

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17027

研究課題名（和文）神経細胞におけるゲノムDNA恒常性維持機構の解明

研究課題名（英文）Maintenance of genomic integrity in neuronal cells

研究代表者

間野 達雄（Mano, Tatsuo）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20704331

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）：神経細胞は一生にわたって同一のゲノムDNA分子を利用しており、ゲノムDNAの恒常性は神経細胞の機能維持に重要である。本研究では、神経細胞の活動依存的なゲノムDNA構造の変化、ゲノムDNA修飾の変化を解析した。これにより、ゲノムDNAの構造維持にとって重要な分子群の探索を行った。本研究で得られた分子機構は、神経細胞の生理的な機能維持に重要で、加齢および神経変性疾患における神経細胞の機能低下に関係していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、神経細胞が成熟して以降、どのように機能を維持しているのかを理解するうえで重要である。一般的な加齢における神経細胞の機能維持において、どのような分子が関与しているかが明らかになるだけでなく、アルツハイマー病をはじめとしたDNA傷害の蓄積が重要であると考えられる神経変性疾患の病態解明にも関係するものである。神経細胞におけるDNA構造の維持機構という学術的意義とともに、加齢や神経変性疾患という高齢化社会における大きな社会的課題に対しても貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Neurons utilize the same genomic DNA molecules throughout their lifetime, and genomic DNA homeostasis is important for maintaining neuronal function. In this study, we analyzed activity-dependent changes in genomic DNA structure and genomic DNA modifications in neurons. We searched for molecules important for the maintenance of genomic DNA structure. The molecular mechanisms obtained in this study are important for the physiological maintenance of neuronal function and may be relevant to neuronal dysfunction in aging and neurodegenerative diseases.

研究分野：神経科学

キーワード：アルツハイマー病 DNA傷害 神経細胞

1. 研究開始当初の背景

分化した神経細胞は非分裂細胞であり、ゲノム DNA は分化時から一生涯にわたり使い続けられるため、ゲノム DNA の恒常性を保つことは細胞機能維持における最も重要な課題の1つである。一方で、神経細胞は活動依存性に、初期応答遺伝子の誘導を行う際に、DNA2 重鎖切断を利用したゲノム DNA 構造の大きな変化を利用する性質がある。この性質は、初期応答遺伝子を迅速かつ強力に誘導できる反面、ゲノム DNA の恒常性維持という観点からはリスクとなり、脳内の神経細胞において加齢とともに体細胞変異が蓄積することもあきらかとなった。

一方で、本研究費の申請者である間野はアルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD)の神経細胞特異的メチル化解析を行い、AD 神経細胞においては DNA 修復遺伝子である BRCA1 に機能異常が生じていることを報告した(Mano T, PNAS, 2017)。この研究において、AD で重要と考えられてきたアミロイド (A β) は神経細胞に DNA 傷害を誘導し、BRCA1 はその修復を担っているが、リン酸化タウにより BRCA1 の機能が障害され、DNA 修復機構が破綻、神経細胞の機能障害に至ることを示した。実際、AD 脳では正常脳と比較して有意な DNA 断片化が蓄積しており、A β 存在下において BRCA1 の機能を低下させると DNA 傷害の顕在化とともに神経細胞の可塑性が傷害された。

これらの研究から、分化後に分裂せず、一生涯にわたって同一のゲノム DNA 分子を利用し続ける神経細胞が、ゲノム DNA の恒常性をいかに担保しているのか明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、DNA 傷害に対応して神経細胞に最適化された DNA 修復機構基盤が生理的に備わっているはずで、その分子メカニズムを明らかにすることを目的としている。また、申請者は AD における DNA 傷害の蓄積を明らかにしており、得られた DNA 修復機構をもとに、AD 発症に関与する分子基盤を明らかにすることを第二の目的としている。

DNA 傷害およびその修復機構はがん領域を中心にこれまで研究をされてきたが、がん細胞と神経細胞では、相同組換えによる修復で利用する細胞分裂という点で大きな相違があり、神経細胞がいかにゲノム恒常性を維持しているかという知見はまだない。また、AD における知見から DNA 傷害の蓄積、その過程において BRCA1 の機能不全が存在することが明らかとなり、DNA 傷害の神経変性における意義と、神経細胞における生理的な DNA 修復機構が重要であることを裏付けるデータを得ている。

