

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04671

研究課題名(和文) 神経幹細胞の運命決定の分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of the fate determination 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) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)： 神経幹細胞の維持や分化開始を決定するエピゲノム因子として、Bre1aの機能解析を行った。Bre1aノックアウトES細胞を樹立するとともに、テトラサイクリン誘導によりBre1発現量を制御できるES細胞を作製し、解析した結果、Bre1aが司るヒストンH2Bのモノユビキチン化を介して様々な遺伝子の発現を変動させていることを明らかにした。その結果として、細胞増殖を調節するとともに分化開始を制御していることが判明した。また、神経幹細胞特異的Bre1aコンディショナルノックアウトマウスを作製して表現型を解析したところ、生体においてもBre1aが神経幹細胞の未分化性維持に重要な機能を有することが判った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳の発生において極めて重要な役割を果たす神経幹細胞において、様々なエピゲノム修飾因子が織りなすネットワークを解明し、多様な神経細胞・グリア細胞からなる脳が構築される根本原理の一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)： In this study, we analyzed the function of Bre1a, one of epigenetics factors, in the maintenance of neural stem cells. First, we established Bre1a knockout ES cells from embryonic day 3.5 blastocysts of Bre1a-null mice and also generated tetracycline-regulated Bre1a overexpressing ES cells. By examining these ES cell lines, we found that Bre1a-mediated histone H2B monoubiquitylation regulated the expression of many genes, which resulted in the alteration of proliferation and differentiation of ES cells. We further generated Bre1a conditional knockout mice and analyzed the phenotypes of Bre1a-null mouse embryos. We found that Bre1a knockout modified the self-renewal and multipotential capabilities of neural stem cells. We have been investigating the molecular mechanisms underlying these changes.

研究分野：神経科学

キーワード：神経幹細胞 神経発生 エピジェネティクス 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は、一層の神経上皮細胞から大量の神経細胞・グリア細胞（オリゴデンドロサイト、アストロサイト）を産生する必要があり、これら全ての細胞の起源である神経幹細胞の神経発生における重要性は言うまでもない。発生初期に神経幹細胞自身が形成され（マウスでは胎生 8.5 日）、対称分裂によって指数関数的に数を増やした後（増殖期）、胎生中期には神経細胞を産生する（神経細胞産生期）。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（グリア細胞産生期）（図 1）。また、神経幹細胞の細胞周期（Tc）は胎生中期から後期にかけて倍以上に伸長し、成体の脳内では細胞周期 15 日以上とほぼ細胞分裂が停止した状態で維持されている。すなわち、神経幹細胞は脳の発達段階に応じて細胞周期や分化能などの性質を劇的に変化させるが、その分子メカニズムには不明な点が多い。最近、この変化の過程にエピゲノム修飾が深く関与しているという知見が集積しつつあるが、神経幹細胞が細胞周期を伸ばしながら未分化な状態に維持される分子機序や、神経細胞・グリア細胞へと運命決定されるメカニズムについては、知見が極めて乏しかった。

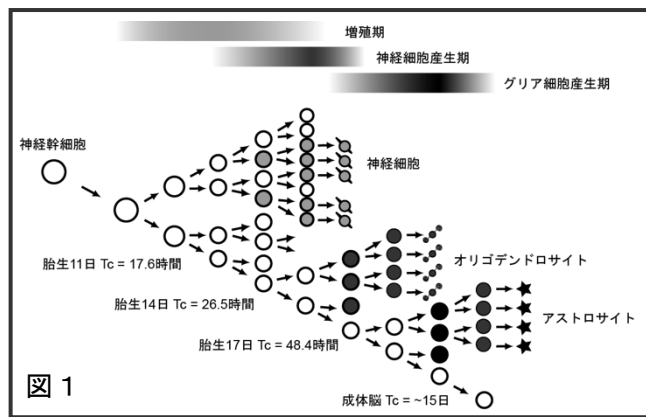


図 1

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* 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、エピゲノム修飾による制御を受けていることを見出した。胎生初期の神経上皮細胞において、*Hes5* 発現は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。Notch シグナルが活性化して神経幹細胞が誘導されるためには、*Hes5* プロモーターが脱メチル化されなければならないが、ここに *Glial cells missing* 遺伝子が関わっていることを報告した (Hitoshi *et al.*, *Nat Neurosci* 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 *Brela* 遺伝子を同定し、神経幹細胞における機能を解析した (Ishino *et al.*, *J Neurosci* 2014)。*Brela* は、ヒストン H2B に対する E3 ユビキチンリガーゼであり、H2B のモノユビキチン化を介してヒストン H3K4 のトリメチル化を促進し、多くの遺伝子の転写調節を行なっている。脳において *Brela* はユビキタスに発現しているが、神経幹細胞では発現が抑制されており、このことが神経幹細胞の未分化性維持と細胞周期の伸長に必須であることを明らかにした。

