

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2012～2014
 課題番号：24300119
 研究課題名(和文) 中枢神経系の発生と発達における細胞内エピゲノム要因と細胞外微小環境要因の解明

 研究課題名(英文) Elucidation of the intracellular epigenetic modification and extracellular microenvironment regulating the development of the central nervous system

 研究代表者
 田賀 哲也 (TAGA, Tetsuya)

 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

 研究者番号：40192629

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストンH3K9の脱メチル化というエピゲノム制御を担うGasc1遺伝子の変異マウスがヒト精神運動発達障害様の行動異常を呈するというこれまで見出した現象を一部説明し得る形態学的知見として同変異マウス海馬CA1錐体細胞のスパイン数の増加と、電気生理学的知見として同海馬の長期増強の上昇を見出した。また神経発生時のアストロサイトの分化時期を制御するDNA脱メチル化反応にメチルシトシン水酸化酵素であるTET3が関与することを見出した。細胞外来性因子で誘導されるサイクリンD1が神経幹細胞を増殖させる一方でアストロサイト分化シグナル経路を抑制することを発見し、神経幹細胞の自己複製の分子基盤を提示した。

研究成果の概要(英文)：Gasc1 gene encodes a histone H3 lysine 9 (H3K9) demethylating enzyme, which we previously found is expressed in post-mitotic neurons in the mouse brain. We showed that GASC1 hypomorphic mutant mice exhibit mental disorder-like abnormal behaviors. In the present study, we have newly detected increased dendritic spine densities of the mutant hippocampal neurons. Electrophysiological studies on hippocampal slices have further demonstrated increased long-term potentiation. Further studies will enable us to discuss the cause of human neurological/psychiatric symptoms and future drug discoveries. We have also found that one of the ten-eleven translocation (TET) proteins, TET3, is involved in the timing of astrocyte development most likely through oxidization of the 5-methylcytosine. We have also provided a novel molecular mechanism for NSC self-renewal in which one of the growth promoting signaling components, cyclin D1, which is induced by FGF2- and Wnts inhibits astrocyte differentiation.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：神経幹細胞 発生・分化 エピゲノム 自己複製 ニッチ 神経科学 疾患モデルマウス シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系を構成する主要な3つの細胞種であるニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化する能力を有する神経幹細胞は、興味深いことに胎生期に発生段階に応じてその分化方向に関する指向性を大きく変え、胎生の中期まではニューロン分化に偏向しているが、胎生後期にはアストロサイト分化が優位である。胎生中期までに脳内でアストロサイトの分化誘導因子群が既に存在し、それらの受容体群が神経幹細胞で発現しているにもかかわらず実際の分化は胎生後期にしか見られない理由は長い間謎であったが、研究代表者らはこれがアストロサイト特異的遺伝情報の読み出しに必須の転写因子STAT3が認識するプロモーター上のDNA配列のメチル化というエピゲノム制御に負うところが大きいことを、初めて明らかにし (Takizawa et al., Dev. Cell, 2001)、この現象にヒストン H3 のアセチル化という別のエピゲノム制御が関与することも示唆した (Namiyama et al., FEBS Letters, 2004)。

細胞分化を規定する遺伝情報の選択的読み出しにおけるエピゲノム制御機構として、上述のDNAメチル化やヒストンアセチル化に拠る事例は、これまでに数多く蓄積されてきた。それらとは別に、ヒストンのメチル化・脱メチル化に拠るものについては、近年、関与する酵素群、特にヒストン脱メチル化酵素群の同定を契機として、国内外で急速に研究が展開されていたところであるが、このヒストンのメチル化・脱メチル化制御の、遺伝子発現プロセスにおける重要性は認識されながらも、中枢神経系を含む各組織の発生・発達時の細胞分化過程や機能構築に果たす意義については、未知の点が多い状況であった。

本研究を開始するにあたって研究代表者が行った準備研究で、ヒストン H3 の9番目のリジン (H3K9) のトリメチル化体を基質としてジメチル化体やモノメチル化体に脱メチル化する酵素 GASC1 (下図に機能を模式的に示した) をコードする *Gasc1* 遺伝子座に、ジーントラップ法で変異を来したマウス (Inazawa et al., unpublished) を東京医科歯科大学稲澤教授より供与を受けて、中枢神経系に関する解析を行った。まず変異ヘテロ接合体マウスの解析で *Gasc1* 遺伝子が胎仔期に視床、線条体、延髄等の新生ニューロン

