

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22123002

研究課題名（和文）幹細胞多様性形成機構

研究課題名（英文）Molecular mechanism for multipotency of stem cells

研究代表者

影山 龍一郎（Kageyama, Ryoichiro）

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：80224369

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 89,400,000円

研究成果の概要（和文）：胎生期の神経幹細胞は、まず多様なニューロンを産生し、最後にグリア細胞を産生する。したがって、胎生期の神経幹細胞は経時的に分化能を変化させているが、この分子機構の詳細は不明である。多分化能を持った神経幹細胞では、多種類の分化決定因子の発現が振動すること、またニューロンやグリアの遺伝子発現を制御するヒストンメチル化酵素ESETの発現が発生の進行とともに減少することがわかった。ESET遺伝子上流には分化決定因子の1つであるHes1の結合配列が多数存在することから、Hes1の発現振動がESETの発現制御を介して神経幹細胞の分化能の経時的变化に関わることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Embryonic neural stem cells give rise to various types of neurons first and glial cells later. Thus, embryonic neural stem cells change their competency during development, but the detailed mechanism is not known. We found that in multipotent neural stem cells, multiple fate determination factors are expressed in an oscillatory manner, and that the expression of the histone methyl transferase ESET, which regulates neuronal and glial gene expression, gradually decreases during development. Because the ESET gene promoter contains multiple binding sites for Hes1, one of the fate determination factors, it was suggested that Hes1 oscillation regulates temporal changes of competency of neural stem cells via ESET expression.

研究分野：分子生物学

キーワード：神経幹細胞 ヒストンメチル化酵素 ESET/Setdb1 分化決定因子 Hes1 発現振動

1. 研究開始当初の背景

胎生期の神経幹細胞は、まず多様なニューロンを産生し、最後にグリア細胞を産生する。したがって、胎生期の神経幹細胞は経時的に分化能を変化させることによって多様な細胞を産生するが、この分子機構の詳細は不明である。今までの解析から、bHLH 型転写因子 Hes1 は神経幹細胞の未分化性の維持とアストロサイト分化を制御し、他の bHLH 型転写因子である Mash1/Ascl1 と Olig2 はそれぞれニューロン分化とオリゴデンドロサイト分化を制御することが明らかにされていた。しかし、これらの bHLH 因子と神経幹細胞の経時的な分化能の変化との関係も不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、胎生期の神経幹細胞が経時的に分化能を変化させる分子機構を明らかにするために、bHLH 因子の機能解析およびその標的遺伝子の候補の一つであるヒストンメチル化酵素 ESET に注目して、発現・機能解析を行った。

3. 研究の方法

本研究では、ホタルの発光タンパク質であるルシフェラーゼと Hes1、Mash1/Ascl1、Olig2 の 3 種類の bHLH 型転写因子の融合タンパク質を発現する遺伝子改変マウスを作製し、bHLH 型転写因子の発現動態を単一細胞レベルで解析した。また、ヒストンメチル化酵素 ESET/Setdb1 に関して in situ hybridization 法で発現を調べるとともに、神経系特異的な ESET コンディショナル・ノックアウトマウスを作製して脳発生における機能を組織学的に解析した。

4. 研究成果

(1) 神経幹細胞における bHLH 因子の発現イメージング

ホタルの発光タンパク質であるルシフェラーゼと Hes1、Mash1/Ascl1、Olig2 の 3 種類の bHLH 型転写因子の融合タンパク質を発現する遺伝子改変マウスから、それぞれ神経幹細胞培養系を準備した。高感度の発光イメージングによって、Hes1、Mash1/Ascl1、Olig2 の 3 種類の分化運命決定因子の発現動態を観察・解析したところ、神経幹細胞では Hes1 と Mash1/Ascl1 タンパク質は 2~3 時間周期で、Olig2 タンパク質は 5~8 時間周期で発現の増減を繰り返すこと(発現振動)、一方、分化決定時にはこの 3 種類の中から選ばれた 1 種類が持続発現して他の因子の発現が抑制されることが明らかになった(図 1)。これらの結果から、分化決定因子の発現が振動すると神経幹細胞の増殖能が活性化されるのに対し、持続発現すると細胞周期が抑制されて分化決定が誘導されると考えられた。さらに、光感受性タンパク質 hGAVPO を利用した光遺伝学的手法を用いて Mash1/Ascl1 の発現動態を操作することで、発現動態の重要性が確認できた。