これらの知見から、*Brela* によるエピゲノム修飾が神経幹細胞の運命決定の鍵を握る因子の 1 つと考え、ノックアウトマウスを作製した。残念なことに、*Brela*^{-/-} 胚は胎生 5.5 日までに致死となることが判明し、神経系での *Brela* 機能喪失の表現型を直接解析することはできなかったが、ES 細胞や胎生致死になる前の胚を用いた解析は、*Brela* の機能を解明する上で重要なステップと考え、本研究を提案するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、*Brela* を中心にゲノム修飾因子のネットワークが、(神経)幹細胞の分化開始の決定を制御している分子メカニズムを解明する。

Brela^{-/-} ES 細胞のマイクロアレイ解析から、*Klf4*, *Klf5* などの ES 細胞の未分化性維持に関わる遺伝子や、*Tet1*, *Tet2* のような DNA 脱メチル化を司る遺伝子、chromatin remodeling enzyme をコードする *Chd* ファミリー遺伝子などの、ゲノム修飾に重要な働きをしている多くの遺伝子発現を、*Brela* が制御している可能性が示唆されている。そこで、*Brela* が制御するゲノム修飾因子の中でも、幹細胞において未分化性維持に極めて重要な働きを有する *Klf4*, *Klf5* 遺伝子に焦点を絞り、神経幹細胞の未分化性維持における役割を明らかにする。*Brela* を中心として、*Klf4*, *Klf5* などのゲノム/エピゲノム修飾因子が織りなすネットワークを解明し、多様な神経細胞・グリア細胞からなる脳が構築される根本原理を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

① *Brela*^{-/-} ES 細胞を用いた *Brela* 標的遺伝子の網羅的探索

既に作製した *Brela* ノックアウトマウスを用い、胎生 3.5 日胚盤胞から *Brela*^{-/-} ES 細胞を樹立する。樹立した ES 細胞を用い、*Brela* が媒介するとされるヒストン H2B のモノユビキチン化を定量し、*Brela* とモノユビキチン化ヒストン H2B (H2Bub1) 量との相関を検証する。その上で、増殖速度や分化能力などの *Brela*^{-/-} ES 細胞の基本的な性質を明らかにした上で、*Brela*^{-/-} ES 細胞を用いたトランスクリプトーム解析 (RNA-seq) を行う。さらに、H2Bub1 に対する特異抗体 (H2B は認識しない) を用いたクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) 解析を行い、*Brela* 遺伝子

