

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06773

研究課題名(和文) 哺乳動物における神経幹細胞の維持と分化および脳発生・脳進化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms underlying the maintenance/differentiation of neural stem cells and brain development/evolution in mammals

研究代表者

大塚 俊之(OHTSUKA, Toshiyuki)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：20324709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経幹細胞の維持において中心的役割を果たすヒトHES因子の発現・機能解析を行い、HES1/4/5の強制発現によるニューロン分化抑制・神経幹細胞維持活性を確認した。またマニクイザル胎児脳の脳室周囲帯におけるHES1、HES4の発現を認めた。Tet-ONシステムを用いて、脳の神経幹細胞においてHesを高発現するトランスジェニックマウスでは、神経幹細胞が維持されニューロン分化が抑制された結果、脳室が拡大し皮質板が菲薄化する表現形を示した。Hes1高発現マウスではbasal radial glia様細胞の増加が認められ、Hesの発現レベルの変化が哺乳動物の脳の進化に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the expression and functions of human HES factors that play a central role in the maintenance of neural stem cells (NSCs) and revealed the activities of HES1/4/5 to inhibit neuronal differentiation and maintain NSCs when overexpressed. And we found that both HES1 and HES4 are expressed in the ventricular zone of brains of cynomolgus monkey embryos. The transgenic mice, in which Hes is overexpressed in NSCs of brains by using the Tet-ON system, showed a phenotype of expanded ventricles with thinner cortical plate, due to the maintenance of NSCs and inhibition of neuronal differentiation. In the Hes1-overexpressing Tg mice, basal radial glia-like cells increased in number, suggesting that the alteration in Hes expression levels contributes to the mammalian brain evolution.

研究分野：発生生物学

キーワード：神経幹細胞 神経発生 脳発生 脳進化

1. 研究開始当初の背景

幹細胞の維持と分化制御メカニズムの理解は、発生学、再生・修復医学や癌研究分野など、広汎な領域において重要な課題である。特に近年、脳血管障害や外傷により損傷を受けた脳組織の再生・修復を目的として、神経再生医療の研究が進んでいる。

我々のこれまでの研究により、哺乳動物の中樞神経系において bHLH 型転写因子である Hes が Notch シグナルの下流因子としてニューロンへの分化を抑制すること、Hes が神経幹細胞に強く発現し神経幹細胞の維持に参与していることが示された。この Notch-Hes シグナルは神経系に限らず多様な細胞種において、幹細胞維持、分化抑制による未分化状態の維持、細胞系譜の決定等において重要な役割を担っていることが明らかになっており、この Notch-Hes シグナル経路の活性を制御することにより、幹細胞の維持と分化制御が可能になると考えられる。

幹細胞の維持や分化に関わる遺伝子発現やシグナル経路を制御するメカニズムを理解し、これを任意に制御することが可能になれば、胎生期および成体における神経幹細胞の維持と分化メカニズムの解明、脳の発生・進化メカニズムの解明に加えて、移植医療に必要な幹細胞の維持と増殖・分化制御、内在性幹細胞の増殖・分化誘導による脳組織再生、癌細胞・癌幹細胞の強制的分化誘導による治療など、再生医療や癌治療においても飛躍的な発展に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

我々はこれまでの研究で、Hes が Notch シグナルの下流で働くエフェクターとして神経分化を抑制する活性を有し、神経幹細胞の維持において中心的な役割を果たしていることを明らかにしてきた。神経幹細胞の維持と分化制御は、脳の発生・形態形成において重要であるだけでなく、この制御メカニズムの改変が脳の進化の一因であると考えられている。

本研究では、HES 因子(マウスおよびヒト)の発現・機能解析を行い、脳の発生・成体脳におけるニューロン新生・哺乳動物の脳進化における役割を詳細に検討する。神経幹細胞維持・分化制御メカニズムの解明とともに、遺伝子発現を任意に制御可能なトランスジェニック (Tg) マウスの作製等により、HES の発現を任意にコントロールし、幹細胞の維持・分化を制御する手法を確立し、脳の形態形成メカニズムおよび哺乳動物の脳の進化メカニズムの解明を目指す。

更に、神経幹細胞の維持と分化制御メカニズムの理解とその制御手法の開発により、移植医療に必要な幹細胞の維持と増殖・分化制御、内在性幹細胞の増殖・分化誘導・ニューロン新生等による脳組織再生を目指す神経

