

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06875

研究課題名（和文）神経幹細胞のニューロン産生能低下に呼応したDNAメチル化獲得領域の意義

研究課題名（英文）Epigenetic mechanisms regulating developmental stage-dependent change in cortical neural stem cell property

研究代表者

堅田 明子（Katada, Sayako）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：00615685

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）：神経幹細胞は発生の進行に伴い、ニューロンからグリアへと分化する細胞を変換させていく。研究代表者はNeurog1など、ニューロン分化に重要な複数の転写因子の近傍に、発生進行に伴い、遺伝子発現抑制の指標となるDNAメチル化修飾を高密度に獲得する領域があること、in silico ChIP解析により、これら領域に結合する候補因子としてTrim28を見出した。実際に神経幹細胞においてTrim28をノックダウンした結果、アストロサイト分化が抑制、ニューロン分化能が有意に上昇、転写抑制に機能するNuRD複合体と相互作用することで、ニューロン産生能の低下に係るエピジェネティクス制御に係ることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、神経幹細胞のエピジェネティクス制御に関して、ニューロン分化を制御するDNAメチル化修飾は報告がない。着目する発生進行依存的なDNAメチル化領域は、遺伝子発現を制御する重要なエンハンサー領域である可能性が高く、これら領域のエピゲノム制御を担う分子を解明することが出来れば、神経幹細胞分化における新規のエピジェネティクス制御機構の提示のみならず、これを操作することでin vitro培養系においても、長期に高いニューロン分化能力を備えた神経幹細胞の維持など、応用面における貢献も期待が高い。

研究成果の概要（英文）：During the development of the mammalian cerebral cortex, first emerged neural stem cells have high potency of self-renew, then differentiated into neurons in mid gestation, and then astrocytes in late gestational stage. We have previously reported that DNA demethylation near astrocytic genes is important for acquisition of astrocyte differentiation. Not only that we found several of important transcription factors for neurogenesis acquire DNA methylation at their proximal regions in late gestation. To investigate molecular mechanism of this developmental progression-dependent gain of DNA methylation, we search factors that could bind to these regions and found transcriptional repressor Trim28 as a candidate by ChIP-Atlas. We confirmed that knock down of Trim 28 increased pro-neuronal gene Neurog1 expression and neuronal differentiation. Therefore, we note Trim28 as important epigenetic factor for neural stem cell fate regulation.

研究分野：神経科学

キーワード：神経発生 幹細胞分化 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞は発生の進行に伴い、ニューロンからアストロサイト、オリゴデンドロサイトといったグリアへと産生する細胞種を変化させるが、これを制御する分子機構には未だ不明な点が多い。古くから、Sally Temple らによって、この発生過程で認められる神経幹細胞の性質変化が *in vitro* 培養系においても再現することが報告されており (Qian et.al., *Neuron*, 2000)、神経幹細胞が有する細胞自律的な分化制御の分子機構解明が試みられている。現在、アストロサイトへの分化能獲得には、アストロサイト関連遺伝子群近傍の DNA 脱メチル化やニューロン関連遺伝子近傍でのヒストン H3K27 トリメチル化修飾が重要であることが報告されている。研究室では近年、胎生後期神経幹細胞や *in vitro* 培養神経幹細胞において、ニューロン分化に係わる多くの転写因子近傍で DNA のメチル化が導入されることを確認したが、これが神経幹細胞の分化能に及ぼす影響や関連する分子群は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、発生進行に伴い DNA メチル化修飾を獲得するゲノム領域に注目し、ここに結合しうる因子の同定と機能解析を行うことで、神経幹細胞の自律的な細胞運命決定機構を解明する。発生過程の神経幹細胞は多彩なニューロンサブタイプを産生する。しかしながら現在、*in vitro* でこのような多分化能を維持しつつ培養することは非常に難しく、その多くがアストロサイト分化能の高い神経幹細胞へと性質が変化してしまう。我々は、神経幹細胞の長期培養においても、発生進行と同様のメチル化獲得プロファイルを確認していることから、このエピジェネティクス制御を解明することは、神経幹細胞の発生過程における性質変化の理解のみならず、現在命題の一つとされる多分化能の高い神経幹細胞の維持培養法確立にも深く寄与出来ると考えている。ニューロン関連因子における DNA 再メチル化は、発生過程における神経幹細胞の全ゲノム DNA メチル化プロファイルを詳細に解析した、我々の研究室が独自に確認した現象であり、この分子機構を解明することで、神経幹細胞分化における DNA メチル化制御の全容解明を目指す。