に発現していることや、出生後の大脳皮質、海馬、小脳のニューロンに発現していることを見いだした。次に *Gasc1* 遺伝子変異をホモ接合で有し GASC1 の発現が低下するマウスは、その後の行動解析研究で、行動異常 (多動性、学習障害、固執傾向など) を呈することがわかった。これらの知見は、同定されただけで十数種類に及ぶヒストン脱メチル化酵素のうち H3K9 の脱メチル化を担当する GASC1 の発現低下というエピゲノム制御機構の異常が、中枢神経系の細胞群の機能的分化や恒常性に影響を与えることを示唆する点で興味深く、且つ、ヒト精神運動発達障害 (特にヒト自閉スペクトラム症) に類する行動異常に至るといふ点で社会的にも意義深い。ヒストンのメチル化・脱メチル化修飾の、脳の発生過程での、細胞分化の制御や機能構築の制御における役割を説明し得る分子基盤を手に入れている。

本研究課題はこのような状況を背景として、上述のヒストンメチル化制御などの細胞内エピゲノム要因にさらに細胞外微小環境要因の観点を加えて中枢神経系の機能構築に取り組むものとして立案された。

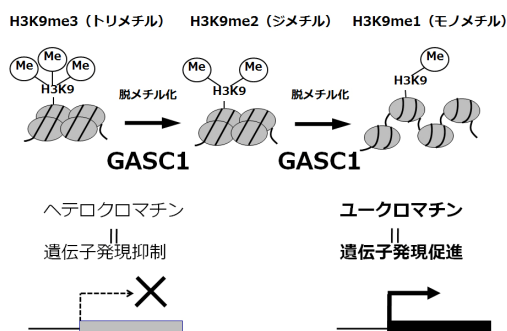
2. 研究の目的

精神運動発達障害が単一遺伝子異常だけでなく複合的な遺伝子異常に因るものがあるという示唆は、自閉スペクトラム症関連遺伝子探索等の報告に見られるが (Toro et al., Trends Genet., 2010) 分子基盤は未だ不明という現状を考えれば、研究代表者らが観察したヒストン H3K9 の脱メチル化酵素 GASC1 の発現低下マウスの行動異常は、dosage effect も含むエピゲノム制御の不均衡に因る下流の複合変化の反映と推察される点で、問題解決に近づくことを期待させる知見であった。そこで、このマウスの形態的・機能的解析というプロセスを通じて、ヒストン H3K9 のメチル化制御という細胞内エピゲノム要因の中枢神経系の発生と発達における意義の分子基盤解明を目的とした。

また、研究代表者は以前、アストロサイト分化のタイミングがDNA脱メチル化に依存することを示した。不明であったその脱メチル化経路について、メチルシトシン水酸化酵素 TET3 という細胞内エピゲノム要因の観点からの中枢神経系の発生機構解明も研究目的とした。

さらに、細胞内在性要因とは別に、神経幹細胞の制御に関して細胞外微小環境 (ニッチ) 側の要因も近年重要性が認識され国内外で勢力的に研究されているが、その実体の全容が解明されたとは言い難い状況にあり、従来の遺伝子発現プロファイリング等がカバーできない新たなアプローチが必要とされる。研究代表者が海外研究協力者との準備研究で得た、ニッチをミミックする擬態分子としての化学合成ポリマーを1枚のスライドに数百種類スポットしたアレイ上で神経幹細胞

ヒストン脱メチル化酵素GASC1の機能



胞の未分化性維持と自己複製を評価するシステム (Bizen et al., unpublished) は、この解決に向かう大きな足がかりとなることから、このユニークなアプローチも行うこととした。

本研究課題の遂行による目的達成は、中枢神経系の発生と発達における細胞内エピゲノム要因と細胞外微小環境要因の関与について基本的概念の提示につながる可能性を秘めているという学術的意義とともに、自閉スペクトラム症を含む精神運動発達障害の病因解明と治療法開発につながる社会的意義も大きいと考える。