発現量と相関して H2Bub1 集積量が変化するゲノム領域を同定して、Bre1a-H2Bub1 が制御している標的遺伝子候補の網羅的探索を行う。

② 神経幹細胞特異的 *Bre1a* および *Klf4/5* ノックアウトマウスの解析

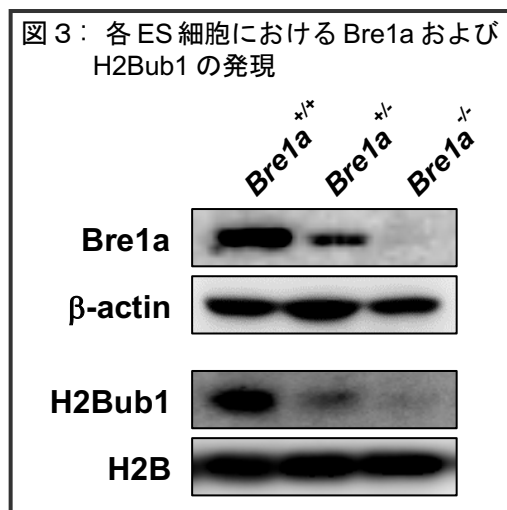
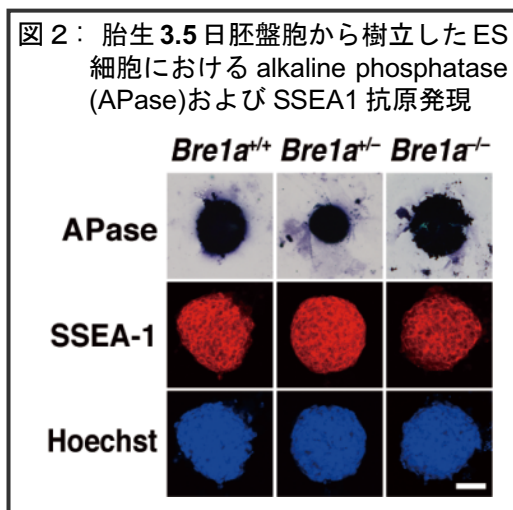
神経発生や神経幹細胞の維持・分化における *Bre1a* の機能を明らかにするため、*Bre1a* コンディショナルノックアウト(cKO)マウスを作製した。エクソン 3-5 の前後に loxP を挿入するノックインベクターを用い、CRISPR/Cas9 法を用いてノックインの効率を高めながら、マウス受精卵に対してノックインを行った。*Klf2*, *Klf4*, *Klf5* コンディショナルノックアウトマウスは、連携研究者の滋賀医科大学・動物生命科学センター 依馬正次教授に提供していただき、神経幹細胞特異的 Cre ドライバーマウスと交配して解析を行った。

神経幹細胞の培養は Neurosphere assay 法を用いた。胎仔脳の基底核隆起脳室層もしくは成体脳の脳室上衣下層から組織を採取し、細胞を分散した後に、FGF2 (胎仔脳の場合) もしくは FGF2 と EGF (成体脳の場合) を添加した無血清培地で培養した。5-7 日の培養後に直径 0.1mm 以上の浮遊細胞塊を primary neurosphere とした。Neurosphere を形成した元の神経幹細胞の自己複製能は、primary neurosphere を継代培養して得られた secondary neurospheres の数で評価した。多分化能は、neurosphere をカバーガラスに接着させて分化条件で培養した後に、神経細胞・オリゴデンドロサイト・アストロサイトに分化した細胞を免疫染色法で同定して評価した。

4. 研究成果

① *Bre1a*^{-/-} ES 細胞を用いた *Bre1a* 標的遺伝子の網羅的探索

Bre1a ノックアウトマウスは、胎生 3.5 日前後までは明らかな発生異常を示さず、メンデルの法則通りの数の胚が得られた。そこで、胎生 3.5 日胚盤胞から ES 細胞を樹立して解析を行ったところ、*Bre1a*^{-/-} ES 細胞では alkaline phosphatase 活性や SSEA1 抗原発現などの未分化性に異常は認めなかった (図2)ものの、*Bre1a*^{+/+} および *Bre1a*^{+/-} ES 細胞と比べて増殖速度が著しく低下していた。



ウェスタンブロット法でタンパク質量を調べたところ、*Bre1a*^{-/-} ES 細胞では *Bre1a* の発現とともに H2Bub1 量が著減していた (図3)。これらの結果は、ChIP-seq 解析によっても確認された。また、*Bre1a* ノックアウトによって発現変化する遺伝子群を RNA-seq によって同定し、ChIP-seq の結果に参照することで、*Bre1a* が直接発現制御している遺伝子のいくつかを同定できた。今後は、ヒストン H2B のモノユビキチン化が引き起こすヒストンマークの変化を明らかにし、*Bre1a* が起点となって引き起こされるヒストン修飾カスケードを解明する予定である。

② 神経幹細胞特異的 *Bre1a* および *Klf4/5* ノックアウトマウスの解析

Bre1a cKO マウスの作製は、当初 ES 細胞を用いてターゲッティングを行い、LoxP の挿入が確認された ES 細胞をマウス受精卵に注入することでキメラマウスを取得する方法で行った。その結果、キメラマウスは得られたものの生殖細胞系列には継承されず、次世代マウスを得ることはできなかった。そこで本研究の期間を延長し、CRISPR/Cas9 法を用いてノックインの効率を高めながら、マウス受精卵に対してノックインを行った。エクソン 3-5 の前後に loxP が挿入されたマウスが得られ、次世代に伝達されることが確認されたため、神経幹細胞特異的にタモキシフェン誘導型 Cre を発現する Nestin-CreER マウスと交配させて解析を行った。胎生 14.5 日胚の基底核隆起脳室層から Neurosphere assay 法で神経幹細胞を培養する際に、タモキシフェン添加によって *Bre1a* をノックアウトしたところ、primary neurosphere の数が減少することが判明した。現在、この現象が神経幹細胞の自己複製能の修飾によるものかどうか、検証中である。

