

平成30年6月1日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06711

研究課題名(和文) 成体脳ニューロン新生の分子制御機構解明とその応用

研究課題名(英文) Elucidation of molecular regulation mechanism of adult brain neurogenesis and its application

研究代表者

下崎 康治 (SHIMOZAKI, Koji)

長崎大学・先端生命科学研究所支援センター・助教

研究者番号：40379540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：成体脳におけるニューロン新生の分子機構の解明と人工的コントロール法の開発を目指すために、DNAメチル化機構を制御するDNA脱メチル化因子TET1に着目し、成体脳神経幹細胞の網羅的遺伝子発現解析と細胞生物学的解析を行なった。その結果、TET1はTET2との共通の自己複製制御機構が存在する一方で、TET1特異的な下流制御因子としてのREV-ERB β の存在が明らかとなった。さらにREV-ERB β の分子生物学的解析の結果、REV-ERB β が神経幹細胞の未分化及びニューロン分化の制御機構に関わることを明らかにし、REV-ERB β のリガンドによる人工的なニューロン新生のコントロールの可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the molecular mechanism of neurogenesis in adult brain and to develop artificial control method, I focused on DNA demethylation factor TET1 which controls DNA methylation, and comprehensive gene expression analysis of neural stem cells (NSCs) derived from adult brain, and cell biological analysis were performed. As a result, while TET1 has a common self-renewal control mechanism with TET2, the presence of REV-ERB β as a TET1-specific downstream regulatory factor was revealed. Furthermore, molecular biological analysis of REV-ERB β revealed that REV-ERB β is involved in the regulation of undifferentiation and neuronal differentiation of adult NSCs, and it is possible to control artificial neurogenesis by ligands of REV-ERB β was also suggested.

研究分野：分子神経科学

キーワード：神経科学 神経幹細胞 ニューロン新生 未分化維持機構 自己複製機構 エピジェネティクス 転写因子

1. 研究開始当初の背景

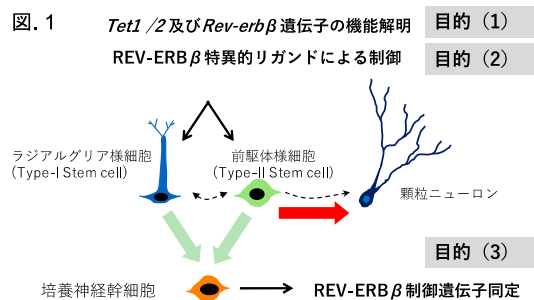
成体脳の海馬領域ではニューロンの新生が行われ続ける。その新生ニューロンは記憶のパターン分離に重要な役割を担っていることが明らかとなっており、神経疾患の基礎構造として注目を集めている。新生ニューロンは神経幹細胞から生み出され、成体脳神経幹細胞の未分化維持機構やニューロン新生機構において転写因子 Sox2 が必須分子であることが報告されていた。胚性幹細胞 (ES 細胞) において Sox2 は ES 細胞の未分化維持ネットワークに必須な転写因子 Oct4 のパートナー分子であるが、成体脳で Oct4 は発現していない。この観点から申請者は成体脳由来の神経幹細胞における Sox2 のパートナー因子の探索を行ってきた。その結果、Sox2 が核内受容体 TLX の転写制御を行い、両者の結合による調節と TLX 自身によるネガティブフィードバック機構によって TLX の遺伝子発現制御を行う新規モデルを提唱した (*J. Biol. Chem.*, 2012)。さらに申請者は、Sox2 の新たなパートナー因子として転写因子 Prx1 を新規に同定した。 (*J. Neurosci.*, 2013)。