3. 研究の方法

(1) GASC1 の神経回路形成における役割：

ヒト発達障害様の行動異常を呈する *Gasc1* 遺伝子変異ホモ接合体マウスと正常対照マウスの脳切片を作成する。ゴルジ染色によりスパインを染め出した上でスパインの定量や形状の解析を行い、*Gasc1* 遺伝子の変異の有無による差異を検討した。また、*Gasc1* 遺伝子変異ホモ接合体マウスと正常対照マウスの脳から海馬スライス培養を調製して、電気生理学的解析を行った。

(2) 中枢神経系構成細胞特にアストロサイトの存在動向検出による GASC1 低発現マウスの病態解析：

GASC1 発現低下変異マウスの脳および対照群の切片について、アストロサイトの局在や分化状態をアストロサイト分化マーカー GFAP に対する蛍光免疫染色などで解析した。

(3) TET3 の中枢神経系の発生制御における機能：

TET3 によるアストロサイト分化能獲得への影響については、アストロサイト分化能が低い時期の神経幹細胞を胎生 11.5 日目のマウス終脳から調整し、TET3 の強制発現および変異体発現後、アストロサイトマーカー抗体による蛍光免疫染色などで解析した。さらに、TET3 とアストロサイト特異的遺伝子プロモーターとの物理的及び機能的相互作用を、メチルシトシンやヒドロキシメチルシトシンの動態および ChIP アッセイにより解析した。

(4) 人工ポリマーを用いた神経幹細胞のニッチ環境の解明：

エジンバラ大学の共同研究者から供与された約 400 種類の合成ポリマーをスポットしたマイクロアレイ上で神経幹細胞を培養する際に、コンベンショナルな神経幹細胞増殖因子の非存在下で神経幹細胞を維持し得るかどうかを指標に探索した。

(5) 神経幹細胞の自己複製機構の解析：

胎生 14.5 日目マウス終脳から神経幹細胞を調整し、コンベンショナルな神経幹細胞増殖因子の下流で作用する分子群の強制発現、ノックダウン、変異体発現により解析した。

4. 研究成果

(1) GASC1 の神経回路形成における役割：

ヒト発達障害様の行動異常を呈する *Gasc1* 遺伝子変異ホモ接合体マウスと正常対照マウスの脳切片をゴルジ染色し、*Gasc1* 変異マウスの海馬ニューロンの形態を可視化したところ、CA1 錐体細胞のスパイン数に有意な増加が検出された。

また、同変異成獣マウスと対照正常マウスの海馬スライス培養を用いて行った CA3 CA1 錐体細胞形成シナプス応答による集合 EPSP (興奮性シナプス後電位) の解析によって、変異マウス海馬の LTP (長期増強) はテタヌス刺激後 60 分まで正常対照より有意な上昇が観察された。この結果はヒストン脱メチル化というエピジェネティック制御の異常を有するマウスが行動異常を示すという発見を契機に、ヒト精神神経疾患の病因・病態解明と治療法開発の研究において重要な示唆を与えるものである。

(2) 中枢神経系構成細胞特にアストロサイトの存在動向検出による GASC1 低発現マウスの病態解析：

前項の結果が示すように、CA1 錐体細胞のスパイン数に有意な増加が検出された。しかし、*Gasc1* 変異マウスより調製した初代海馬ニューロン純培養系ではシナプス数の有意な増加は認められなかったことから、マウス生体におけるスパイン数の増加はニューロンに内包する GASC1 の直接的な作用あるいはニューロン分化時の細胞自律性の要因ではなく、細胞外環境の影響が大きいと推察された。実際にアストロサイトのマーカーを蛍光免疫染色で調べてみると、*Gasc1* 変異マウスの大脳皮質、線条体、視床など脳の広範な領域でアストロサイト数の増加が検出された。以上の結果より、ニューロンにおける *Gasc1* 遺伝子発現の低下は、ニューロン-アストロサイト間の相互作用を介してスパイン数の増加を引き起こす可能性が示唆された。

(3) TET3 の中枢神経系の発生制御における機能：

研究代表者は以前、アストロサイト分化のタイミングが DNA 脱メチル化に依存することを示した。不明であったその脱メチル化経路について、メチルシトシン水酸化酵素 TET3 の観点から取り組んだ。その結果、TET3 を強制発現させた胎生中期神経幹細胞において、通常出現しにくい GFAP 陽性アストロサイトが顕著に出現したこと、さらに、TET3 とアストロサイト特異的遺伝子プロモーターとの物理的及び機能的相互作用を ChIP アッセイにより明らかにすることができたことから、神経発生におけるアストロサイト分化能の獲得およびそのタイミングを制御する DNA 脱メチル化反応にメチルシトシン水酸化酵素である TET3 が関与することを見出した。

