

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06067

研究課題名(和文) 神経幹細胞の分化能を規定するDNAメチル化変動の解明

研究課題名(英文) Analysis of DNA methylation changes that determine the differentiation potential of neural stem cells

研究代表者

佐野坂 司 (SANOSAKA, Tsukasa)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：40588472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経幹細胞は自己複製能を持つと同時に、脳・神経系を構成するニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの多分化能を持った細胞である。しかしながら神経幹細胞は発生初期には多分化能を持たず、発生進行に伴い順次上述細胞種への分化能を獲得する。本研究課題では、DNAメチル化というエピジェネティックな修飾に着目し、神経幹細胞の分化能の変化を解析した。その結果、3つのステップによりメチル化状態がダイナミックに変動し、各細胞種への分化能を獲得していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、発生段階に沿った神経幹細胞の性質変化における、DNAメチル化のゲノムワイドな変動が明らかとなった。また、神経幹細胞から各細胞系譜へと運命づけられる際のDNAメチル化の変動も明らかとなり、DNAのメチル化が実際に細胞の分化制御に関与している事が示された。DNAメチル化は神経系だけでなく、ほとんどすべての細胞種で普遍的にみられる現象であることから、そのメカニズム解明は他分野への波及効果も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neural stem cells are cells that have self-renewal ability and have potential to differentiate into neurons, astrocytes, and oligodendrocytes that make up the brain and nervous system. However, neural stem cells do not have pluripotency in the early stage of development, and gradually acquire the ability to differentiate into the above-mentioned cell types as development progresses. In this research project, we focused on the epigenetic modification of DNA methylation and analyzed changes in the differentiation potential of neural stem cells. As a result, it was clarified that the methylation state dynamically fluctuates by three steps and the ability to differentiate into each cell type is acquired.

研究分野：神経科学

キーワード：エピジェネティクス DNAメチル化 神経幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞は自己複製能を持つと同時に、脳・神経系を構成するニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの多分化能を持った細胞である。しかしながら神経幹細胞は発生初期には多分化能を持たず、発生進行に伴い順次上述細胞種への分化能を獲得する (図 1)。このような神経幹細胞の性質変化や分化メカニズムの解明という基礎的研究成果は、臨床応用への飛躍的貢献のためにも不可欠と考えられる。近年、損傷等で不足したニューロンを補うため、ダイレクトリプログラミング技術を用いて体細胞から直接神経幹細胞が作られているが、それら神経幹細胞の多分化能は保証されておらず、実際に分化させてみないと分からないのが現状である。また、*in vitro* で培養した神経幹細胞が、培養期間によって分化能が変化してしまい、その性質を維持できないことも問題となっていた。本研究課題では、細胞の性質変化に關与するものとして、細胞内在性のプログラムである DNA メチル化に着目した。

## 2. 研究の目的

脳・神経系は発生段階依存的に性質の変化する神経幹細胞から分化した細胞で構成されるため、その成り立ちを理解するためには、どのようなメカニズムで神経幹細胞の性質変化が引き起こされるかを知ることが非常に重要である。DNA メチル化といったエピジェネティックな変動が神経幹細胞の分化を制御していることが報告されているものの、DNA メチル化変動は領域特異的であり、どのような機構で領域特異的なメチル化変動が引き起こされているのかは未解明である。そこで、本研究課題では、神経幹細胞の性質 (各細胞種への分化能) を規定しているメチル化変動領域を同定するとともに、それら領域のメチル化変動を制御するメカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

神経幹細胞特異的な発現が認められる *Sox2* 遺伝子プロモーターの下流に EGFP 遺伝子を組み込んだ (*Sox2*-EGFP) トランスジェニックマウス (D'Amour & Gage, *PNAS* 2003) の各発生段階の脳より、蛍光セルソーターを用いて神経幹細胞を直接単離し、それら神経幹細胞のゲノム全体でのメチル化変動を解析するために、網羅的メチル化解析法である BSS (Bisulfite Shotgun Sequence) 法を行った。また、分化した細胞とメチル化状態を比較するため、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトでのメチル化状態を解析し、以下解析を行なった。

### (1) メチル化と遺伝子発現相関解析

一般的に DAN がメチル化されると遺伝子発現が抑制されると言われているが、メチル化が変動しても遺伝子発現が変化しない場合もある。そのため、メチル化変動と遺伝子発現がどの程度相関するかを調べ、意味のあるメチル化変動領域を特定する。この際、メチル化変動領域として、遺伝子プロモーターだけでなく、転写開始点近傍や gene body 等も考慮しながら解析する。

### (2) メチル化変動領域での共通配列の探索

NFI の結合配列近傍でのメチル化変動が明らかとなったが、他の転写因子候補を探索する。1) よりメチル化変動領域を抽出後、その領域における共通配列の有無を探索する。メチル化変動領域は、脱メチル化領域だけでなく新たにメチル化される領域も解析する。共通の転写因子結合配列の配列予測に加え、実験的に結合が証明されている過去の ChIP-seq のデータベースを利用し、メチル化変動の見られる領域に結合している転写因子を網羅的に探索する。この際も、変動領域がプロモーター、転写開始点近傍等、カテゴリーを作成して解析する。

#### 4 . 研究成果

##### 神経幹細胞でのメチル化変動領域の特定

ニューロンへのみの分化能を持っている胎生中期の神経幹細胞と、ニューロンに加えアストロサイトやオリゴデンドロサイトへの分化能を獲得した胎生後期の神経幹細胞のメチル化状態を比較し、それぞれの細胞で発現に重要とされる低メチル化領域を同定した。その結果、胎生中期の神経幹細胞においてはニューロン特異的遺伝子群が低メチル化状態にあり、胎生後期の神経幹細胞においてはアストロサイトやオリゴデンドロサイトといったグリア細胞特異的遺伝子群が低メチル化状態にあることが明らかとなった。

##### 神経幹細胞でのメチル化変動時期の特定

上記解析で見出したニューロン特異的な低メチル化領域とグリア細胞特異的な低メチル化領域を発生段階をおって比較すると、発生初期においては高度にメチル化されていることが分かった。しかしながら、ES 細胞から神経系に入る時期にニューロン特異的遺伝子群が脱メチル化を受け、ニューロンへの分化能を獲得する事が明らかとなった。この時点では、グリア細胞特異的発現遺伝子はメチル化された状態にあるが、発生の進行に伴い、これら領域も脱メチル化を受け、グリア細胞への分化能を獲得することがあきらかとなった。

##### グリア細胞におけるニューロン特異的遺伝子のメチル化再獲得

胎生後期の神経幹細胞はニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの多分化脳をもった細胞であり、それら細胞種特異的遺伝子は脱メチル化された状態にあるが、アストロサイトやオリゴデンドロサイトへ分化後には、それら細胞内でニューロン特異的遺伝子群がメチル化修飾を受ける事を発見した。このことは、グリア細胞においてニューロン特異的遺伝子を発現しないよう、メチル化を再獲得していると考えられる。

このように、神経幹細胞は発生段階を通して DNA メチル化状態をダイナミックに変化させ、時期特異的なニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの分化を制御していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sanosaka T, Imamura T, Nakashima K.
2. 発表標題 DNA methylome identify differentiation potential of NS/PC during brain development
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------