.201

- ⑤ Kumar A, Torii T, Ishino Y, Muraoka D, Yoshimura T, Togayachi A, Narimatsu H, Ikenaka K, Hitoshi S (2013) The Lewis X-related α 1,3-fucosyltransferase, Fut10, is required for the maintenance of stem cell populations. *J Biol Chem* 288, 28859–28868 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M113.469403
- ⑥ Shimizu T, Tanaka KF, Takebayashi H, Higashi M, Ono K, Hitoshi S, Ikenaka K (2013) Olig2-lineage cells preferentially differentiate into oligodendrocytes but their processes degenerate at the chronic demyelinating stage of proteolipid protein-overexpressing mouse. *J Neurosci Res* 91, 178–186 査読有
DOI: 10.1002/jnr.23153
- ⑦ 林 義剛, 等 誠司 (2013) インターフェロン治療と depression の神経化学. *神経内科* 79, 29–34 査読無
- ⑧ 等 誠司, 清水崇弘, 池田一裕 (2013) 免疫性神経疾患における神経幹細胞と再生戦略. *日本臨床* 71, 795–800 査読無

[学会発表] (計 2 2 件)

- ① 等 誠司, 成瀬雅衣, 池田一裕. 神経幹細胞からオリゴデンドロサイト系譜細胞が産生される分子機序. 第120回日本解剖学会・第92回日本生理学会 合同大会 2015年3月21-23日 神戸
- ② Hitoshi S, Fuke S, Kumar A, Ikenaka K. The Lewis X-related α 1,3-fucosyltransferase, Fut10, is required for the maintenance of stem cell populations. *Society for Glycobiology & Japanese Society of Carbohydrate Research 2014 Joint Annual Meeting - Satellite Symposia "Glycans in Neuroscience"* 2014年11月16-19日 Honolulu (USA)
- ③ 等 誠司. 精神疾患の病態に迫る. 第57回日本神経化学会, 第36回日本生物学的精神医学会 合同年会 若手研究者教育セミナー 2014年9月29-10月1日 奈良
- ④ Hitoshi S, Hayashi Y, Fuchigami T, Fuke S, Ishino Y, Ikenaka K. Epigenetic mechanisms underlying the generation and differentiation of neural stem cells. *12th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research* 2014年6月18-21日 Vancouver (Canada)
- ⑤ Fuchigami T, Hayashi Y, Ema M, Kuroda A, Hitoshi S. Role of Krüppel-like factor 5 in the proliferation and radial migration of neural precursor cells. *Society for Neuroscience 43rd Annual Meeting* 2013年11月9-13日 San Diego (USA)
- ⑥ Hitoshi S. 気分障害の作用機序から考察した双極性障害の病態機序. 第10回日本うつ病学会 2013年7月19-20日 小倉
- ⑦ Hitoshi S. Epigenetics underlying the maintenance of neural stem cells.

Neuro2013 2013年6月20-23日 京都

- ⑧ Hitoshi S. Epigenetic mechanisms underlying the generation and maintenance of mammalian neural stem cells. 第7回エピジェネティクス研究会年会 2013年5月30-31日 奈良
- ⑨ Ishino Y, Hitoshi S, Ikenaka K. Roles of Bre1, a histone H2B ubiquitin ligase, in the neural precursor cell proliferation and differentiation. *Society for Neuroscience 42nd Annual Meeting* 2012年10月13-17日 New Orleans (USA)
- ⑩ Hitoshi S. Epigenetic regulation on the generation and maintenance of neural stem cells. 第35回日本神経科学学会 (Neuroscience 2012) 2012年9月19-21日 名古屋

[図書] (計 1 件)

- ① 小山なつ, 等 誠司. ゲートコントロール説. *Clinical Pain Management 痛みの診療 キーポイント5* (川真田樹人編) 文光堂 pp44, 2014

[その他]

ホームページ等
統合臓器生理学部門
<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqphysi1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

等 誠司 (HITOSHI, Seiji)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70300895

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

池田 一裕 (IKENAKA, Kazuhiro)
生理学研究所・分子生理研究系・教授
研究者番号: 00144527