

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02349

研究課題名(和文) 成体脳における静止状態神経幹細胞の増殖・分化制御

研究課題名(英文) Regulation of proliferation and differentiation of quiescent neural stem cells in the adult brain

研究代表者

影山 龍一郎 (KAGEYAMA, Ryoichiro)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：80224369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,400,000円

研究成果の概要(和文)：Hes1レポーターマウスの成体脳スライス培養によって発現動態を解析したところ、静止状態の神経幹細胞においてHes1は高レベルで持続発現することが分かり、そのためにMash1の発現が抑制されていると考えられた。Mash1陰性の神経幹細胞の増殖能は極めて低いことから、光遺伝学的手法でMash1の発現振動の誘導を試みた。Mash1誘導システムをマウス成体脳の神経幹細胞にレンチウイルスを用いて導入し、光照射によってMash1の発現振動を誘導したところ、1週間後に神経幹細胞の多くが活性化されて新たなニューロンを生み出すことが示された。

研究成果の概要(英文)：We performed slice cultures of the adult brain of Hes1 reporter mice and found that Hes1 is steadily expressed at high levels in quiescent neural stem cells. It is likely that this steady Hes1 expression may repress Mash1 expression. Because Mash1-negative neural stem cells do not proliferate well, we next tried to induce Mash1 oscillations optogenetically. The Mash1-inducible system was introduced with lentivirus into neural stem cells in the adult mouse brain, and oscillatory expression was induced by light illumination. After one week, we found that many neural stem cells were activated and produced new neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：神経幹細胞 成体脳 静止状態 発現振動 光遺伝学

1. 研究開始当初の背景

胎児脳の神経幹細胞は、盛んに増殖しながらいろいろな種類のニューロンやグリア細胞を産生し、脳を形成する。一方、成体脳にも神経幹細胞が存在しており、時折分裂して新しいニューロンを生み出し、記憶や学習といった高次脳機能に重要な役割を担う。しかし、成体脳の神経幹細胞の大部分は静止状態(G0/G1期)で、増殖能や分化能は低い。bFGFやBDNFのような増殖因子を成体脳内に導入すると、新生ニューロン数が一過性に増加することが報告されてきた。この一過性のニューロン増加によって虚血性脳障害から回復させたり脳変性疾患の進行を遅らせたりできることがわかっているが、その効果は限定的である。増殖因子を導入しても、活性化される神経幹細胞はごく一部で、大部分は静止状態(G0/G1期)のままである。なぜ、大部分の神経幹細胞は静止状態から抜け出せないのか、静止状態と活性化状態はどのように制御されているのか、その分子機序は不明である。もし、成体脳の神経幹細胞の多くを胎生期のように活性化できれば、各種脳疾患に対してより大きな治療効果が現れるのではないかと強く期待されている。本研究課題では、神経幹細胞の静止状態と活性化状態を制御する分子基盤を明らかにし、2つの状態間の移行を制御する分子機構の解明を目指す。筋肉等の成体の各種組織に存在する幹細胞も多くは静止状態であり、本研究成果は他の組織幹細胞の分子基盤の理解と制御にも貢献することが期待される。

2. 研究の目的

マウス胎児脳由来の神経幹細胞をBMP存在下で培養すると、静止状態になり、成体脳の神経幹細胞と非常に良く似た状態になることが報告されている。この条件でHes1とMash1の発現動態をタイムラプス・イメージングによって測定したところ、活性化状態では両因子とも発現が振動していたが、静止状態ではHes1が高レベルに持続発現し、Mash1の発現は無くなっていた。また、成体脳の組織切片を免疫染色したところ、静止状態の神経幹細胞はHes1を高レベルに発現してMash1は陰性であるのに対して、活性化状態の神経幹細胞はHes1およびMash1をいろいろなレベルで発現していた。すなわち、静止状態の神経幹細胞はMash1を発現していないために、細胞増殖が抑制されている可能性が強く示唆された。以上の予備データをもとに以下の実験を行う。

(1) 活性化および静止状態の神経幹細胞におけるHes1の発現動態をマウス成体脳スライス培養を用いて解明する。

(2) LightON法によるMash1誘導システムをマウス成体脳の神経幹細胞に導入し、光ファイバーによって発現振動を引き起す。経

時的に神経幹細胞の増殖やニューロン新生の度合いを解析する。

(3) マウス胎児脳および成体脳の神経幹細胞からRNAを抽出し、網羅的発現解析を行う。Mash1以外に活性化に関わる候補因子があれば、機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 成体脳スライス培養におけるHes1のタイムラプス・イメージング