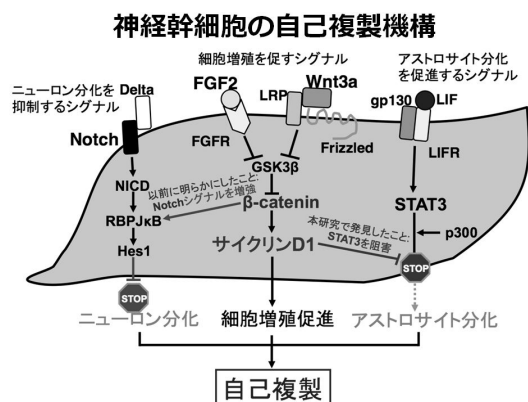
(4) 人工ポリマーを用いた神経幹細胞のニッチ環境の解明：

海外研究協力者から供与された約 400 種類の合成ポリマーをスポットしたマイクロアレイ上で神経幹細胞を培養する際に、コンベ

ンショナルな神経幹細胞増殖因子が存在しなくても、神経幹細胞を維持できるか否かを指標にスクリーニングしたところ、ポリアクリル系のポリマーをひとつ同定した。このポリマー上で、神経幹細胞増殖因子非存在下で培養した神経幹細胞は、その後、ニューロスフェアアッセイで確かに幹細胞性を維持していることがわかった。またその神経幹細胞は、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化する能力を維持していた。

(5) 神経幹細胞の自己複製機構の解明：

神経幹細胞は自己複製能を有する一方で、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを生み出す多分化能を持つ。幹細胞の枯渇を防ぐための自己複製においては細胞分裂時に細胞分化を抑制する仕組みが必要であるが分子基盤は未解明であった。神経幹細胞の増殖因子として fibroblast growth factor 2 (FGF2)と Wnt が知られている。当分野では以前に、神経幹細胞において FGF2、Wnt、Notch のシグナルが相互作用して、前2者のシグナルは、GSK3βの不活化を経たβ-cateninの核内蓄積量により、cyclin D1発現誘導を経て増殖促進性に働き(下図中央)、その一方で、β-cateninはNotchシグナルの増強によるニューロン分化抑制性に働くこと(下図左)、自己複製に寄与することを明らかにした。本研究ではさらに、FGF2/ Wnt



シグナルがアストログリア分化を抑制する機構として、GSK3β / β-catenin 経路のひとつの標的遺伝子産物である cyclin D1 が細胞周期促進作用とは別に GFAP 陽性アストロサイトの分化を抑制することを見出した。その分子機構として、cyclin D1 が STAT3 と p300 の結合を部分阻害することに加え、cyclin D1 がアストログリア特異的遺伝子 *Gfap* のプロモーター活性を抑制することを明らかにした(上図右)。これらの成果を総合することで、神経幹細胞の自己複製を維持する機構が説明可能となった点で、本研究は意義深い。

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 9 件)

Inagaki T, Kusunoki S, Tabu K, Okabe H, Yamada I, Taga T, Matsumoto A, Makino S, Takeda S, Kato K. Up-regulation of lymphocyte antigen 6 complex expression in side-population cells derived from a human trophoblast cell line HTR-8/SVneo. *Human Cell*, in press. 査読有

Anani M, Nobuhisa I, Osawa M, Iwama A, Harada K, Saito K, Taga T. Sox17 as a candidate regulator of myeloid restricted differentiation potential. *Development, Growth & Differentiation*, 2014 Aug;56(6):469-79, 2014. 査読有 doi: 10.1111/dgd.12147.

Nobuhisa I, Osawa M, Uemura M, Kishikawa Y, Anani M, Harada K, Takagi H, Saito K, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Iwama A, Taga T. Sox17-mediated maintenance of fetal intra-aortic hematopoietic cell clusters. *Molecular and Cellular Biology*, 34(11):1976-90, 2014. 査読有 doi: 10.1128/MCB.01485-13

Bizen N, Inoue T, Shimizu T, Tabu K, Kagawa T, Taga T. A growth-promoting signaling component cyclin D1 in neural stem cells has antiastrogliogenic function to execute self-renewal. *Stem Cells*, 32:1602-1615, 2014. 査読有 doi: 10.1002/stem.1613.