一方、神経幹細胞の自己複製能と多分化能は染色体の構造レベルによっても制御されている。染色体 DNA はメチル基転移酵素によって CpG の 5 位のシトシンがメチル化を受けることで機能的に制御を受ける。このメチル基の有無によって神経幹細胞の神経分化の細胞系譜は大きな影響を受けることが知られている。申請者は ES 細胞から神経幹細胞の誘導培養を独自に樹立し、ニューロンとアストロサイトの分化過程においてアストロサイト特異的マーカー遺伝子の発現が DNA のメチル化によって制御されることを示した (*J. Neurochem.*, 2005)。近年このメチル化シトシンは DNA 脱メチル化酵素である TET ファミリー分子によって脱メチル化されることが明らかとなってきた。さらに TET ファミリー (TET1/2/3) の中で TET1 が成体脳のニューロン新生に必須であるという報告 (Zhang, 2013) から、成体脳の神経幹細胞においても DNA のメチル化制御は重要な働きをしていることも示唆されていた。申請者は神経幹細胞における *Tet1* 遺伝子のノックダウン法による遺伝子の網羅的発現解析を行う過程において、*Rev-erb* 遺伝子とその下流制御因子として機能していることを見出した。REV-ERB はサーカディアンリズムや代謝調節において非常に重要な役割を果たしていることが報告されているが、神経幹細胞の自己複製能やニューロン新生への関与は不明であった。加えて、TET1 の制御ネットワークと細胞機能、及び REV-ERB の分子ネ

ットワークとその役割についても情報は十分ではなかった。また REV-ERB は核内受容体であることから、リガンド化合物の投与によって外部から遺伝子発現の分子操作が個体レベルで可能であることから、神経幹細胞の人為コントロールも期待された。このような背景から、本申請研究は TET1 の培養神経幹細胞における機能と遺伝子発現ネットワークの解明に並んで、*Rev-erb* 遺伝子の下流制御遺伝子の網羅的解析によって、成体脳由来神経幹細胞の自己複製機構及びニューロン新生における分子ネットワークを明らかにすることに加え、特異的リガンドによるニューロン新生の自在的コントロール法の開発を目指すことを目的とした。

2. 研究の目的

生涯に渡って行われる、成体脳神経幹細胞からのニューロン新生の分子機構の多くは不明である。本申請研究はニューロン新生の分子機構の一端を担う可能性がある *Tet1* 及び *Rev-erb* 遺伝子に着目し、その遺伝子環境を解析することで、成体脳海馬ニューロン新生の分子機構の一部を解明することを目的とした。また、その機構を利用することでニューロン新生を自在にコントロールすることを目標とし、基礎分子神経科学の深い学術的理解と同時に、実現可能な臨床治療法の開発を目的とした。下記がその概略 (図. 1) である。



- (1) ニューロン新生における TET1 と *Rev-erb* 遺伝子の役割の解明。
- (2) 成体脳神経幹細胞における TET1 と *Rev-erb* 遺伝子発現制御ネットワーク因子の同定。
- (3) REV-ERB に対する特異的リガンド化合物の *in vitro* 及び *in vivo* におけるニューロン新生への影響観察とニューロン新生の自在的コントロール法の開発。

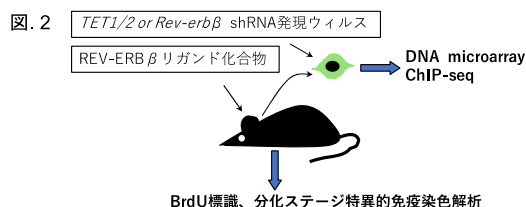
3. 研究の方法

<目的1> *Tet1* 遺伝子及び *Rev-erb* 遺伝子の長期的な遺伝子ノックダウンを実現するために *Rev-erb* 遺伝子に対する shRNA を発現するレンチウイルスベクターを構築する。U6 プロモーターと *Rev-erb* 遺伝子に対する shRNA 配列を含む DNA 断片とレンチウイルスベクター (pCSC-sp-pw-IRES-EGFP) を組換えることで得る。このベクター-DNA を高感染率ウイルスベクター作成用のパッケージングコンストラクトと共に 293T 細胞に導入し、濃縮発現ウイルス溶液の作製を行う。その後、この濃縮ウイルス溶液を生後 10 週齢以降の成体マウスの各脳領域にステレオタキシスを用いて注入接種し、*in vivo* 導入感染を行う。ウイルス接種後、マウスを飼育し、48 時間後、72 時間後、7 日後、14 日後とタイムコースをとる。脳の適宜回収後、凍結組織切片を作成し、GFAP、Nestin、BLBP 等の神経幹細胞マーカー、Doublecortin、Prox1 等の初期神経分化マーカー、さらに S100 (成熟アストロサイト) や NG2 (オリゴデンドロサイト) などのマーカータンパク質に対する抗体を用いて免疫染色を行う。shRNA 発現レンチウイルスベクターが感染した細胞は同時に EGFP 遺伝子を発現するので、共染色後の各染色細胞のカウントと統計処理解析から、どのステージの細胞が *Rev-erb* 遺伝子のノックダウンによる影響を受けるかが明らかとなる。また細胞増殖マーカーである細胞周期関連核タンパク質 Ki67 に対する免疫染色や DNA 複製時に取り込ませるチミジンアナログ BrdU に対する免疫染色を組み合わせ、時間空間的な自己複製能及び多分化能に対する役割を解明する。レンチウイルスベクターによる shRNA ノックダウンシステムが計画どおりに進まない場合、REV-ERB のドミナントネガティブ変異体をレトロウイルスベクターにて強制発現させ、同様の解析を行うことで目的 (1) の *in vivo* における REV-ERB の機能的役割を明らかにする。

