

研究種目：若手研究(B)
研究期間：平成 20 年度 ～平成 21 年度
課題番号：20790230
研究課題名（和文）
神経系細胞系譜決定過程における領域特異的クロマチン制御メカニズムの解析
研究課題名（英文）
Site-specific epigenetic regulation in cell fate decision of neural progenitor cells
研究代表者
神山 淳 (KOHYAMA JUN)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教
研究者番号：30347511

研究成果の概要（和文）：

マウス中枢神経系発生においてはニューロンがまず産生されたのちにグリア細胞が産生され、この過程において DNA 脱メチル化を伴うエピジェネティックな遺伝子発現修飾機構が重要であると考えられている。本研究ではこの過程を制御する中心的な役割を維持型メチル化酵素である Dnmt1 が担っていることが明らかとなった。発生過程においては特にレチノイン酸を介したシグナル伝達機構が Dnmt1 の局在を変容させ、アストロサイト特異的遺伝子群のプロモーターの脱メチル化を制御することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

During mammalian neural development, neural stem/progenitor cells sequentially change their differentiation potency; they produce neurons during early neural development, and acquire potency to generate glial cells in later developmental stage. Although epigenetic regulation including DNA methylation is considered to be involved in this step, detailed mechanism to regulate site specific epigenetic regulation of neural stem cell differentiation is still elusive. Here I demonstrated that Dnmt1 is deeply involved in this mechanism and Dnmt1 is further regulated by retinoic acid signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
21 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：胚性幹細胞、エピジェネティクス、DNA メチル化

1. 研究開始当初の背景

発生過程において神経幹細胞の動態は精妙にコントロールされており、胎生中期にはニューロンのみを産生し、発生後期においてはアストロサイトなどのグリア細胞を産生するようになる(Qian et al., 2000)。この現象は解剖学的には詳細な記述がなされているものの、メカニズムは明らかでない点が多い。現在までに胎生中期ではニューロン分化誘導に関わる転写因子Neurogenin1, 2の発現量が高く、この転写因子が胎生中期で直接的にニューロン特異的遺伝子の発現を促しつつ、また間接的にはアストロサイト分化に重要な役割を果たす転写共役因子群と結合し、アストロサイトへの分化能を抑制すると報告されている(Sun et al., 1999 Cell)。また、細胞内在性のプログラムの一つであるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構と神経幹細胞の分化能との関係に関する報告されている。胎生中期神経幹細胞においてはアストロサイト細胞特異的遺伝子のプロモーター中に含まれるCpG配列がメチル化されているためにアストロサイト特異的遺伝子の発現が起こらないとの報告がある(Takizawa et al., 2001)。結果として胎生中期神経幹細胞は主にニューロンへと分化する。この領域のDNAメチル化の頻度は発生段階に応じて異なり、胎生後期以降の神経幹細胞では脱メチル化状態にあり、アストロサイト誘導性サイトカインの刺激に応じてアストロサイトへと分化可能となる。しかしながら、グリア細胞特異的遺伝子のプロモーターの脱メチル化がどのようなメカニズムでおこるのかということとはわかっていない。エピジェネティックな遺伝子発現の重要性は多くの組織や細胞で明らかとなっており、その多くが領域特異的に生じる。神経幹細胞の分化能とアストロサイト特異的遺伝子のDNAメチル化制御機構は領域特異的なエピジェネティック制御機構を解明する上で有用なモデルである。

2. 研究の目的

神経幹細胞の発生過程においてニューロン分化能獲得からグリア分化能獲得

という分化能のスイッチングや時間空間的に、異なるサブタイプのニューロンを生み出す、という性質を持つ。このような性質の変化は「細胞外シグナル」のみでは説明できず、DNAメチル化やクロマチン構造変化といったエピジェネティクスの重要性が近年明らかにされつつある。本研究では胚性幹細胞(ES細胞)から神経系細胞への分化系を用い、特に発生過程において領域特異的にDNA脱メチル化が生じる、アストロサイト特異的遺伝子GFAP遺伝子プロモーターに着目し、ES細胞をモデル系として領域特異的なDNAのメチル化、脱メチル化の機構および、それに付随しておこる細胞系譜決定機構という観点から時間空間的な神経幹細胞分化の分子基盤を明らかにしようとしている。

3. 研究の方法

神経幹細胞においてGFAP遺伝子座に生じるDNA脱メチル化機構が能動的DNA脱メチル化か受動的DNA脱メチル化かを解析する。ニューロンのみが主に出現し、グリアが産生しないため各種細胞外因子を添加することで早期にグリア細胞が出現する因子を同定、メカニズムの解析を行なった。

(1) マウス胚性幹細胞の培養

マウス胚性幹細胞(ES細胞)はGMEM+10%FBS/白血病阻止因子(LIF)存在下でゼラチンコートした培養皿で培養した。神経系への分化誘導はES細胞を血清非存在下で4日間浮遊培養を行なった後、オルニチン/ファイブロンコートした培養皿で接着培養を行ない、LIF存在下で培養した。各種サイトカイン刺激は浮遊培養中に行なった。