鹿川哲史、備前典久、清水健史、田賀哲也. GSK3 シグナル経路による神経前駆細胞の自己複製制御. *生化学* 86, 68-71, 2014. 査読無 <http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2014/08/86-01-09.pdf>

Kusunoki S, Kato K, Tabu K, Inagaki T, Okabe H, Kaneda H, Suga S, Terao Y, Taga T, Takeda S. The inhibitory effect of salinomycin on the proliferation, migration and invasion of human endometrial cancer stem-like cells. *Gynecologic Oncology*, 129:598-605, 2013 査読有 doi: 10.1016/j.ygyno.2013.03.005

Tabu K, Bizen N, Taga T, and Tanaka S. Gene Regulation of Prominin-1 (CD133) in Normal and Cancerous Tissues. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 777, 73-85, 2013. 査読有 doi: 10.1007/978-1-4614-5894-4_5.

備前典久、田賀哲也. サイトカインのすべて: 増殖因子 LIF. 臨床免疫・アレルギー科 (Clinical Immunology & Allergy), 57, 545-552, 2012. 査読無

Nobuhisa, I, Yamasaki S, Ramadan A, and Taga T. CD45 low c-Kit high cells have hematopoietic properties in the mouse aorta-gonad-mesonephros region. *Experimental Cell Research*, 318, 705-715, 2012. 査読有
doi: 10.1016/j.yexcr.2012.01.017.

〔学会発表〕(計 27 件)

(以下は 27 件のうち、研究代表者の招待講演の抜粋)

田賀哲也、榎康一、備前典久. 人工ニッチ構築による幹細胞分化制御ニッチの分子基盤解明へのアプローチ 第 35 回日本炎症・再生医学会、万国津梁館、沖縄 2014 年 7 月 1-4 日

Tetsuya Taga and Kouichi Tabu. Characterization of C6 glioma cancer stem cell niche by using synthetic polymers for the development of therapeutic strategies. 2014 Seoul National University CRI Cancer Symposium. Mokpo, Korea. April 16-19, 2014.

Tetsuya Taga. Glioma stem cell survival strategy in view of niche involving immune/inflammatory cells. 11th World Congress on Inflammation, Natal, Brazil. September 21-25, 2013.

田賀 哲也 中枢神経系の発生と再生の分子基盤 第 34 回日本炎症・再生医学会 2013 年 7 月 2-3 日 国立京都国際会館、京都市.

Tetsuya Taga, Kouichi Tabu, and Nozomi Muramatsu. Understanding of cancer stem cell niche for the development of novel therapeutic strategies. Seoul National University CRI Cancer Symposium. Seoul, Korea. May 2-4, 2013.

田賀哲也、鹿川 哲史、備前典久、山口 雄平、国分 康博、服部 聡子、高雄 啓三、宮川 剛、稲澤 譲治、中村肇伸、仲野徹 DNA/ヒストンのメチル化制御による中枢神経系の発生制御: 分子機構からヒト精神運動異常様行動を示す遺伝子変異モデルマウスまで 第 33 回日本炎症・再生医学会 ホテル日航福岡、福岡市 2012 年 7 月 5-6 日

Tetsuya Taga, Kouichi Tabu, Norihisa Bizen, and Nozomi Muramatsu. Multi-disciplinary approaches towards understanding cancer stem cell (CSC) self-renewal strategies: CSC niches as therapeutic targets. 2012 Seoul National University CRI Cancer Symposium: Innovative Approaches to Explore Novel Druggable Targets. Seoul, Korea. May 16-18, 2012.

〔図書〕(計 2 件)

備前典久、鹿川哲史、田賀哲也. 脳神経系の再生医学-発生・再生の融合的新展開-. 診断と治療社, pp. 28-33, 2015.

田賀哲也. カンデル神経科学. メディカル・サイエンス・インターナショナル, pp. 1160-1181, 2014.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/scr/greeting/index.html>

http://reins.tmd.ac.jp/html/100007289_ja.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田賀 哲也 (TAGA, Tetsuya)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号: 40192629