本実験には、Hes1タンパク質の発現量を正確に反映する発光レポーターマウスLuc2-Hes1 BAC Tgと蛍光レポーター・ノックインマウスVenus-Hes1 KI Tgを用いた。これらのマウスは報告済みである。それぞれのマウスから成体脳の海馬歯状回および側脳室上衣下帯領域のスライス培養を行い、発光および蛍光量を測定した。

(2) Mash1/Ascl1発現振動によるマウス成体脳の神経幹細胞の活性化

レンチウイルスを用いてMash1/Ascl1の光誘導システム(図1)を成体マウスの海馬歯状回に感染させた。そこに、青色光を照射するオプトフラッシュ(小型LEDランプに光ファイバーをつないだ装置、バイオリサーチ社製)を装着した。この装置によって、3時間周期の青色光照射が可能である。1週間後に脳切片を作製して、GFAP陽性の神経幹細胞の中でKi67やリン酸化ヒストンH3陽性になっている細胞の割合を調べた。また、Dcx染色によって新生ニューロン数を測定した。



図1: 光誘導システムの模式図。LightON法による。

(3) 神経幹細胞の活性化に関わる他の因子の探索

Mash1/Ascl1の発現振動による成体脳神経幹細胞の活性化の程度は、胎児期の神経幹細胞に比べて弱い可能性がある。その差を明らかにするために、Nestinプロモーター下に細胞周期レポーターであるFucciをつないだNestin-Fucciマウス(作製済み)を使ってG1期の胎児神経幹細胞および成体脳神経幹細胞を集めた。いずれも蛍光タンパク質mK02を発現するので、セルソーターで回収してRNAを調整した後、次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。活性化状態と静止状態はG1期の細胞周期制御の違いによるので、G1期において発現量の異なる遺伝子群を同定した。

4. 研究成果

(1) 成体脳スライス培養における Hes1 のタイムラプス・イメージング

まず、蛍光レポーター・ノックインマウス Venus-Hes1 KI Tg の脳スライス培養を行なったが、十分な蛍光が観察できなかった。そのため、発光レポーターマウス Luc2-Hes1 BAC Tg を用いて、タイムラプス・イメージングの観察を行った。成体脳の海馬歯状回および側脳室上衣下帯領域のスライス培養を行い、発光量を測定した。その結果、どちらの領域においても静止状態神経幹細胞において高レベルで発現振動していることが分かった。しかし、十分に発現が下がらないため、Hes1 は持続発現の状態であった。おそらく、そのために Mash1 の発現が陰性になると考えられた (図 2)。

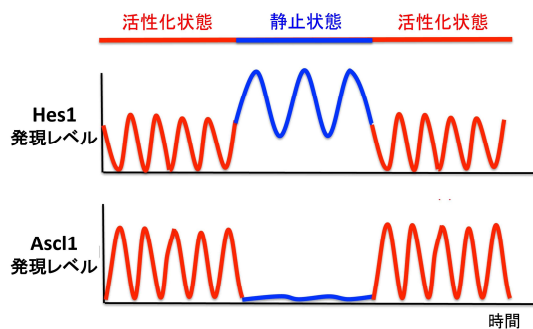


図 2 : 神経幹細胞における Hes1 と Mash1/Ascl1 の発現動態。

(2) Mash1/Ascl1 発現振動によるマウス成体脳の神経幹細胞の活性化

レンチウイルスを用いて Mash1/Ascl1 の光誘導システムを成体マウス (6ヶ月齢) の海馬歯状回に注入し、神経幹細胞に感染させた。ウイルス感染細胞は mCherry で標識されるようにしたところ、静止状態の神経幹細胞に高率に感染していることが確認できた。そこに、青色光を照射するオプトフラッシュを装着し (図 3)、3 時間周期の青色光照射を行った。1 週間後に脳切片を作製して、GFAP 陽性の神経幹細胞の中で Ki67 やリン酸化ヒストン H3 陽性になっている細胞の割合を調べたところ、Mash1/Ascl1 を発現しないコントロール・ウイルス感染細胞に比べて少しだけ増加していた。また、Dcx 染色によって新生ニューロンを調べたところ、コントロール・ウイルス感染細胞に比べて明らかな増加が見られた。



図 3 : オプトフラッシュの外観。

これらの結果から、1 週間という限られた期間であるが、Mash1/Ascl1 の発現振動で成

体脳にある静止状態の神経幹細胞を活性化してニューロン新生を増やすことに成功した。今後、この効果がどれくらい長期間持続できるのかを調べる必要がある。また、老齢マウスでも同様の効果が見られるのかを解析する必要がある。

(3) 神経幹細胞の活性化に関わる他の因子の探索

Mash1/Ascl1 以外で成体脳の静止状態神経幹細胞を活性化する因子を探索するため、G1 期の胎児神経幹細胞および成体脳神経幹細胞を集め、次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。胎生期、青年期 (2ヶ月齢)、老齢期 (18ヶ月齢) について解析した結果、胎生期に発現量の多い遺伝子や老齢期に発現量の多い遺伝子が多数同定できた (図 4)。