次に、神経幹細胞の経時的な分化能の変化に上記の bHLH 因子が関与する可能性を探るために、多数の Hes1 の結合部位をプロモーターに持つヒストンメチル化酵素 ESET に注目して、発現および機能解析を行うことにした。

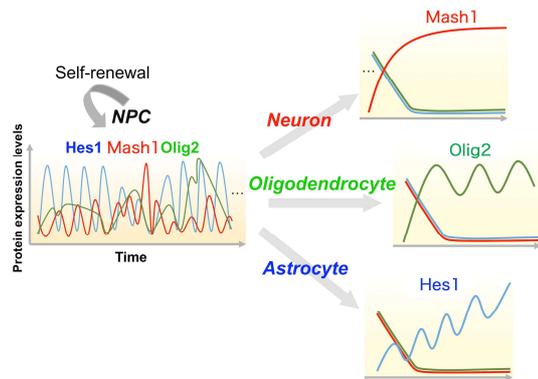


図 1：神経幹細胞(NPC)における bHLH 因子の発現動態。多分化能を持つ神経幹細胞では、3 種類の bHLH 型運命決定因子 Hes1、Mash1/Ascl1、Olig2 の発現が振動している。一方、細胞分化のときは、選ばれた 1 種類の因子の発現が持続するが、それ以外の因子の発現はなくなる。

(2) ヒストンメチル化酵素 ESET の発現・機能解析

発生期の脳における ESET の発現を in situ hybridization 法で調べたところ、神経発生初期の神経幹細胞に強く発現するが、時間とともに減少し、ニューロン産生期からグリア(アストロサイト)産生期に変わるころにはほぼ無くなるのがわかった(図 2)。

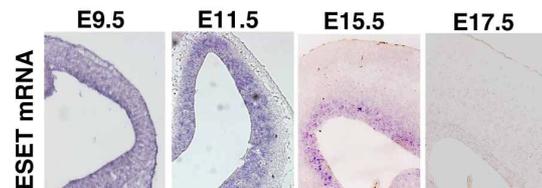


図 2：胎生期脳における ESET の発現。神経発生初期の神経幹細胞に強く発現するが、時間とともに減少する。

ESET の機能解析を行うために、ESET flox マウスを作製し、Nestin-CreERT2 mice あるいは Emx2-Cre mice と掛け合わせた。前者の場合は、胎児期にタモキシフェンを投与することによって神経幹細胞特異的な ESET コンディショナル・ノックアウト(cK0)マウスを作製した。両方のノックアウトマウスで同じ神経発生異常が起こった。まず、マイクロアレイ法によって脳における遺伝子発現を野生型と比較したところ、多くの遺伝子発現が変化していた。ESET cK0 マウスで発現が低下する遺伝子群(cluster 1)の多くはニューロン分化に関わる遺伝子群で、ニューロン形成が阻害されていることが示唆された(図 3)。一方、ESET cK0 マウスで発現が増加する遺伝子群

(cluster 2 および cluster 3)には、神経系では本来発現しない遺伝子群が多く含まれていた。代表的なものとして、内在性レトロトランスポゾン配列 IAP やその近傍遺伝子群の異所性発現が神経系に見られた。これらの遺伝子のプロモーターは、正常な神経系ではヒストンH3のLys 9のトリメチル化によって抑制されていた。しかし、ESET の欠損によってこのトリメチル化が低下し、さらにDNAメチル化も低下することで、異所性の発現が起こることが分かった。以上から、ESET の欠損で神経発生に大きな異常が起こることが明らかになった。