(2) Dnmts遺伝子欠損胚性幹細胞の解析

DNAメチルトランスフェラーゼ遺伝子欠損ES細胞を用いた神経誘導を行い、細胞系譜に与える影響を解析した。

(3) クロマチン免疫沈降法による、エピジ

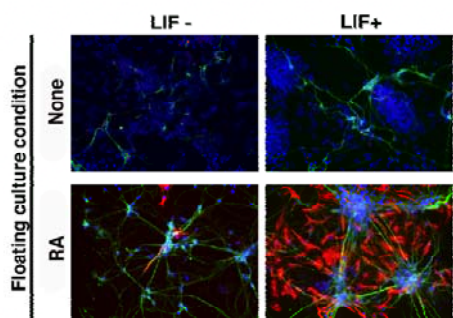
エネティック関連因子群のGFAP遺伝子座局在制御解析

(4) DNA脱メチル化機構の解析

DNAメチル化状態の解析はgenomic DNAを調整し、バイサルファイトシーケンス法を用いてGFAPプロモーター上のメチル化解析を行った。

4. 研究成果

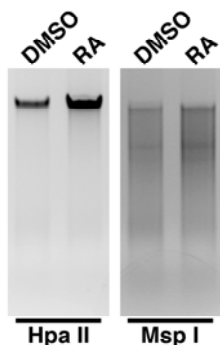
各種候補因子のスクリーニングの結果、レチノイン酸(RA)添加により ES 細胞からの分化系において早期にグリア分化が生じることが明らかとなった(下図)。



RAはES細胞からの分化系において早期アストロサイト出現を促す。

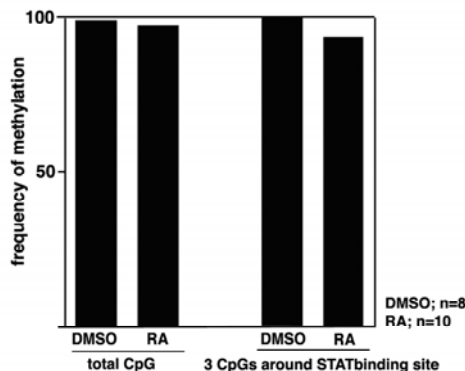
そこで、レチノイン酸添加群においてGFAPプロモーターのDNAメチル化の頻度を解析したところ40%程度の低下が認められた。次に、制限酵素HpaII, MspIを使用し、ゲノム全体のメチル化の程度を解析したところRA添加による差異は観察されなかった(左下図)ためRAによるGFAPプロモーターの脱メチル化は領域特異的なものであることがわかった。

また、GFAPプロモーターを含むプラスミドに含まれるCpG配列を試験管内でメチル化し、ES細胞に導入後、RA処理を



しプラスミド中のGFAPプロモーターのDNAメチル化に与える影響を解析した。細胞内でこのプラスミドは複製されないため、DNA脱メチル化が生じれば能動的DNA脱メチル化がRAにより惹起されていることが推察される

からである。しかしながら下図のようにプラスミド中のDNAメチル化状態はRA処理の有無にかかわらず高頻度に保たれており、このことからGFAPプロモーターのDNA脱メチル化は受動的に生じていることが推察された。



哺乳類においてDNAメチル化に関与する酵素群としてDNAのメチル化を維持するDnmt1、CpG配列に新規にメチル基を付加するDnmt3a, Dnmt3bが知られる。申請者が使用している実験系においてDnmt群の発現を解析したところ、Dnmt1とDnmt3aは発現に変化が生じなかったがDnmt3bはRA処理により有意に発現低下が生じた。しかしながらDnmt3b欠損ES細胞で早期にグリア細胞の出現が見られるわけではないためこれは二次的な結果であると推察される。一方発現自体は変化しないもののDnmt1はRA処理によりGFAPプロモーター上での存在量が低下した。実際、Dnmt1欠損ES細胞では早期にグリア細胞が出現し、さらにDnmt1欠損ES細胞にRA処理を施しても出現するグリア細胞の割合が変化しないことからRAによるDNA脱メチル化のメカニズムにDnmt1が重要な役割をしていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Kohyama J¹, Sanosaka T¹, Tokunaga A², Takatsuka E¹, Tsujimura K¹, Okano H², Nakashima K., “BMP-induced REST regulates the establishment and maintenance of astrocytic identity.” J

Cell Biol. 189(1):159-70 2010. (1. 奈良先端大・バイオ 2. 慶應大・生理学)

3. 慶應大学・生理学(査読あり)

2. Nakashima K¹, Kohyama J¹, Namihira M¹, Gage FH², Okano H³, Sawamoto K⁴, “Epigenetic mechanisms regulating neural cell fate determination.” No To Hattatsu. 41(6):411-4 2009 (1. 奈良先端大・バイオ 2. ソーク研究所 3. 慶應大・生理学 4. 名古屋市立大学・再生医学) (査読なし)

3. Asano H¹, Aonuma M¹, Sanosaka T¹, Kohyama J¹, Namihira M¹, Nakashima K¹, “Astrocyte differentiation of neural precursor cells is enhanced by retinoic acid through a change in epigenetic modification.” Stem Cells. 27(11):2744-52 2009 (1. 奈良先端大・バイオ) (査読あり)

4. Tsujimura K, Abematsu M, Kohyama J, Namihira M, Nakashima K., “Neuronal differentiation of neural precursor cells is promoted by the methyl-CpG-binding protein MeCP2.” Exp Neurol. 219(1):104-11 2009 (1. 奈良先端大・バイオ) (査読あり)

5. 神山淳¹, 中島欽一¹: MeCP2 は成体脳における分化可塑性を制御する 実験医学 27(6) 2009 (1. 奈良先端大・バイオ) (査読なし)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神山 淳 (KOHYAMA JUN)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：30437511