<目的2> *Rev-erb* 遺伝子に対する shRNA と EGFP を発現するコンストラクトをこの培養神経幹細胞に遺伝子導入し、EGFP 陽性細胞を FACS Aria II にて分取する。この手法がうまくいかない場合、EGFP を Puromycin 耐性遺伝子に組み換えたベクターを作製し、薬剤選択によってノックダウン細胞を得る。これらの細胞から total RNA を得て、DNA マイクロアレイ受託解析を行い、*Rev-erb* 遺伝子のノックダウンによって発現変動する遺伝子を明らかにする。また余力がある場合、このノックダウン細胞を抗 REV-ERB 抗体によって ChIP 処理し、次世代シーケンサー受託解析を行い、REV-ERB のターゲット遺伝子を同定する。そしてそれらの遺伝子発現量を定量 PCR 解析し、その正当性を確認する。これにより REV-ERB の包括的遺伝子ネットワークを明らかにする。

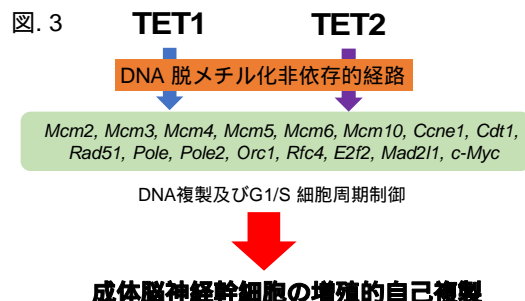
<目的3> REV-ERB の特異的リガンド化合物である SR9009 でその転写抑制能を活性化させ、新生ニューロンを増加させることを目標とするが、その研究基盤を得るためにラット成体脳由来神経幹細胞に特異的リガンドを加えて、神経幹細胞に対する影響を観察することを第一義として行う。

研究計画の全概略 (図. 2) は下記。



4. 研究成果

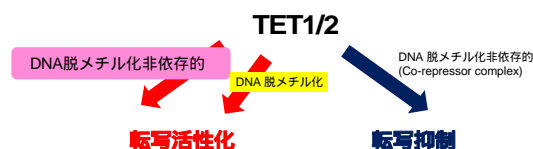
本申請研究はDNA脱メチル化因子TET1の成体脳ニューロン新生の分子制御ネットワーク因子の一つとして申請者が見出したREV-ERBの神経新生における役割を解明することを目的の一つとしている。成体脳由来神経幹細胞におけるTET1による*Rev-erb*遺伝子の発現制御ネットワークと分子的文脈を解明するために、shRNA発現ベクターシステムによってノックダウンした神経幹細胞からcDNAを調整し、DNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現の比較データ解析を行った。この時TET1の遺伝子機能をより明確に解明するために、TETファミリー分子のうち神経細胞に発現し、細胞の生存率に影響を与えるTET2との比較解析を行った。その結果、*Tet1*と*Tet2*をノックダウンして遺伝子発現レベルが低下する遺伝子に共通するものとそうでないものに分類しうることが明らかとなった。共通する因子のうち、DNA複製とG1/S期の細胞周期の調節機構に与えるものが確認された (図. 3)。これらは神経幹



細胞の増殖的自己複製機構に密接に関係している。TET1とTET2はDNA脱メチル化機構によってプロモーター領域に作用し、遺伝子の転写を活性化することが知られているが、さ

らに興味深いことに本研究によって、DNA脱メチル化機構を介さずにTET1とTET2が何らかのメカニズムによって転写を活性化する可能性があることを示唆した(図. 4)。これら一連の研究データをまとめ、海外科学雑誌に報告した(*Cell. Mol. Neurobiol.*, 2017)。