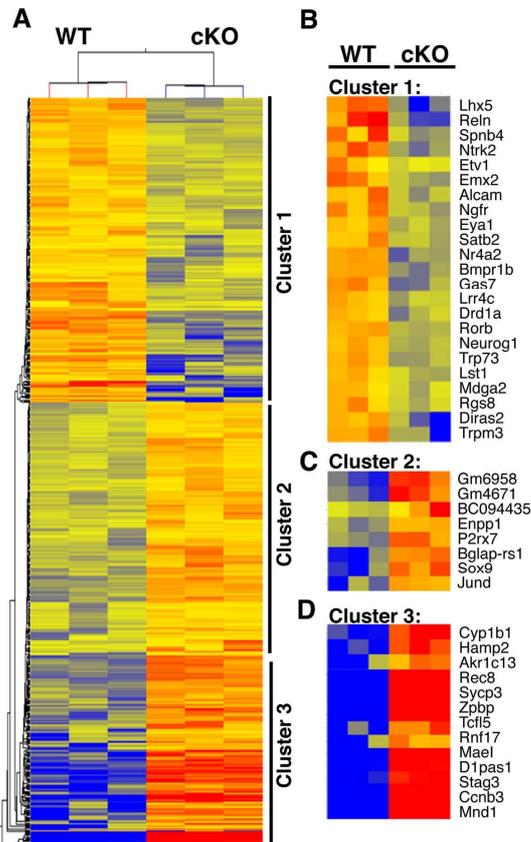


図3: マイクロアレー解析。野生型と比較して ESET cKO マウスで発現が低下する遺伝子群 (cluster 1) や増加する遺伝子群 (cluster 2 および cluster 3) が多数同定された。

次に、ESET cKO マウスの胎児脳の組織学的解析を行ったところ、発生初期に産生される Ctip2 陽性の深層ニューロンの形成が早期に止まることにより、その数が減少した (図4 右上)。一方、発生後期に産生される GFAP 陽性のアストロサイトの形成が、より早期に起こっていた (図4 右下)。逆に、ESET の強制発現で、アストロサイト特異的な遺伝子発現が抑制された。これらのことから、ESET は、神経幹細胞の経時的な分化能の変化に重要な役割を担うことが明らかになった。

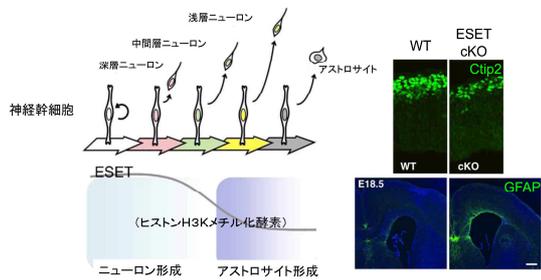


図4: ESET 欠損による神経幹細胞の分化能の変化の加速化。ESET 欠損によって、発生初期に産生される Ctip2 陽性の深層ニューロンの形成が早期に止まって減少し、逆に発生後期に産生される GFAP 陽性アストロサイトの形成がより早期に起こった。

(3) 今後の展望

以上の結果から、ESET の発現は徐々に低下することによって、ニューロン形成からアストロサイト形成への移行のタイミングを制御すること、ESET 欠損によってこの移行のタイミングが加速化することが明らかになった。すなわち、ESET は、神経幹細胞の経時的な分化能の変化に非常に重要な役割を担うことが示された。

ESET のプロモーターには転写抑制因子である Hes1 の結合部位が多数存在することから、Hes1 の発現振動によって ESET の発現が徐々に低下する可能性が示唆された (図5)。Hes1 が持続発現すると、ESET の発現が早期に低下する可能性が示唆されるが、今後の解析が必要である。ESET とは逆に時間とともに発現量が徐々に増加する因子も報告されている。これらは、転写活性化因子である Mash1/Ascl1 等の発現振動によって制御される可能性がある (図5)。今後、Hes1 や Mash1/Ascl1 の発現振動と ESET 等の発現レベルとの詳細な比較をすることによって、上記の可能性を調べる必要がある。

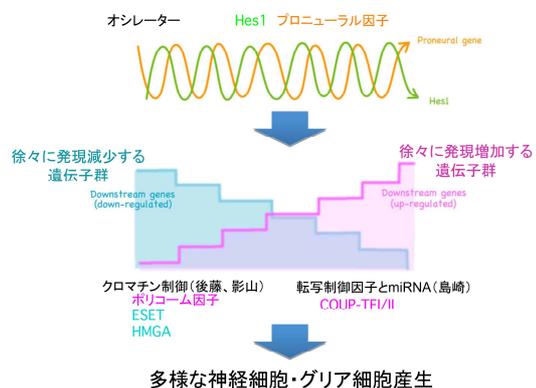


図5: 神経幹細胞の経時的な分化能の変化における Hes1 やプロニューラル因子 Mash1/Ascl1 の役割に関する仮説。発現振動によって、下流因子の発現が徐々に変化するのではないかと考えられる。

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 20 件)

Kobayashi, T., Iwamoto, Y., Takashima, K., Isomura, A., Kosodo, Y., Kawakami, K., Nishioka, T., Kaibuchi, K., and Kageyama, R. (2015) Deubiquitinating enzymes regulate Hes1 stability and neuronal differentiation. **FEBS J.** in press. doi: 10.1111/febs.13290. 査読有