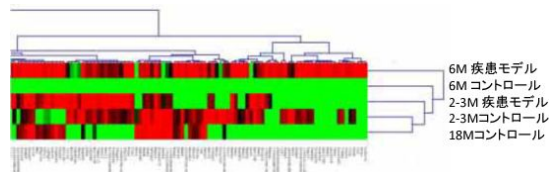


図 4 : 各時期における神経幹細胞に発現する RNA の網羅的解析。

静止状態の神経幹細胞培養系に対して、胎生期に高レベルに発現する遺伝子を強制発現、あるいは老齢期に高レベルに発現する遺伝子をノックダウンしたところ、多くの遺伝子で活性化できることが分かった。さらに絞り込みを行い、10 種類程度の遺伝子が比較的強い活性化効果を示すことが確認できた。今後、これらの因子の組み合わせを解析し、より効率の良いものを同定する必要がある。確認できた組み合わせに関しては、レンチウイルスを使って成体脳の神経幹細胞に導入し、活性化効果を調べる予定である。また、Mash1/Ascl1 との相乗効果についても解析する予定である。

このように、神経幹細胞の静止状態と活性化状態を制御する基本的な分子基盤が明らかになってきた。

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 10 件)

1. Bansod S, Kageyama R, Ohtsuka T (2017) Hes5 regulates the transition timing of neurogenesis and gliogenesis in mammalian neocortical development. Development 144:3156-3167. doi: 10.1016/j.ceb.2017.11.002
2. Kawaguchi K, Kageyama R, Sano M (2017) Topological defects control collective dynamics in neural progenitor cell cultures. Nature 545:327-331.

- doi: 10.1038/nature22321
3. Isomura A, Ogushi F, Kori H, Kageyama R (2017) Optogenetic perturbation and bioluminescence imaging to analyze cell-to-cell transfer of oscillatory information. *Genes Dev* 31:524-535. doi: 10.1101/gad.294546
 4. Souilhol C, Lendinez JG, Rybtsov S, Murphy F, Wilson H, Hills D, Batsivari A, Binagui-Casas A, McGarvey AC, MacDonald HR, Kageyama R, et al. (2016) Developing HSCs become Notch independent by the end of maturation in the AGM region. *Blood* 128:1567-1577. doi: 10.1182/blood-2016-03-708164
 5. Shimojo H, Isomura A, Ohtsuka T, Kori H, Miyachi H, Kageyama R (2016) Oscillatory control of Delta-like1 in cell interactions regulates dynamic gene expression and tissue morphogenesis. *Genes Dev* 30:102-116. doi: 10.1101/gad.270785.115
 6. Goto M, Hojo M, Ando M, Kita A, Kitagawa M, Ohtsuka T, Kageyama R, Miyamoto S (2015) *Hes1* and *Hes5* are required for differentiation of pituicytes and formation of the neurohypophysis in pituitary development. *Brain Res* 1625:206-217. doi: 10.1016/j.brainres.2015.08.045
 7. Imai Y, Kageyama R, (17人中12番目) et al. (2015) The Parkinson's disease-associated protein kinase LRRK2 modulates Notch signaling through the endosomal pathway. *PLoS Genet* 11:e1005503. doi: 10.1371/journal.pgen.1005503
 8. Tateya T, Sakamoto S, Imayoshi I, Kageyama R (2015) In vivo overactivation of Notch signaling pathway in the developing cochlear epithelium. *Hearing Res* 327:209-217. doi: 10.1016/j.heares.2015.07.012
 9. Imayoshi I, Ishidate F, Kageyama R, (2015) Real-time imaging of bHLH transcription factors reveals their dynamic control in the multipotency and fate choice of neural stem cells. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 288. doi: 10.3389/fncel.2015.00288
 10. Watanabe N, Kageyama R, Ohtsuka T (2015) Hbp1 regulates the timing of neuronal differentiation during cortical development by controlling cell cycle progression. *Development* 142:2278-2290. doi: 10.1242/dev.120477
- [学会発表](計21件)
1. Kageyama R. Dynamic transcriptional control of neural stem cells. The Notch Meeting X, Athens, Greece, 2017/10/1-6.
 2. Kageyama R. Dynamic transcriptional control of neural stem cells. EMBO Conference "Gene Regulatory Mechanisms in Neural Fate Decisions" Alicante, Spain, 2017/9/7-10.
 3. 影山龍一郎. 発生過程におけるダイナミックな遺伝子発現動態の解明と制御, 第39回日本光医学・光生物学会, 名古屋, 2017年
 4. 影山龍一郎. Dynamic transcriptional control of neural stem cells. Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. 東京, 2017年
 5. Kageyama R. How to rejuvenate your brain. International Symposium on "Frontiers of Innovative Research towards Sustainable Society in Asia", Bangkok, Thailand, 2017/2/4.
 6. Kageyama R. Oscillatory control of neural stem cells. Keystone Symposium: Neurogenesis during Development and in the Adult Brain, Olympic Valley, USA, 2017/1/8-12.
 7. 影山龍一郎. 短周期遺伝子発現リズムの動作原理と意義 第23回日本時間生物学会学術大会, 名古屋, 2016年
 8. 影山龍一郎. 数理モデルを使って生命現象を理解する 第28回高遠・分子細胞生物学シンポジウム, 高遠, 2016年
 9. Shimojo H, Kori H, Isomura A, Ohtsuka T, Miyachi H, Kageyama R. Oscillatory Control of Delta-Like1 in Cell Interactions Regulates Dynamic Gene Expression and Tissue Morphogenesis. Gordon Research Seminar. Lewiston, USA, 2016/7/30-31.
 10. Kobayashi K, Kageyama R. Single-Cell Quantification of Synchronized Oscillation in the Mouse Segmentation Clock. Gordon Research Conference. Lewiston, USA, 2016/7/31-8/5.
 11. Kageyama R. Dynamic control of neural stem cells. Volga Neuroscience Meeting 2016, Saint Petersburg-Nizhny Novgorod, Russia, 2016/7/24-30.
 12. Kageyama R. Dynamic control of neural stem cells. 第39回日本神経科学大会, 横浜, 2016年
 13. 影山龍一郎. 神経幹細胞のダイナミックな制御, 第48回日本結合組織学会学術大会, 長崎, 2016年
 14. Kageyama R. Oscillatory control of neural stem cells. Swiss-Kyoto Joint Symposium on Life Science. Kyoto, 2016/6/13.
 15. Kageyama R. Oscillatory control of neural stem cells. The 9th Annual Meeting for Japanese Developmental Neuroscientists. Tokyo, 2016/3/18-19.
 16. Kageyama R. Oscillatory control of multipotency and fate choice of neural stem cells. Cortical Organization 3. Tokyo, 2016/2/11-12.
 17. Kageyama R. Oscillatory control of multipotency and fate choice of neural stem