図. 4

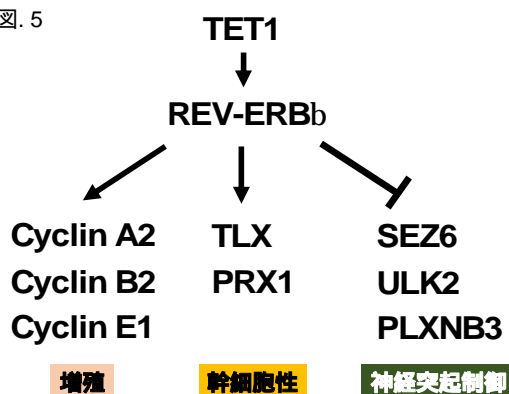


TETファミリーの遺伝子ノックダウン法による網羅的遺伝子発現比較解析の結果、申請者は*Rev-erb* 遺伝子がTET1のノックダウンに特異的に変化する遺伝子であることを見出したため、まずREV-ERB の発現を培養神経幹細胞にて確認した。その結果、REV-ERB タンパク質が神経幹細胞マーカーである転写因子Sox2と同様に培養神経幹細胞の核に主に局在することが明らかとなった。またマウス成体脳の神経幹細胞における*Rev-erb* 遺伝子の機能を明らかにするために、*Rev-erb* 遺伝子に対するshRNA発現ノックダウンベクターをレンチウイルスベクターシステムにて構築した。さらに*Rev-erb* 遺伝子の遺伝子発現変化を定量的に明らかにするため、ノックダウン後に抽出したRNAよりcDNAを作製し、定量PCRにて実測定した。このshRNA発現ウイルスベクターのタイターを測定し、濃縮ベクターを成体マウス脳の海馬領域にステレオタキシス・マイクロインジェクション法にて注入接種した。この接種マウスにBrdUを投与飼育し、パラフォルムアルデヒド固定の後に海馬領域を免疫染色法にて解析した。このノックダウンベクターはEGFPを発現するため、感染した細胞は緑色に検出される。*in vivo*における*Rev-erb* 遺伝子のノックダウン解析はNestin、BLBP、DCX、NeuNなどのマーカー遺伝子に対する抗体との共染色による細胞形態の観察により行なった。また投与したBrdUの取り込み率の測定のため、脳組織切片を抗BrdU抗体で処理した免疫染色解析を行なった。その結果、*Rev-erb* 遺伝子のノックダウンでは古・新生どちらのニューロンの形態にも明白な変化は観察されず、BrdUの取り込み率にも統計的有意差は観察されないことが明らかとなった。しかしながらこのシステムは培養細胞で機能することが分かっていたが、*in vivo*ではポジティブコントロールの*Tet1*遺伝子の

ノックダウンサンプルにも有意差が検出されなかったことから、*in vivo*特有のshRNAノックダウンのシステム上の問題があると推察される。そのため別の手法による解析を試みた。代替プランである*Rev-erb* 遺伝子のドミナントネガティブ体の発現ベクターを構築した。*in vivo*で単一の新生ニューロンに遺伝子導入可能なシステムであるレトロウイルスベクターに*Rev-erb* 遺伝子のドミナントネガティブ体を組換え導入した。このドミナントネガティブタイプの*Rev-erb* 遺伝子の発現レトロウイルスベクターは同時にEGFP遺伝子を発現するため、導入細胞の蛍光標識が*in vivo*において可能である。このウイルスベクターをパッケージング細胞に導入し、遠心濃縮後の培養上清を用いてマウス培養神経幹細胞の感染導入実験を行った結果、この発現ベクターシステムが十分機能することが確認された。この発現レトロウイルスベクターを、脳固定装置を用いたステレオタキシス・マイクロインジェクション法にて野生型の成体マウスの海馬歯状回領域に注入接種した。この方法ではマウス歯状回SGZの神経幹・前駆細胞に発現ベクターを導入することが可能であり、時間経過と共に新生ニューロンにも引き継がれる。感染効率を上げるためにこのウイルスベクターをパッケージング細胞に導入後、その培養上清を遠心濃縮した。ウイルスベクター接種後のマウスを4週間飼育後、脳を取り出して切片を作製し免疫染色解析を行なった。*Rev-erb* 遺伝子のドミナントネガティブ体を発現しているEGFPラベルされた新生ニューロンを詳細に解析した結果、樹状突起形成が対照に比べて脆弱な傾向が得られた。即ち*Rev-erb* 遺伝子の*in vivo*での新生ニューロンの役割として、神経突起形成に影響を与えることが示唆された。さらに研究計画に則り、*Rev-erb* 遺伝子発現制御因子の同定を試みた。構築したshRNA発現レンチウイルスノックダウンシステムは効果的でないことが判明したため、*Rev-erb* 遺伝子を効果的にノックダウンするシステムとして、エレクトロポレーション法によるノックダウンベクターDNAの成体脳由来培養神経幹細胞への遺伝子導入法の詳細を検討した。得られた実験条件を用いて培養神経幹細胞の*Rev-erb* 遺伝子をノックダウンすることにより自己複製機構への関与を検討した。その結果、*Rev-erb* 遺伝子のノックダウンが培養神経幹細胞のBrdUの取り込み率を低下させ、さらにFACSを用いてノックダウン神経幹細胞のDNA解析を行ったところ、G0/G1期の増加、S期及びG2/M期の減少が観察された。またneurosphere形成アッセイの結果、*Rev-erb* 遺伝子のノックダウンによってneurosphereの増殖効率も低下する