3. 研究の方法

まず、ニューロン分化能が高い胎生 11 日神経幹細胞とグリア分化能が高い胎生 18 日神経幹細胞の全ゲノム DNA メチル化データから、発生進行依存的な DNA メチル化獲得領域 (GDMR: Gained-Differentially Methylated Region) を同定する。次に、公共の ChIP-seq データベースである ChIP-Atlas (<https://chip-atlas.org/>) を用いて、GDMR に結合しうる因子を探索、それらを神経幹細胞にてノックダウン、*in vitro* 培養した後に分化誘導することで、細胞運命を評価する。神経幹細胞のニューロン分化を促進した因子に関しては、その相互作用分子の特定などにより、エピジェネティクス制御機構の分子基盤を探る。

4. 研究成果

神経幹細胞マーカー遺伝子 *Sox2* のプロモーター下流で EGFP を発現するトランスジェニックマウス的大脑皮質より FACS にて単離した、EGFP 陽性神経幹細胞を用いた全ゲノムバイサルファイトシーケンスデータ (Sanosaka et al, *Cell Reports*, 2017) において、胎生 18 日におけるメチル化量が、胎生 11 日の 2 倍以上となっている CpG サイトをメチル化獲得サイトとして同定した。さらに、互いに 2.5kp 以内にあるメチル化獲得サイトを連結し、発生進行に伴う DNA メチル化獲得領域と定義づけた結果、140 か所の GDMR を見出した。

まず、公共の ChIP-seq データ (ChIP-Atlas) のうち、ヒトとマウス由来細胞で得られた全転写因子結合データを活用し、

GDMRs に結合する因子を探索した結果、

図 1a に示す 42 個の候補因子が得られた。一般に、DNA メチル化修飾は転写抑制の指標となること、また発生進行に伴いニューロン分化能が低下することから、このうち、赤字で示す 15 の抑制性因子に注目した。胎生 14 日齢神経幹細胞における、これら 15 の候補因子の発現量を解析した結果、Tripartite motif-containing protein 28

(Trim28) が最も高く (図 1b)、GDMRs に結合が著しく集積していた (図 1c)。

そこで、胎生 14 日由来神経幹細胞にて Trim28 をノックダウン、分化誘導刺激を行ったところ、ニューロン分化のマスター転写因子である *Neurog1* の発現が上昇、Tuj1 で標識されるニューロンが有意に多く産生された (図 2)。*Neurog1* 遺伝子近傍では、転写開始点上流 7kb のエンハンサー領域近傍で典型的な発生進行依存的な DNA メチル化獲得領域があり、先に同定した 140 か所の DMRs にも含まれている。そこで、Trim28 ノックダウン後のこれら領域の DNA メチル化レベルを解析したところ、減少傾向が認められたものの、期待した程の変化は観察されなかった。

次に、神経幹細胞における Trim28 の発現動態を解析した結果、ニューロン産生能が高い胎生 11 日や 14 日とグリア産生能が高い胎生 18 日では、mRNA 発現に変わりはないが、タンパク質発現を解析したところ、翻訳後修飾である Sumo 化レベルが胎生後期

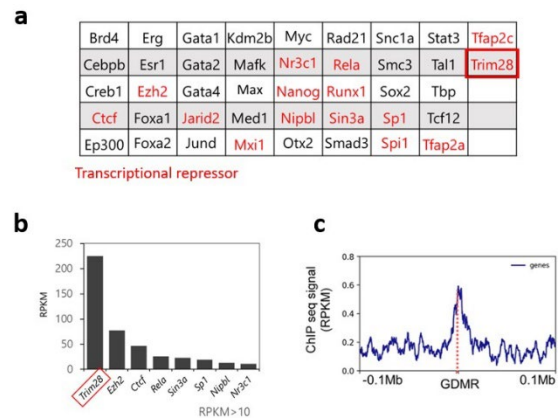


図 1. DNA メチル化獲得領域に結合しうる因子のうち、抑制性因子である Trim28 は、神経幹細胞における発現が著しく高く、メチル化獲得領域特異的に結合が集積していた。