再生・移植医療、癌細胞および癌幹細胞の強制的分化誘導による癌治療等への応用に繋がる研究を進める。

3. 研究の方法

マウスおよびヒトの HES 因子を中心に、神経幹細胞の維持・分化および脳の発生・進化における機能解析を進めた。ヒトの HES 因子の発現・機能解析を行うとともに、各種 HES 因子の発現を任意に制御するマウスの作製・解析を行い、神経幹細胞の維持と分化・脳の形態形成・成体脳ニューロン新生における HES の活性を検討し、脳の発生・進化における機能を解析した。

(1) *human HES1, HES4, HES5* をクローニングし、その分子機能を解析した。各 HES 遺伝子を含む BAC クローンをもとに、それぞれの発現ベクターおよび *human HES4* のレポーターベクター(各種塩基長の *HES4* プロモーター下に Luciferase を発現)を作製し、自身のプロモーターに対する negative autoregulation の有無、Notch シグナルによる転写活性化の程度を検討した。また *in utero* electroporation 法を用いてマウス胎児の大脳皮質領域に発現ベクターを導入することにより、神経幹細胞の増殖・分化における HES の活性を検討した。

(2) *human HES* の mRNA の発現を検出するための RNA プローブを作製して *in situ* hybridization を行い、カニクイザル胎児脳(各種胎齢)における HES 遺伝子 (*human HES1, HES4*) の発現パターンの解析を行った。

(3) Tet-ON システムを用いて、脳の神経幹細胞において発生段階の任意の時期に HES を高発現する Tg マウスを作製し、神経幹細胞の増殖維持・ニューロン/グリア分化・脳の形態形成に及ぼす影響を調べ、哺乳動物の脳進化における HES の関与を検討した。特に HES を高発現する Tg マウスにおける basal radial glia (bRG) 類似の細胞 (OSVZ progenitor) の発生過程を詳細に検討し、哺乳動物の脳進化のメカニズムに関する解析を進めた。

4. 研究成果

(1) BAC クローンおよび *human cDNA library* からクローニングした *human HES1, HES4* (variant 1 and variant 2), *HES5* の発現ベクターを作製し、強制発現実験を行った。*in utero* electroporation 法を用いて発現ベクターをマウス胎児の大脳皮質領域の細胞に導入し、神経幹細胞の維持・増殖・分化における機能解析を行った。脳室周囲帯の細胞に

HES1/4/5 を発現させると、いずれもニューロン分化が抑制され、導入細胞の多くは皮質板に遊走せず脳室周囲帯から脳室下帯に留まっており、ニューロン分化抑制・神経幹細胞維持活性を認めた。また HES4 のプロモーター領域 (3.1kb, 6.5kb, 9.5kb) をクローニングし、luciferase reporter plasmid に組み込んで作製したレポーターベクターを用いて解析 (レポーターアッセイ) を行った結果、HES4 は HES1 と同様に Notch シグナルによる活性化を受け、negative feedback により自身のプロモーターおよび Hes1 プロモーターを抑制することが確認された。

(2) カニクイザル胎児脳において HES1, HES4 の mRNA の発現を *in situ* hybridization 法により解析し、HES1, HES4 とともに神経幹細胞の存在する脳室周囲帯における発現を認めたが、HES4 抗体 (MBL に依頼して作製) を用いて HES4 蛋白の発現を解析したところ、mRNA の発現が高い後脳領域においては HES4 抗体による染色像が得られたものの、終脳等発現が低い領域では検出が困難であった。

(3) Tet-ON システムを用いて、脳の神経幹細胞において Hes1, Hes5, HES4 を高発現する Tg マウスの解析を行い、Hes1, Hes5 の高発現によりニューロン分化が抑制され神経幹細胞が維持された結果、脳室が拡大し皮質板が菲薄化する表現形が認められ、HES4 の高発現マウスでは比較的軽度の神経幹細胞維持効果が認められた。