Imayoshi, I. and Kageyama, R. (2014) Oscillatory control of bHLH factors in neural progenitors. **Trends Neurosci.** 37, 531-538. doi: 10.1016/j.tins.2014.07.006. 査読有

Harima, Y., Imayoshi, I., Shimojo, H., Kobayashi, T., and Kageyama, R. (2014) The roles and mechanism of ultradian oscillatory expression of the mouse Hes genes. **Semin. Cell Dev. Biol.** 34C, 85-90.

doi: 10.1016/j.semcdb.2014.04.038. 査読有

Isomura, A., and Kageyama, R. (2014) Ultradian oscillators: rhythms and cell fate decisions. **Development** 141, 3627-3636. doi: 10.1242/dev.104497. 査読有

Shimojo, H., Harima, Y., and Kageyama, R. (2014) Visualization of Notch signaling oscillation in cells and tissues. **Methods Mol Biol.** 1187, 169-179.

doi: 10.1007/978-1-4939-1139-4_13. 査読有

Sakamoto, M., Kageyama, R., and Imayoshi, I. (2014) The functional significance of newly born neurons integrated into olfactory bulb circuits. **Front. Neurosci.** 8, 121.

doi: 10.3389/fnins.2014.00121. 査読有

Sakamoto, M., Ieki, N., Miyoshi, G., Mochimaru, D., Miyachi, H., Imura, T., Yamaguchi, M., Fishell, G., Mori, K., Kageyama, R., and Imayoshi, I. (2014) Continuous postnatal neurogenesis contributes to formation of the olfactory bulb neural circuits and flexible olfactory associative learning. **J. Neurosci.** 34, 5788-5799. 査読有

doi: 10.1523/JNEUROSCI.0674-14.2014.

Hatakeyama, J., Wakamatsu, Y., Nagafuchi, A., Kageyama, R., Shigemoto, R., and Shimamura, K. (2014) Cadherin-based adhesions in the apical endfoot are required for active Notch signaling to control neurogenesis in vertebrates. **Development** 141, 1671-1682. doi: 10.1242/dev.102988. 査読有

Imayoshi, I., and Kageyama, R. (2014) bHLH factors in self-renewal, multipotency, and fate choice of neural progenitor cells. **Neuron** 82, 9-23. doi: 10.1016/j.neuron.2014.03.018. 査読有

Imayoshi, I., Isomura, A., Harima, Y., Kawaguchi, K., Kori, H., Miyachi, H., Fujiwara, T.K., Ishidate, F., and Kageyama, R. (2013) Oscillatory control of factors determining

multipotency and fate in mouse neural progenitors. **Science** 342, 1203-1208. doi: 10.1126/science.1242366. 査読有

Tateya, T., Imayoshi, I., Tateya, I., Hamaguchi, K., Torii, H., Ito, J., and Kageyama, R. (2013) Hedgehog signaling regulates prosensory cell properties during the basal-to-apical wave of hair cell differentiation in the mammalian cochlea. **Development** 140, 3848-3857.

doi: 10.1242/dev.095398. 査読有

Benraiss, A., Toner, M.J., Xu, Q., Bruel-Jungerman, E., Rogers, E.H., Wang, F., Economides, A.N., Davidson, B.L., Kageyama, R., Nedergaard, M., and Goldman, S.A. (2013) Mobilization of endogenous progenitor cells regenerates functionally-integrated medium spiny striopallidal projection neurons and delays disease progression in an transgenic model of Huntington's disease. **Cell Stem Cell** 12, 787-799. doi: 10.1016/j.stem.2013.04.014. 査読有

Imayoshi, I., Shimojo, H., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2013) Genetic visualization of notch signaling in mammalian neurogenesis. **Cell. Mol. Life Sci.** 70, 2045-2057. doi: 10.1007/s00018-012-1151-x. 査読有

Jacob, J., Kong, J., Moore, S., Milton, C., Sasai, N., Gonzalez-Quevedo, R., Terriente, J., Imayoshi, I., Kageyama, R., Wilkinson, D.G., Novitsch, B.G., and Briscoe, J. (2013) Retinoid signalling specifies distinct neuronal identities through graded expression of the transcription factor, *Ascl1*. **Curr. Biol.** 23, 412-418. doi: 10.1016/j.cub.2013.01.046. 査読有

