

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700412

研究課題名(和文)全ゲノムメチル化解析による神経幹細胞性質変化に関する遺伝子同定及び機能解析

研究課題名(英文)Analysis of neural stem cell fate using whole genome methylation profile

研究代表者

佐野坂 司 (Sanosaka, Tsukasa)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：40588472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、発生の進行に伴って変化する神経幹細胞の性質(未分化性維持・分化能)をDNAメチル化変動といったエピジェネティックな観点から解析した。胎生期の異なる(胎生11, 14, 18日目)マウス脳より単離した神経幹細胞、及び、神経幹細胞から分化したニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトよりDNAを回収し、全ゲノムメチル化解析を行った。その結果、各細胞種特異的なメチル化変動領域を同定するとともに、それら変動領域での転写因子結合配列を同定した。

研究成果の概要(英文)：In this research, I analyzed property of neural stem cell, which change during development comparing methylation status. I collected neural stem cells from different stage (Embryonic day 11, 14, 18) of mouse brain and differentiated cells such as neuron, astrocyte and oligodendrocyte for whole genome methylation analysis. I identified the differentially methylated region of each cell type and transcription factor binding site.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：エピジェネティクス DNAメチル化 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞は自己複製能を持つと同時に、脳・神経系を構成するニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの多分化能を持った細胞である。しかしながら神経幹細胞は発生初期には多分化能を持たず、発生進行に伴い順次上述細胞種への分化能を獲得する。このような神経幹細胞の性質変化や分化メカニズムの解明という基礎的研究成果は、臨床応用への飛躍的貢献のためにも不可欠である。そのため、神経幹細胞の分化制御に関する研究は国内外で非常に注目されているものの、その全体像が明らかにされたとは言いがたい。

性質変化のメカニズムの1つとして、DNAメチル化というエピジェネティックな修飾が神経幹細胞のアストロサイト分化を制御していることが報告されている。アストロサイト特異的遺伝子のプロモーター領域は、胎生中期では高度にメチル化されており、転写因子の結合が阻害されるために遺伝子発現に至らない。しかし、発生段階の進行に伴いこの領域の脱メチル化が生じ、脱メチル化された状態にある胎生後期の神経幹細胞では刺激に応じてこれら因子の発現が誘導される。

このような領域特異的なDNA脱メチル化機構に関して研究代表者らは、転写因子 NFIA がアストロサイト特異的遺伝子プロモーターの脱メチル化を誘導することを報告した (Namiyama et al. Dev Cell, 2009)。しかしながら、それらは一部の遺伝子についてのみであり、ゲノム全体でどの程度メチル化状態が変化しているのか、さらには、その変化によって制御されている遺伝子がどの程度あるのかは明らかとなっていない。そこで本研究では、発生段階の進行に伴う神経幹細胞でのメチル化状態の変動をゲノム全体で把握し、神経幹細胞の性質変化をエピジェネティックな観点から明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、神経幹細胞の発生段階の進行に伴うメチル化変動領域を特定する。また、遺伝子発現データと比較することでメチル化変動によって制御されている遺伝子の探索や、メチル化状態を制御する因子を探索し、領域特異的なメチル化変化を制御するメカニズムの解明、及び、それに伴う神経幹細胞の性質変化を解析する。

3. 研究の方法

(1) 予備的実験より、発生段階の異なる時期のマウス脳より単離した神経幹細胞、及び、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトにおける全ゲノムメチル化解析を行っている。その際、神経幹細胞特異的な発現が認められる Sox2 遺伝子プロモーターの

下流に EGFP 遺伝子を組み込んだ (Sox2-EGFP) トランスジェニックマウス (D'Amour & Gage, PNAS 2003) の各発生段階の脳より、蛍光セルソーターを用いて神経幹細胞を直接単離した。それら細胞からゲノム DNA を回収し、1塩基解像度でメチル化レベルを解析可能な PBAT 法を用いて全ゲノムメチル化解析を行った。