従って、本研究では、神経細胞におけるゲノム DNA の維持機構を明らかにするとともに、それをもとに、神経変性における DNA 傷害の意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト神経前駆細胞を成熟神経細胞に分化させ、神経細胞のマーカーを発現していることを確認し、また NMDA 刺激による応答を確認した。DNA 傷害の解析やクロマチン構造の解析には、核のみを得ることがその後の解析において必須であった。一方で、分化した神経細胞から細胞は豊富な突起を有し、一般的な培養細胞と異なり細胞を均一に分散した核を得るためのバッファーを検討した。

DNA 傷害の定量については、上記で得られた神経細胞核を用いて、セルソーターを利用した DNA 傷害レベルの定量を行った。このような神経細胞における DNA 傷害・修復系の遺伝学的なスクリーニングを行うため、CRISPR Library によるスクリーニングを行った。具体的には、CRISPR Library を導入した成熟神経細胞を NMDA で刺激を行い、上記の DNA 傷害マーカーを利用した FACS で定量し、スクリーニングを行った。これにより、DNA 傷害・修復に関与する遺伝子のスクリーニングを行った。

アルツハイマー病におけるゲノム DNA 構造を解析するため、ATAC-seq および Hi-C による解析を行なった。

4. 研究成果

ヒト神経前駆細胞を成熟神経細胞に分化させ、各種マーカーの発現を評価した。十分な分化マーカーの発現が確認でき、生存率も安定していた期間として、14 日間が適切な期間であった。細胞核の分散にあたっては、適切な界面活性剤の選択と、十分な homogenization が必要であり、条件の最適化を行なった。結果として、細胞核を適切なマーカーで染色し、それに従った FACS を行うことが可能となり、DNA 傷害マーカーによって DNA 傷害の半定量を行うことができた。この細胞系を用いて、NMDA 刺激による DNA 傷害について定量を行い、CRISPR Library を用いて関与する遺伝子グループのスクリーニングを行なった。

神経前駆細胞から分化させて作成した成熟神経細胞を NMDA で刺激処理し、その後の反応について、ゲノム構造およびゲノム修飾の観点から解析を行った。NMDA の刺激を行うと、ゲノム DNA の chromatin accessibility は数十分単位で大きく変化をするが、約 24 時間をかけてほぼもとの構造に戻ることがわかった。また、ゲノム修飾を観察すると、ゲノム構造に同期して修飾の変化

が起きることが確認された。さらに高次元な構造を明らかにするため、これらの細胞を用いて Hi-C 解析を行なった。Hi-C 解析については、シーケンスデータを解析している。

アルツハイマー病における DNA 傷害の影響を解析するため、アルツハイマー病においても ATAC-seq および Hi-C の解析を行なった。ATAC-seq では正常コントロールと比較して、神経細胞の機能調整に関する領域に構造変化を認め、同領域においてヒストン修飾の変化を見出すことができた。このような領域には、すでにアルツハイマー病との関連が全く異なったコンテキストから報告されている遺伝子群も含まれているものの、新たな病態関連遺伝子群も含まれていた。現在、これらの遺伝子についても病態における機能的意義を解析している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawai Mizuho, Mano Tatsuo, Naito Tatsuhiko, Honda Akira, Nakai Yudai, Toyama Kazuhiro, Fujioka Yosei, Makise Norihiro, Hasegawa Hirotaka, Sakuishi Kaori, Kurokawa Mineo, Toda Tatsushi	4. 巻 9
2. 論文標題 Disseminated necrotizing leukoencephalopathy after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation and methotrexate administration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurology and Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 155 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ncn3.12466	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 Kikuchi Junko Kanda, Nagashima Yu, Mano Tatsuo, Ishiura Hiroyuki, Hayashi Toshihiro, Shimizu Jun, Matsukawa Takashi, Ichikawa Yaeko, Takahashi Yuji, Karino Shotaro, Kanbayashi Takashi, Kira Junichi, Goto Jun, Tsuji Shoji	4. 巻 1
2. 論文標題 Cerebellar Ataxia as a Common Clinical Presentation Associated with DNMT1 p.Y511H and a Review of the Literature	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12031-020-01784-5	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 Sato Kenichiro, Mano Tatsuo, Iwata Atsushi, Toda Tatsushi	4. 巻 15
2. 論文標題 Autocorrelation-based method to identify disordered rhythm in Parkinson's disease tasks: A novel approach applicable to multimodal devices	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0238486 ~ 0238486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0238486	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 Nakamura Natsuko, Tsunoda Kazushige, Mitsutake Akihiko, Shibata Shota, Mano Tatsuo, Nagashima Yu, Ishiura Hiroyuki, Iwata Atsushi, Toda Tatsushi, Tsuji Shoji, Sawamura Hiromasa	4. 巻 61
2. 論文標題 Clinical Characteristics of Neuronal Intranuclear Inclusion Disease-Related Retinopathy With CGG Repeat Expansions in the NOTCH2NLC Gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 27 ~ 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.61.11.27	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 Ueda Kunihiro, Seto Akiko, Mano Tatsuo, Toda Tatsushi	4. 巻 59
2. 論文標題 Isolated Body Lateropulsion in Supplementary Motor Area Infarction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 3113 ~ 3114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.5320-20	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 Sato Kenichiro, Mano Tatsuo, Suzuki Kazushi, Toda Tatsushi, Iwatsubo Takeshi, Iwata Atsushi, for Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative	4. 巻 4
2. 論文標題 Attempt to Predict A/T/N-Based Alzheimer's Disease Cerebrospinal Fluid Biomarkers Using a Peripheral Blood DNA Methylation Clock	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease Reports	6. 最初と最後の頁 287 ~ 296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/ADR-200205	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 Sato Kenichiro, Mano Tatsuo, Iwata Atsushi, Toda Tatsushi	4. 巻 14
2. 論文標題 Neuropsychiatric adverse events of chloroquine: a real-world pharmacovigilance study using the FDA Adverse Event Reporting System (FAERS) database	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioScience Trends	6. 最初と最後の頁 139 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/bst.2020.03082	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 Sato Kenichiro, Iwata Atsushi, Kurihara Masanori, Nagashima Yu, Mano Tatsuo, Toda Tatsushi	4. 巻 403
2. 論文標題 Estimating acceleration time point of respiratory decline in ALS patients: A novel metric	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 7 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2019.05.031	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 Ishiura Hiroyuki, Shibata Shota, Yoshimura Jun, Suzuki YutaMano Tatsuo, Iwata Atsushi, Toda Tatsushi, Morishita Shinichi, Tsuji Shoji, et al	4. 巻 51
2. 論文標題 Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 1222 ~ 1232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41588-019-0458-z	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 該当する

