

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15056

研究課題名(和文) ペリセントロメア特異的エピゲノム編集技術の開発と新規ヒト大脳発生モデルへの応用

研究課題名(英文) Development of pericentromere-specific epigenome editing technology and application to new human cerebral development model

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・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：40707709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ヒト大脳発生の3次元in vitroモデル「大脳オルガノイド」の作成法が報告されたが、胎児大脳と比較し、セントロメア近傍領域(ペリセントロメア)におけるゲノムDNAの異常な低メチル化が指摘されており、現状の大脳オルガノイド作成法では正常な大脳発生を再現できていない可能性がある。本研究課題では、DNAメチル化異常を解消した大脳オルガノイドの作成を目的としている。まず、ヒト胎児大脳皮質由来神経幹細胞を用いた新規な大脳オルガノイドの作成に着手し一定の成果を得た。本技術を基盤技術とし、DNAのメチル化に与える因子の探索とhmCの定量技術を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ヒト大脳発生の3次元in vitroモデル「大脳オルガノイド」の作成法が報告されたが、胎児大脳と比較し、セントロメア近傍領域(ペリセントロメア)におけるゲノムDNAの異常な低メチル化が指摘されている。この状態は精神遅滞を伴うICF症候群と共通する表現型であり、現状の大脳オルガノイド作成法では正常な大脳発生を再現できていない可能性がある。そこで、本研究課題では、DNAメチル化異常を解消した大脳オルガノイドの作成を目的としている。本課題により、正常な大脳発生モデルが確立され、エピゲノム異常による神経疾患の治療・創薬への貢献が可能となる。

研究成果の概要(英文)：In recent years, "cerebral organoid", a method for creating a three-dimensional in vitro model of human cerebral development, has been reported. However, it has been pointed out that the genomic DNA is abnormally hypomethylated in the region near the centromere (pericentromere) compared to the fetal cerebrum. Therefore, it is possible that the current cerebral organoid production method cannot mimic normal cerebral development. The purpose of this research project is to create a cerebral organoid that eliminates DNA methylation abnormalities. First, we started to create a novel cerebral organoid using neural stem cells derived from human fetal cerebral cortex, and obtained certain results. Using this technology as a basic technology, we have established a technology for searching factors that contribute to DNA methylation and evaluating hmC exact amount.

研究分野：神経科学

キーワード：神経疾患 神経発生 脳オルガノイド 神経幹細胞 エピゲノム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒト大脳発生を模倣した3次元 *in vitro* モデル「大脳オルガノイド」が報告された [1]。これはヒト大脳発生の詳細な分子機構の解明を可能とする先進的な技術であるが、現状の作成法では、脳回(脳のしわ)や大脳皮質の6層構造は完全には再現できず、また霊長類に特徴的に見られる大脳皮質構造も形成されない [2]。さらに、DNAメチル化パターンの網羅的解析が行われ、胎児脳と比較した結果、大脳オルガノイドにおいて、本来メチル化を受けているセントロメア近傍領域(ペリセントロメア)が未知の機構により脱メチル化され、低メチル化状態に誘導されていた [3] (図1)。

ペリセントロメアにおけるDNAのメチル化は、転写不活性状態であるヘテロクロマチン構造を誘導し、精神疾患や腫瘍の発症要因と考えられているレトロトランスポゾン(LINE-1など)の発現を抑制している。さらに、この領域のDNA低メチル化状態は、脳腫瘍細胞[4]や、精神遅滞・成長障害を伴う免疫不全症であるICF症候群[5]において報告されている。従って、現状の大脳オルガノイド作成法では、正常なヒト大脳発生を模倣しておらず、脳腫瘍やICF症候群の病態を再現している可能性がある。

正常なヒト大脳発生を模倣した *in vitro* モデルの確立のためには、ペリセントロメアにおけるDNAの低メチル化の要因を解明し、低メチル化状態を解消する技術が必須となる。 ICF症候群の原因遺伝子として知られるZBTB24は、ペリセントロメアに結合するジンクフィンガータンパク質であるが[5]、神経発生におけるZBTB24の役割は全く明らかにされていない。ZBTB24には、ヘテロクロマチン形成に必要な因子と結合するBTBドメインが存在し、ZBTB24の発現低下が大脳オルガノイド作成時のペリセントロメアにおけるDNAの低メチル化への関与が予想できる。一方、DNAの脱メチル化に関してアスコルビン酸(ビタミンC)の関与が報告されている[6]。ビタミンCは大脳オルガノイドだけでなく *in vitro* 神経分化誘導時に添加する試薬の一つであることから、分化時に過剰な脱メチル化を引き起こしている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では、ペリセントロメアに結合するジンクフィンガータンパク質ZBTB24の機能解析と同時に、ヒト神経幹細胞を用いた新たな大脳オルガノイドを確立し、ペリセントロメア領域のDNA低メチル化状態を解消した新たな大脳発生 *in vitro* モデルを開発することを最終的な目的とする。異常なDNA脱メチル化状態を解消する方法を探索し、エピゲノムレベルで生体脳を模倣し、より生体の大脳発生に近い *in vitro* モデルを確立することで、現状の大脳オルガノイドでは再現できていない脳構造の構築が期待できる。