(2) 各細胞でのメチル化レベルを、ゲノム全体、転写開始点近傍、プロモーター領域、等に分けて比較する。

(3) 発生の進行に伴ってメチル化状態の変動する領域を同定する。また、分化したニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト特異的なメチル化パターンを探索する。

(4) 同定したメチル化変動領域における共通性を探索する。主に、転写因子結合配列の有無を探索する。

4. 研究成果

(1) まず、各細胞における全体でのメチル化状態を解析した。すでに報告されているように、ゲノム全体としては 80% 程度がメチル化されており、その値は各細胞でほぼ同程度であった (図 1)。遺伝子発現を制御するようなメチル化領域は、転写開始点やプロモーター領域に存在するため、ゲノム全体でメチル化レベルを比較してもそれら領域における差が見られない可能性が考えられた。そこで、遺伝子の転写開始点近傍領域のみを抽出して同様にメチル化レベルを比較したが、各細胞でメチル化レベルは同じであった。

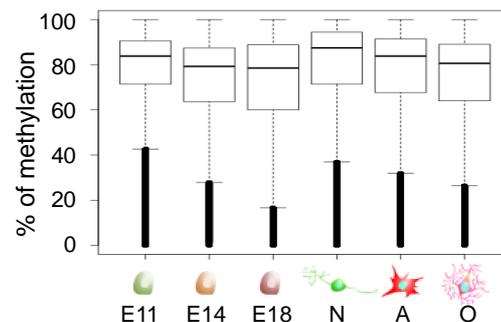


図 1. 各細胞種でのメチル化率の比較
各発生段階 (胎生 11, 14, 18 日目) 神経幹細胞と、分化した細胞 (N; Neuron, A; Astrocyte, O; Oligodendrocyte) における細胞全体でのメチル化率を比較した。

(2) メチル化レベルに差がないことが分かったが、メチル化のパターンが細胞種によって異なるかを検討するため、クラスタリング解析を行った。その結果、胎生中期 (胎生 11, 14 日目) 神経幹細胞と、そこから分化するニューロンのメチル化パターンが似ていることが明らかになった (図 2)。しかしながら、遺伝子発現パターンでクラスタリングを行

うと、幹細胞と分化した細胞でパターンが分かれた。この結果より、神経幹細胞の分化能を把握するときに、メチル化パターンによってその分化能を判断できる可能性が示唆された。

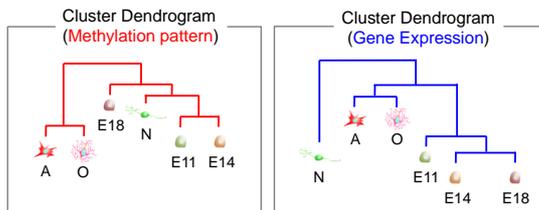


図2. メチル化パターン及び遺伝子発現パターンによるクラスタリング

メチル化パターンでは、神経幹細胞の分化能によって分類されるが、遺伝子発現による分類では、幹細胞と分化した細胞によってパターンが分かれる。

(3) 神経幹細胞のアストロサイトへの分化は、アストロサイト特異的遺伝子のプロモーター領域の脱メチル化が必須であることが知られている。そこで、アストロサイトだけでなく、ニューロンやオリゴデンドロサイトにおける脱メチル化の可能性を考え、各細胞で脱メチル化される領域を探索した。その結果、アストロサイトやオリゴデンドロサイトのように、胎生後期で分化能を獲得する細胞は、発段階の進行に伴って脱メチル化が生じることが明らかとなった(図3)。