cells. EMBO/EMBL Symposium “Biological Oscillators”, Heidelberg, Germany, 2015/11/12-14.

18. Kageyama R. Oscillatory control of neural stem cells. JST CREST-PRESTO Joint International Symposium, 東京, 2015/11.
19. 影山龍一郎. 神経幹細胞の光遺伝学的操作、KRI ワークショップ, 2015 年
20. Kageyama R. Dynamic control of neural determination factors in multipotency and fate choice. Workshop “Development and Adult Neurogenesis in the Central Nervous System”, Baeza, Spain, 2015/10/5-7.
21. Kageyama R. Plenary Lecture: Molecular control of neural stem cells. IBRO 9th World Congress, Rio de Janeiro, Brazil, 2015/7/7-11.

〔図書〕(計5件)

1. 影山龍一郎 (2018) 生き物を精密に理解する: 分節時計. フロンティア生命科学 278-285.
2. 影山龍一郎 (2017) 時間・空間パターン形成の制御: 分節時計. 遺伝子発現制御機構 187-191.
3. 影山龍一郎 (2017) 神経分化と転写制御. 遺伝子発現制御機構 140-144.
4. 下條博美、影山龍一郎 (2016) 形態形成を司る Notch リズム 実験医学 34, 397-403.
5. 影山龍一郎、今吉格、磯村彰宏 (2015) 神経幹細胞分化制御機構. 分子脳科学 242-248.

〔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

1. 「大脳新皮質発生過程におけるニューロン産生・グリア産生の移行タイミングの制御機構の解明」

<https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/achievements/post-2518/>

2. 「動く細胞集団の作る新しいパターンの発見～神経幹細胞はトポロジカル欠陥を選別する～」
<https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/achievements/post-1807/>
3. 「光遺伝学による遺伝子発現の細胞間リズム同期の再構成」
<https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/achievements/post-1819/>
4. 「受精から体ができるまで」世界トップレベル研究拠点プログラム 10 周年記念講演会「日本の科学の未来に向けて」
<https://www.youtube.com/watch?v=U2dnslMX70>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

影山 龍一郎 (KAGEYAMA, Ryoichiro)
京都大学ウイルス・再生医科学研究所・教授
研究者番号: 80224369

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

播磨 有希子 (HARIMA, Yukiko)
貝瀬 峻 (KAISE, Takashi)
末田 梨沙 (SUEDA, Risa)
朴 文恵 (PIAO, Wenhui)