3. 研究の方法

本研究課題では、まず基盤技術となるヒト神経幹細胞からの大脳オルガノイド誘導技術の確立を行い、その基盤技術を用いて種々の検討を行う。さらにDNAのメチル化状態を知るための、新たな定量法の開発も行う。

4. 研究成果

(1) ヒト胎児神経幹細胞を用いた新たな大脳オルガノイドの作成法の開発

我々は、ヒト胎児大脳皮質由来の神経幹細胞を用いて、高効率に神経分化を誘導する技術を確立しており(特許6976600号)本技術を基盤に大脳オルガノイドの作成に取り組んだ。これまでの大脳オルガノイド誘導技術は、ヒト多能性幹細胞(ES/iPS細胞)の使用を前提とした技術であった。しかし、誘導期間の長期化や誘導コストの高さが課題であった。ヒト神経幹細胞を用いることで、誘導期間の短期化とそれに伴う誘導コストの軽減を目指した。特許性のある技術であるため詳細は避けるが、種々の検討を通して、誘導前の前培養条件を設定し、適切なタイミングで液性因子や細胞外マトリクスを投入することで、30日間という期間で機能的なグルタミン酸作動性ニューロンを含む大脳オルガノイド(NSC-大脳オルガノイド)に作成に成功した。以後の検討はこの系を利用して遂行した。また、本研究課題はこの誘導技術を基盤技術として、国際共同研究強化(A)(18KK0443)へと発展している。

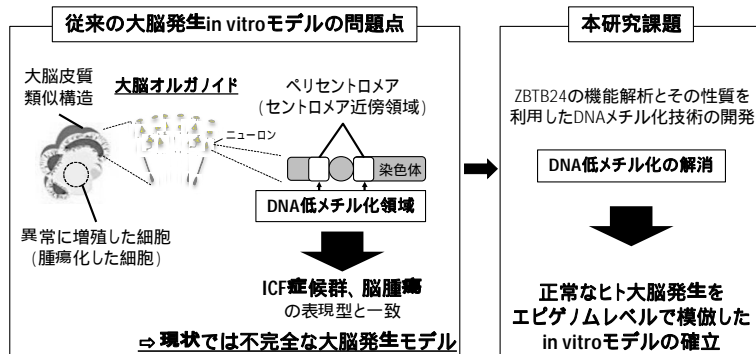


図1. ZBTB-DNMTを用いた新規ヒト大脳発生 *in vitro* モデルの開発

(2) 神経幹細胞から神経細胞への分化誘導時における ZBTB24 の発現変化の検討

(1) で誘導した NSC-大脳オルガノイドを用いて、*in vitro* 神経分化における ZBTB24 の発現を検討した。その結果、神経分化に伴い ZBTB24 の発現が約 40%に低下していた。しかし、ZBTB24 のノックダウン実験では、DNA の低メチル化は誘導されなかった。これらの結果から、我々の実験系において、ZBTB24 は DNA の低メチル化への関与は極めて低いことが示唆された。

(3) 神経幹細胞におけるビタミン C-TET1 経路による DNA 脱メチル化の検討

ZBTB24 の発現減少とは別に、DNA の脱メチル化を誘導する機構として、我々は、ビタミン C-TET1 経路による DNA 脱メチル化機構に着目した。2013 年に Blaschke らが、マウス ES 細胞を用いた培養系でビタミン C による TET1 の活性化が、メチル化シトシンのヒドロキシメチル化を促進させ DNA の脱メチル化を誘導していることを報告している[6]。そこで、ヒト神経幹細胞におけるグローバルな DNA のメチル化レベルを検討するため、メチル化に切断活性を阻害される HpaII (C^ACGG) を用いた。その結果、50mM ビタミン C により、ヒト神経幹細胞における DNA の低メチル化が誘導された。過剰なビタミン C の処理は、意図しない DNA 脱メチル化が誘導される可能性を考慮して、NSC-大脳オルガノイドにはビタミン C は処理せず誘導した。誘導 30 日目の NSC-大脳オルガノイドのゲノム DNA を用いた HpaII による DNA メチル化レベルの検討を行った。その結果、ビタミン C に依存しない DNA の低メチル化が確認された。今後、ビタミン C の有無による DNA メチル化のプロファイルを検討する必要があるだろう。