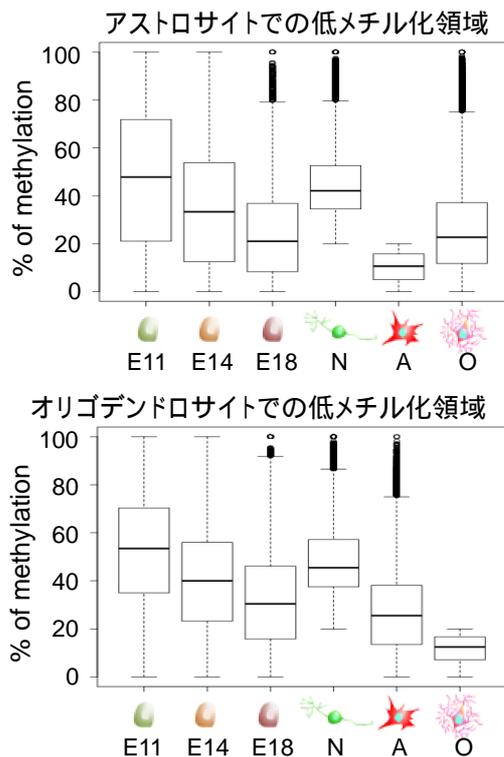


図3. グリア細胞での脱メチル化領域。アストロサイトやオリゴデンドロサイトで低メチル化状態の領域は、胎生中期では高頻度にメチル化されており、発生段階の進行に伴い脱メチル化を受ける

それに対し、ニューロンへの分化能を獲得している胎生中期では、既に脱メチル化された状態にあり、ニューロン特異的遺伝子を発現できる状態にあることが分かった(図4)。

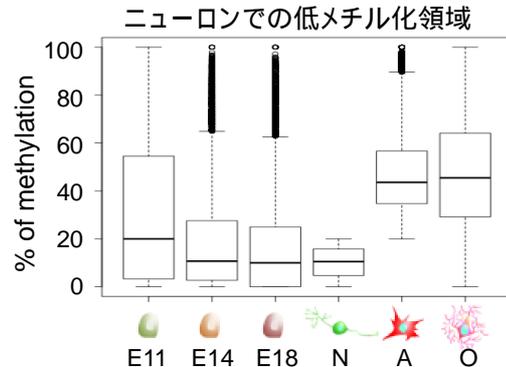


図4. ニューロンでの低メチル化領域。ニューロンで低メチル化の領域は、胎生中期の状態に既に脱メチル化された状態にあり、ニューロンへの分化能を獲得していることを示している

(4) アストロサイトやオリゴデンドロサイトでは、発生の進行に伴って脱メチル化が生じることが分かったため、それら脱メチル化領域に共通性があるかどうかを、モチーフ検索を行い検討した。その結果、アストロサイトの脱メチル化領域においては、既にDNA脱メチル化を誘導することが知られている NF1 結合配列が検出された。また、オリゴデンドロサイトで脱メチル化される領域においては、Sox10、Mash1 の結合配列が高頻度に出現することが分かった。Sox10、Mash1 は、どちらもオリゴデンドロサイトへの分化に重要な因子であることが報告されている。

これらの結果から、神経幹細胞のオリゴデンドロサイトの分化においても、DNAメチル化変動というエピジェネティックな修飾が関与していることが想定される。

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 件)

〔学会発表〕(計 1件)

佐野坂司, 三浦史仁, 五十嵐勝秀, 藤井信之, 森山紀子, 菅野純, 池尾一穂, 伊藤隆司, 中島欽一. 発生進行に伴う神経幹細胞のDNAメチル化変動と遺伝子発現解析. 第7回エピジェネティクス研究会 2013年5月30-31日. 奈良県.

〔図書〕(計 1件)

佐野坂司, 中島欽一. 羊土社. 脳神経科学イラストレイテッド(多能性幹細胞からの神経分化) 改訂第3版 2013, p105-112

〔産業財産権〕

出願状況（計 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 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

佐野坂 司 (SANOSAKA TSUKASA)
九州大学大学院 医学研究院 応用幹細胞医科学部門・特任助教
研究者番号：40588472

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：