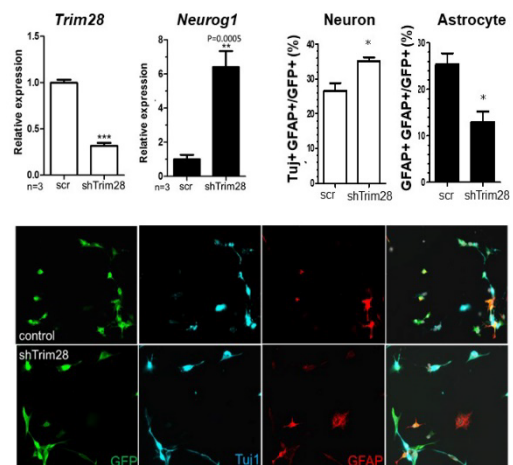


図 2. Trim28-KD により、ニューロン分化が促進

で著しく上昇していることを見出した。**Trim28** のスモ化は、転写抑制に機能する **NuRD** 複合体との相互作用に重要であることが既に報告されている。すなわち、**Trim28** の修飾レベルが神経幹細胞の分化制御に関わることが明らかとなった。**NuRD** 複合体には、ヒストン脱アセチル化酵素やヒストン **H3K27** メチル化酵素が含まれる。そこで、**Trim28** ノックダウン後の神経幹細胞において、**Neurog1** 転写開始領域、またエンハンサー領域にけるヒストン **H3K27** のアセチル化とトリメチル化レベルを解析した結果、転写活性抑制の指標であるトリメチル化量が減少し、活性化の指標であるアセチル化修飾量が上昇していた。従って、**Trim28** は **DNA** メチル化修飾の導入に先立ち、ヒストン修飾を制御することが分かった。

そこで現在、スモ化修飾サイトであるリジンをアルギニンに置換した **Trim28** 変異体を作製、これを胎生 14 日齢神経幹細胞に過剰発現させ、*in vitro* 培養した際の神経幹細胞の分化細胞種を評価している。**Trim28** の **Sumo** 化修飾と神経幹細胞の分化運命との相関が認められた暁には、**Sumo** 化修飾の阻害剤の活用により、高いニューロン分化能を保持した神経幹細胞の *in vitro* 培養が可能となる期待が高い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Wittmann Marie-Theres, Katada Sayako, Sock Elisabeth, Kirchner Philipp, Ekici Arif B., Wegner Michael, Nakashima Kinichi, Lie Dieter Chichung, Reis Andr?	4. 巻 148
2. 論文標題 scRNA sequencing uncovers a TCF4-dependent transcription factor network regulating commissure development in mouse	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.196022	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 該当する
1. 著者名 Katada Sayako, Takouda Jun, Nakagawa Takumi, Honda Mizuki, Igarashi Katsuhide, Imamura Takuya, Ohkawa Yasuyuki, Sato Shoko, Kurumizaka Hitoshi, Nakashima Kinichi	4. 巻 35
2. 論文標題 Neural stem/precursor cells dynamically change their epigenetic landscape to differentially respond to BMP signaling for fate switching during brain development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 1431 ~ 1444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.348797.121	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 Jun Takouda, Sayako Katada, Takuya Imamura, TsukasaSanosaka and Kinichi Nakashima	4. 巻 ND
2. 論文標題 SoxE group transcription factor Sox8 promotes astrocytic differentiation of neural stem/precursor cells downstream of Nfia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacology Research & Perspectives	6. 最初と最後の頁 ND
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 Uchihara Yuki, Permata Tiara Bunga Mayang, Sato Hiro, Kawabata-Iwakawa Reika, Katada Sayako, Gu Wenchao, Kakoti Sangeeta, Yamauchi Motohiro, Kato Reona, Gondhowiardjo Soehartati, Hosen Naoki, Yasuhara Takaaki, Shibata Atsushi	4. 巻 82
2. 論文標題 DNA damage promotes HLA class I presentation by stimulating a pioneer round of translation-associated antigen production	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 2557 ~ 2570.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2022.04.030	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 堅田明子
2. 発表標題 Molecular characterization of aging choroid plexus that regulates neural stem cell 's behavior and brain functions
3. 学会等名 日本分子生物学会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堅田明子
2. 発表標題 胎生期神経幹細胞はダイナミックにエピゲノム変換することで、発生時期に応じて適切な細胞へと分化する
3. 学会等名 第15回エピジェネティクス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sayako Katada, Yusuke Sakaki, and Kinichi Nakashima
2. 発表標題 miRNAs secreted from choroid plexus plays a critical role for the maintenance of neurogenesis in the aged brain
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sayako Katada, Yusuke Sakaki, and Kinichi Nakashima
2. 発表標題 miRNAs secreted from the choroid plexus modulates adult neurogenesis in the mouse hippocampus
3. 学会等名 Development and Plasticity of the Brain（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堅田明子
2. 発表標題 脈絡叢分泌性miRNAによる成体海馬ニューロン新生の調節
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2022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