一方、神経幹細胞特異的に *Klf2*, *Klf4*, *Klf5* をノックアウトしたマウスを、胎生期に経時的に解析した。これらの遺伝子は多能性幹細胞の維持に極めて重要な働きを担っているため、胎生致死になることが予想されたが、予想に反して *Klf2*, *Klf4*, *Klf5* それぞれのノックアウトマウスは正常に発生・発育することが判明した。さらに、これら3つの遺伝子のうち2つのダブルノックアウトマウスにおいても、明らかな表現型を観察できなかったが、トリプルノックアウトマウスは胎生早期に致死になることから、神経発生における *Klf2*, *Klf4*, *Klf5* には機能冗長性があることが判明した。現在、致死に至る分子メカニズムや脳の構築異常を中心に、詳細な解析を行っているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Daun Kenny Anak, Fuchigami Takahiro, Koyama Natsu, Maruta Noriko, Ikenaka Kazuhiro, Hitoshi Seiji	4. 巻 14
2. 論文標題 Early Maternal and Social Deprivation Expands Neural Stem Cell Population Size and Reduces Hippocampus/Amygdala-Dependent Fear Memory	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2020.00022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Seita Yasunari, Tsukiyama Tomoyuki, Azami Takuya, Kobayashi Kenichi, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Nakaya Masataka, Tanabe Hideyuki, Hitoshi Seiji, Miyoshi Hiroyuki, Nakamura Shinichiro, Kawauchi Akihiro, Ema Masatsugu	4. 巻 100
2. 論文標題 Comprehensive evaluation of ubiquitous promoters suitable for the generation of transgenic cynomolgus monkeys†	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 1440 ~ 1452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioz040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi Yoshitaka, Jinnou Hideo, Sawamoto Kazunobu, Hitoshi Seiji	4. 巻 147
2. 論文標題 Adult neurogenesis and its role in brain injury and psychiatric diseases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 584 ~ 594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14557	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuroda A, Fuchigami T, Fuke S, Koyama N, Ikenaka, Hitoshi S	4. 巻 43
2. 論文標題 Minocycline Directly Enhances the Self-Renewal of Adult Neural Precursor Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 219 ~ 226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-017-2422-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naruse M, Ishizaki Y, Ikenaka K, Tanaka A, Hitoshi S	4. 巻 67
2. 論文標題 Origin of oligodendrocytes in mammalian forebrains: a revised perspective.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 63-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Seita Y, Tsukiyama T, Iwatani-Tsuchiya C, Tsuchiya H, Matsushita J, Azami T, Okahara J, Nakamura S, Hayashi Y, Hitoshi S, Imamura T, Miyoshi H, Saitou M, Ogasawara K, Sasaki E, Ema M	4. 巻 6
2. 論文標題 Generation of transgenic cynomolgus monkeys that express green fluorescent protein throughout the whole body.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 24868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep24868	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi M, Seki T, Imayoshi I, Tamamaki N, Hayashi Y, Tatebayashi Y, Hitoshi S	4. 巻 66
2. 論文標題 Neural stem cells and neuro/gliogenesis in the central nervous system: understanding the structural and functional plasticity of the developing, mature, and diseased brain.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 197-206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-015-0421-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Naruse M, Ishino Y, Kumar A, Ono K, Takebayashi H, Yamaguchi M, Ishizaki Y, Ikenaka K, Hitoshi S	4. 巻 26
2. 論文標題 The dorsoventral boundary of the germinal zone is a specialized niche for the generation of cortical oligodendrocytes during a restricted temporal window.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 2800-2810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhv141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 11件）