ことが明らかとなり、得られたデータの総合的解釈によりREV-ERB が培養神経幹細胞の自己複製的増殖機構に関与していることが示唆された。さらに培養神経幹細胞の *Rev-erb* 遺伝子をノックダウンし、total RNAの抽出・cDNA変換後にDNAマイクロアレイ比較解析を行なった。この解析により *Rev-erb* 遺伝子が細胞周期と神経幹細胞性に関する遺伝子と神経突起制御機構に関与する遺伝子の発現を制御しうることが明らかとなった。特にCyclin A2, Cyclin B2, Cyclin E2は増殖の制御、TLXとPRX1は神経幹細胞性の維持に働いていることが示唆された。また神経突起を負に制御する因子である

図. 5



SEZ6, ULK2, PLXNB3を転写抑制因子であるREV-ERB が発現抑制することで神経突起を正に制御する可能性が示唆された(図. 5)。さらにこれらの結果をまとめ、海外科学雑誌に報告した(*Cell. Mol. Neurobiol.*, 2018)。またREV-ERB の特異的リガンド化合物であるSR9009の神経幹細胞に対する効果を検討したところ、増殖と分化の両方に影響を与える傾向が得られたため、現在引き続き解析を進めている。

本研究により申請者は、DNA脱メチル化酵素であるTETファミリーのうち、TET1とTET2には自己複製を共通的に制御するDNA脱メチル化に依存しない機構が存在することを明らかにし、特に成体脳の神経幹細胞の神経新生に関与していると考えられるTET1の下流において、REV-ERB が成体脳神経幹細胞の増殖的自己複製機構と神経突起制御機構を制御するという新規モデルを提唱した。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Koji Shimozaki :

Involvement of Nuclear Receptor REV-ERB in Formation of Neurites and Proliferation of Cultured Adult Neural Stem Cells, *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38 巻 5 号 1051 頁-1065 頁, 2018 年 6 月, 査読あり

2. Koji Shimozaki :

Ten-Eleven Translocation 1 and 2 Confer Overlapping Transcriptional Programs for the Proliferation of Cultured Adult Neural Stem Cells, *Cellular and Molecular Neurobiology*, 37 巻 6 号 995 頁-1008 頁, 2017 年 7 月, 査読あり

[学会発表](計 2 件)

1. 下崎 康治 (発表者) :

成体脳由来神経幹細胞の自己複製機構とニューロン分化の分子制御を担う制御因子、2017 年 11 月 25 日、第二回ストレスと幹細胞研究会(宮崎市)

2. 下崎 康治 (発表者) :

成体脳由来神経幹細胞における Tet メチル化シトシンヒドロキシラーゼの共通遺伝子調節経路、第 40 回日本神経科学大会、2017 年 7 月 21 日(千葉市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下崎 康治 (SHIMOZAKI, Koji)

長崎大学・

先端生命科学支援センター・助教

研究者番号 : 40379540

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究協力者

Fred H, GAGE