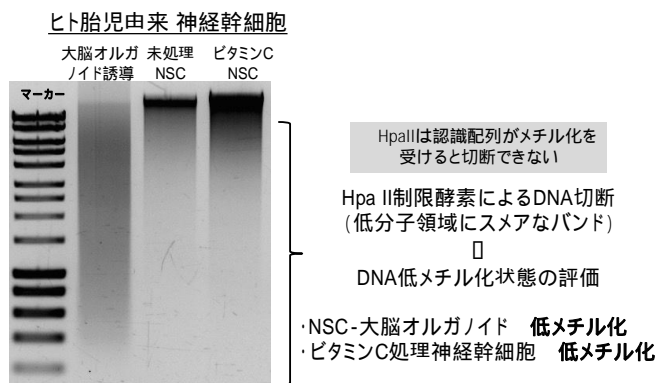


図2. NSC-大脳オルガノイドにおけるDNAメチル化の定性的検討

(4) ヒドロキシメチルシトシン (hmC) の新規定量法の開発

より簡便かつ再現性のある DNA メチル化の定量法が求められている。そこで、共同研究者がこれまでに報告しているリンカー技術[7]を使用した ELISA を用いた 5hmC の免疫化学的評価法を開発に着手した。このアッセイは、1) 二機能性リンカー分子によるゲノム DNA の固定化、および 2) 定義された量の 5hmC の保証された標準サンプルを使用した定量分析技術が鍵となる。本方法では、TET1 をトランスフェクトした HEK293T 細胞で 5hmC と 5mC を高感度かつ定量的に検出することに成功し、TET1 が触媒する 5mC から 5hmC への変換に対するビタミン C の影響のモニターにも成功した。このリンカー技術は、ゲノムサンプルの迅速かつ安定した固定化を可能にし、再現性のある 5hmC 評価法の実現に貢献する。この新規定量法は、Biosens Bioelectron. 2020 に投稿し、掲載に至っている[8]。

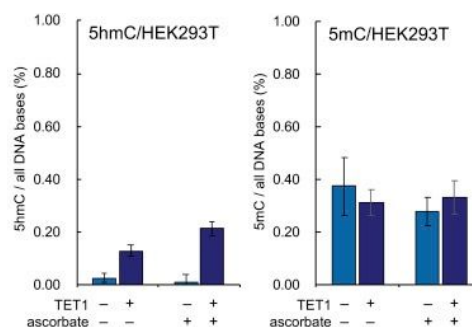


図3. 新規hmC検出法によるTET1-アスコルビン酸(ビタミンC)のhmC量の変化の検討 (引用: Kojima N, et al., Biosens Bioelectron. 167, 112472, 2020)

<引用文献>

- [1] Lancaster MA, et al., *Nature*, 501, 373-379 (2013)
- [2] Di Lullo E, et al., *Nat Rev Neurosci.*, 18, 573-584 (2017)
- [3] Luo C, et al., *Cell Reports*, 17, 3369-3384 (2016)
- [4] Fanelli M, et al., *Oncogene*, 27, 358-365 (2008)
- [5] Nitta H, et al., *J Hum Genet.*, 58, 455-460 (2013)
- [6] Blaschke K, et al., *Nature.*, 500, 222-226 (2013)
- [7] Kojima N, et al., *Anal. Chim. Acta*, 1043, 107-114 (2018)
- [8] Kojima N, et al., *Biosens Bioelectron.*, 167, 112472 (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Norihiko Sasaki, Yoko Itakura, Fujiya Gomi, Kazumi Hirano, Masashi Toyoda, and Toshiyuki Ishiwata	4. 巻 34
2. 論文標題 Comparison of functional glycans between cancer stem cells and normal stem cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histol Histopathol	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14670/HH-18-119.	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 Kojima Naoshi, Suda Tomomi, Fujii Shinichiro, Hirano Kazumi, Namihira Masakazu, Kurita Ryoji	4. 巻 167
2. 論文標題 Quantitative analysis of global 5-methyl- and 5-hydroxymethylcytosine in TET1 expressed HEK293T cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 112472 ~ 112472
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bios.2020.112472	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------