1. 発表者名 Daun K, Morimura N, Nozaki K, Tanigaki K, Hitoshi S
2. 発表標題 Aberrant regulation of monoubiquitination via E3 ubiquitin ligase RNF20 confer Gbm cancer stem-like cells survival and maintenance.
3. 学会等名 ISN-ASN 2019 (Montreal) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Abdullah A, Hayashi Y, Fuke S, Fuchigami T, Morimura N, Koyama N, Hitoshi S
2. 発表標題 Association between demethylation and differentiation of neural cells by mammalian GCM1 and GCM2.
3. 学会等名 ISN-ASN 2019 (Montreal) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayashi Y, Fuke S, Go Y, Abdullah A, Fuchigami T, Morimura N, Koyama N, Hitoshi S
2. 発表標題 Glial cells missing 1 promote cell differentiation and angiogenesis by growth factor expression.
3. 学会等名 ISN-ASN 2019 (Montreal) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kuroda A, Fuchigami T, Morimura N, Hayashi Y, Koyama N, Ema M, Hitoshi S
2. 発表標題 The function of Klif5 gene in adult brain.
3. 学会等名 ISN-ASN 2019 (Montreal) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakaji K, Fuchigami T, Morimura N, Hayashi Y, Koyama N, Hitoshi S
2. 発表標題 Mood stabilizing drugs activate adult neural stem cellsneurogenesis system.
3. 学会等名 ISN-ASN 2019 (Montreal) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitoshi S, Kuroda A, Ema M, Fuchigami T
2. 発表標題 成体脳神経幹細胞のQuiescence獲得のメカニズム
3. 学会等名 第15回成体脳神経新生懇談会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitoshi S, Kuroda A, Ema M, Fuchigami T
2. 発表標題 Klf4 and 5 regulate the long-lasting neural stem cell population.
3. 学会等名 The 6th International Conference on Biology and Pathobiology of KLF/Sp Transcription Factors (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daun K, Morimura N, Yokoi T, Nozaki K, Tanigaki K, Hitoshi S
2. 発表標題 RNF20/BRE1a regulates proliferation and differentiation of GBM cancer stem-like cells.
3. 学会等名 15th Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry (APSN) (Macau) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hitoshi S
2. 発表標題 Revealing the potential of postnatal neural stem cells.
3. 学会等名 2017 International Society for Neurochemistry (Paris) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hayashi Y, Fuke S, Fuchigami T, Morimura N, Koyama N, Hitoshi S
2. 発表標題 Functional analysis of Glial cell missing 1 in the mammalian brain.
3. 学会等名 第60回日本神経化学会 (仙台)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakaji K, Koyama N, Fuchigami T, Hitoshi S
2. 発表標題 Mood stabilizing drugs activate adult neurogenesis system.
3. 学会等名 第95回日本生理学会 (高松)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fuchigami T, Hayashi Y, Ema M, Kuroda A, Hitoshi S
2. 発表標題 Kruppel-like factor 5 maintains neural precursor cells undifferentiated in the developing brain.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 46th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ishida S, Tanaka A, Fuchigami T, Fukazawa Y, Hitoshi S
2. 発表標題 Tracer system for lifelong neural stem cell fate with lentivirus.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 46th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hitoshi S, Kuroda A, Ema M, Fuchigami T
2. 発表標題 The Role of KLF proteins in self-renewal and differentiation of neural stem cells.
3. 学会等名 Science Research Conferences-Federation of American Society for Experimental Biology (SRC-FASEB) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hitoshi S
2. 発表標題 The role of adult neural stem cell-neurogenesis in the pathogenesis of psychiatric disorders.
3. 学会等名 第57回日本神経学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hitoshi S
2. 発表標題 The role of adult neural stem cell-neurogenesis in the pathogenesis of psychiatric disorders.
3. 学会等名 第57回日本神経学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

滋賀医科大学 統合臓器生理学部門 研究内容
<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqphysi1/physiol1/research/index-re.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中林 一彦 (Nakabayashi Kazuhiko) (10415557)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・室長 (82612)	
研究 分担者	福家 聡 (Fuke Satoshi) (20422660)	滋賀医科大学・医学部・助教 (14202)	削除：平成30年2月27日
連携 研究者	依馬 正次 (Ema Masatsugu) (60359578)	滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授 (14202)	
連携 研究者	淵上 孝裕 (Fuchigami Takahiro) (50710208)	滋賀医科大学・医学部・特任助教 (14202)	