Imayoshi, I., Tabuchi, S., Hirano, K., Sakamoto, M., Kitano, S., Miyachi, H., Yamanaka, A., and Kageyama, R. (2013) Light-induced silencing of neural activity in Rosa26 knock-in mice conditionally expressing the microbial halorhodopsin eNpHR2.0. **Neurosci. Res.** 75, 53-58.

doi: 10.1016/j.neures.2012.03.008. 査読有

Tan, S.-L., Ohtsuka, T., González, A., and Kageyama, R. (2012) MicroRNA9 regulates neural stem cell differentiation by controlling Hes1 expression dynamics in the developing brain. **Genes Cells** 17, 952-961.

doi: 10.1111/gtc.12009. 査読有

Tan, S.-L., Nishi, M., Ohtsuka, T., Matsui, T., Takemoto, K., Kamio-Miura, A., Aburatani, H., Shinkai, Y., and Kageyama, R. (2012) Essential roles of the histone methyltransferase ESET in the epigenetic control of neural progenitor cells during development. **Development** 139, 3806-3816. doi: 10.1242/dev.082198. 査読有

Sparrow, D.B., Chapman, G., Smith, A.J., Mattar, M.Z., Major, J.A., O'Reilly, V.C., Saga, Y., Zackai, E.H., Dormans, J.P., Alman, B.A., McGregor, L., Kageyama, R., Kusumi, K., and Dunwoodie, S.L. (2012) A mechanism for

gene-environment interaction in the etiology of congenital scoliosis. **Cell** 149, 295-306.

doi: 10.1016/j.cell.2012.02.054. 査読有

Imayoshi, I., Hirano, K., Kitano, S., Mitachi, H., and Kageyama, R. (2012) In vivo evaluation of PhiC31 recombinase activity in transgenic mice. **Neurosci. Res.** 73, 106-114. doi: 10.1016/j.neures.2012.02.008. 査読有

Imayoshi, I., Hirano, K., Sakamoto, M., Miyoshi, G., Imura, T., Kitano, S., Mitachi, H., and Kageyama, R. (2012) A multifunctional teal-fluorescent Rosa26 reporter mouse line for Cre- and Flp-mediated recombination. **Neurosci. Res.** 73, 85-91.

doi: 10.1016/j.neures.2012.02.003. 査読有

〔学会発表〕(計 20 件)

Kageyama, R.: Dynamic control of bHLH factors in multipotent neural stem cells. CDB Symposium 2015: Time in Development, Kobe, March 23-25, 2015.

Kageyama, R.: Dynamic control of bHLH factors in somitogenesis and neurogenesis. Cincinnati Children's Hospital, Cincinnati, USA, March 4, 2015.

Kageyama, R.: Dynamic control of bHLH factors in multipotency and fate choice of neural stem cells. 18th International Conference of ISD in conjunction with BSDB, London, UK, November 2-5, 2014.

Kageyama, R.: Dynamic control of bHLH genes in multipotency and fate choice of neural stem cells. DiSCUSS-CSC, Hanover, Germany, October 15-17, 2014.

Kageyama, R.: Dynamic control of Notch signaling in multipotency and fate choice of neural stem cells. Notch Meeting VIII, Athens, Greece, Sept 28- October 1, 2014.

影山龍一郎 : Dynamic control of bHLH factors in multipotency and fate choice of neural stem cells, 第 37 回日本神経科学大会, 横浜, 2014 年 9 月 11 日~13 日

Kageyama, R.: Dynamic control of bHLH genes in multipotency and fate choice of neural progenitors. Gordon Research Conference "Neural Development", Newport, USA, August 10-15, 2014.

Kageyama, R.: The significance of oscillatory expression of Notch effectors in neural development. Gordon Research Conference "Notch Signaling in Development, Regeneration & Disease", Lewiston, USA, July 20-25, 2014.

Kageyama, R.: The significance of dynamic control of fate determination factors in proliferation of neural stem cells. Adult Neurogenesis - From Stem Cells to Therapies, Mumbai, India, Feb 6-8, 2014.

影山龍一郎 : 多分化能と運命決定における神経分化決定遺伝子のダイナミックな制御、第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 3

日~6 日, 2013.

Kageyama, R.: Oscillatory control of determination factors for multipotency versus fate choice in mouse neural progenitors. OIST Symposium on Gradients and Signalling, 沖縄, 11 月 11 日~15 日, 2013.