1. 著者名 Sato Kenichiro, Mano Tatsuo, Matsuda Hiroshi, Senda Michio, Ihara Ryoko, Suzuki Kazushi, Arai Hiroyuki, Ishii Kenji, Ito Kengo, Ikeuchi Takeshi, Kuwano Ryoza, Toda Tatsushi, Iwatsubo Takeshi, Iwata Atsushi	4. 巻 24
2. 論文標題 Visualizing modules of coordinated structural brain atrophy during the course of conversion to Alzheimer's disease by applying methodology from gene co-expression analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 NeuroImage: Clinical	6. 最初と最後の頁 101957 ~ 101957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nicl.2019.101957	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 Sato Kenichiro, Mano Tatsuo, Iwata Atsushi, Toda Tatsushi	4. 巻 1
2. 論文標題 Neurological and related adverse events in immune checkpoint inhibitors: a pharmacovigilance study from the Japanese Adverse Drug Event Report database	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurooncology	6. 最初と最後の頁 1-9
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 Sato Kenichiro, Nagashima Yu, Mano Tatsuo, Iwata Atsushi, Toda Tatsushi	4. 巻 14
2. 論文標題 Quantifying normal and parkinsonian gait features from home movies: Practical application of a deep learning?based 2D pose estimator	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0223549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0223549	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 Sato Kenichiro, Mano Tatsuo, Iwata Atsushi, Toda Tatsushi	4. 巻 60
2. 論文標題 Subtype Dependent Reporting of Stroke With SGLT2 Inhibitors: Implications From a Japanese Pharmacovigilance Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 629-635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcph.1561	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 Kurihara Masanori, Mano Tatsuo, Saito Yuko, Murayama Shigeo, Toda Tatsushi, Iwata Atsushi	4. 巻 10
2. 論文標題 Colocalization of BRCA1 with Tau Aggregates in Human Tauopathies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 7~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/brainsci10010007	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 Koshi-Mano Kagari, Mano Tatsuo, Morishima Maho, Murayama Shigeo, Tamaoka Akira, Tsuji Shoji, Toda Tatsushi, Iwata Atsushi	4. 巻 10
2. 論文標題 Neuron-specific analysis of histone modifications with post-mortem brains	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-60775-z	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2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 間野 達雄、岩田淳
2. 発表標題 Epigenetic approach to Alzheimer's disease
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 間野 達雄
2. 発表標題 アルツハイマー病に対する神経細胞特異的なエピゲノムアプローチ
3. 学会等名 日本人類遺伝学会（招待講演）
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