Kageyama, R.: Dynamic control of neural determination genes in multipotency and fate choice. Cold Spring Harbor Asia/International Society for Stem Cell Research Joint Meeting on Stem Cells in Science and Medicine, Suzhou, China, Oct 14-17, 2013.

Kageyama, R.: Dynamic control of neural determination genes in multipotency and fate choice. 5th International Stem Cell Meeting. Jerusalem, Israel, Oct 8-9, 2013.

Kageyama, R.: Oscillatory gene expression in somitogenesis and neurogenesis. Mouse Molecular Genetics, Cambridge, UK, Sept 18-21, 2013.

Kageyama, R.: "Ultradian oscillations in somitogenesis and neurogenesis", Dynamics of Stem Cell Decisions, Copenhagen, Denmark, Aug 28-30, 2013.

Kageyama, R.: Ultradian oscillations in somitogenesis and neurogenesis. Department of Systems Biology Harvard Medical School Systems Biology Seminar Series, Boston, USA, 10 月 11 日, 2012.

Kageyama, R.: Hes1 oscillation in neural stem cell differentiation. Gordon Research Conference: Notch Signaling in Development, Regeneration & Disease, Maine, USA, 8 月 12 日~8 月 17 日, 2012.

Kageyama, R.: The significance of oscillatory gene expression in the maintenance and differentiation of neural stem cells. The 4th International Congress on Stem Cells and Tissue Formation. Dresden, Germany, 7 月 18 日~7 月 20 日, 2012.

Kageyama, R.: Regulation of embryonic and adult neural stem cells by Notch signaling. DGIST Department of Brain Science Opening Symposium, Daegu, Korea, 6 月 28 日~6 月 29 日, 2012.

Kageyama, R.: Ultradian rhythms in somite segmentation and other biological events. BSDB/BSCB/JSDB Joint Spring Meeting, Warwick, UK, 4 月 15 日~4 月 18 日, 2012.

〔図書〕(計 4 件)

影山龍一郎, 今吉格, 磯村彰宏: 神経幹細胞分化制御機構、「分子脳科学」242-248, 2015.

影山龍一郎: 神経幹細胞における遺伝子発現の動的制御、再生医療シリーズ: 脳神経系の再生医学「発生と再生の融合的新展開」, 45-49, 2014.

影山龍一郎: bHLH 因子による神経幹細胞の運命制御、医学のあゆみ「神経幹細胞研究

の最前線」, 1107-1112, 2014.

Shimojo, H., Maeda, Y., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2013) Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells. Cortical Development: Neural Diversity and Neocortical Organization (Eds: R. Kageyama and T. Yamamori) Springer, pp. 1-17.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：幹細胞の増殖と分化の光遺伝学的制御方法

発明者：影山龍一郎、磯村彰宏、今吉格

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：特願 2013-193582

出願年月日：2013 年 9 月 18 日

国内外の別：国内

名称：幹細胞の増殖と分化の光遺伝学的制御方法

発明者：影山龍一郎、磯村彰宏、今吉格

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：PCT/JP2014/074458

出願年月日：2014 年 9 月 17 日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ：

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/Kageyama/index.html>

<http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/j/ppl/grp/kageyama-r.html>

http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/j/?post_type=labos&p=4912

http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/project/35/35_02.html

アウトリーチ活動：

3 領域合同公開シンポジウム：「多分化能と運命決定における bHLH 因子のダイナミク的な制御」(東京、2014.12.13)

第 15 回 iCeMS カフェ「リズムにのる細胞」(京都、2013.8.11)

第 8 回京都大学附置研究所・センターシンポジウム-京都からの提言：「大人の脳で新たに生まれる神経細胞とその不思議な役割」(札幌、2013.3.16)

第 28 回品川セミナー「大人になっても神経細胞は増えているの？ -- その不思議な役割について」(東京、2012.9.7)

報道：

読売新聞(2014.2.24)

科学新聞(2013.11.22)

京都新聞(2013.11.1)

毎日新聞(2013.11.1)

日刊工業新聞(2013.11.1)

日本経済新聞(2013.11.1)

読売新聞(2013.4.6)

読売新聞(2012.9.17)

毎日放送テレビ(2013.11.1 放映)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

影山 龍一郎 (RYOICHIRO KAGEYAMA)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：80224369