Hes1 強制発現マウスにおいては、深層ニューロン産生から浅層ニューロン産生への移行タイミングが早まり、グリア産生も早まっていたが、浅層ニューロン産生はコントロールと比較して緩徐でより遅い時期まで遷延していた。Intermediate progenitor cells は減少を認めたが、脳室下帯に Pax6 陽性; pH3 陽性; pVim 陽性の basal radial glia (bRG) 類似の細胞が増加していた。哺乳動物の脳の進化に寄与したと考えられている bRG 様細胞の増加が認められたことから、Hes1 の発現レベルの変化が脳の進化に寄与している可能性が示唆された。また、生後および成体脳においても脳室下帯に Pax6 陽性; Hes1 陽性の細胞が増加しており、神経幹細胞プールの増大が示唆された。doxycycline 投与中止により Hes1 の発現をシャットダウンすることで脳室下帯における新生ニューロン (Dcx 陽性細胞) の増加を認めた。

Hes5 強制発現マウスにおいても、深層ニューロン産生から浅層ニューロン産生への移行およびニューロン産生からグリア産生への移行タイミングが早まっており、こうした移行タイミングの制御に関わる因子の発現を解析した結果、大脳皮質領域における Hmga 遺伝子の発現減少を認めた。Hes5 ノックアウトマウスでは逆に Hmga 遺伝子の発現が増加しており、深層ニューロン産生から浅層ニュー

ロン産生への移行およびニューロン産生からグリア産生への移行タイミングが遅延していた。更に Hmga 遺伝子のプロモーター解析の結果、Hes5 の発現により Hmga1 および Hmga2 プロモーター活性の低下が認められ、Hes5 の発現レベルの変化が Hmga の発現に影響して移行タイミングを制御している可能性が示唆された (Bansod et al., 2017)。

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 5 件)

Hes5 regulates the transition timing of neurogenesis and gliogenesis in mammalian neocortical development. Bansod S, Kageyama R, *Ohtsuka T. Development. (査読有), 2017 Sep 1;144(17):3156-3167. doi: 10.1242/dev.147256.

Oscillatory control of Delta-like1 in cell interactions regulates dynamic gene expression and tissue morphogenesis. Shimojo H, Isomura A, Ohtsuka T et al., 他 3 名 Genes Dev. (査読有), 2016 Jan 1;30(1):102-16. doi: 10.1101/gad.270785.115.

Hes1 and Hes5 are required for differentiation of pituicytes and formation of the neurohypophysis in pituitary development. Goto M, Hojo M, Ando M et al., 他 5 名 (6 番目) Brain Res. (査読有), 2015 Nov 2;1625:206-17. doi: 10.1016/j.brainres.2015.08.045.

The Parkinson's Disease-Associated Protein Kinase LRRK2 Modulates Notch Signaling through the Endosomal Pathway. Imai Y, Kobayashi Y, Inoshita T et al., 他 14 名 (11 番目) PLoS Genet. (査読有), 2015 Sep 10;11(9):e1005503. doi: 10.1371/journal.pgen.1005503.

Hbp1 regulates the timing of neuronal differentiation during cortical development by controlling cell cycle progression. Watanabe N, Kageyama R, *Ohtsuka T. Development. (査読有), 2015 Jul 1;142(13):2278-90. doi: 10.1242/dev.120477.

〔学会発表〕(計 17 件)

Toshiyuki Ohtsuka, Ryoichiro Kageyama, “Overexpression of Hes1 leads to prolonged neocortical neurogenesis and expansion of neural stem cell reservoir in postnatal brain”, The CDB Symposium 2018 (Kobe, Japan), 2018.3.26-28

大塚 俊之, “Hes genes regulate the transition timing of neurogenesis and gliogenesis in neocortical development”, 新学術領域研究「脳構築における発生時計と場の連携」第2回領域班会議(ニチイ学館 神戸ポートアイランドセンター、神戸), 2017.7.28

大塚 俊之, Bansod Shama、影山 龍一郎, “Hes5 regulates the transition timing of neurogenesis and gliogenesis in neocortical development via downregulation of Hmga genes”, 第40回日本神経科学大会(千葉), 2017.7

大塚 俊之, “Hes5 regulates the transition timing of neurogenesis and gliogenesis in neocortical development via downregulation of Hmga genes”, 新学術領域研究「脳構築における発生時計と場の連携」第1回領域班会議(ふじのくに千本松フォーラム、静岡県沼津市), 2017.1.27

大塚俊之、影山龍一郎, 「Hes1 強制発現により大脳皮質ニューロン産生が遷延し生後脳における神経幹細胞プールが増大する」, 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会(BMB2015)神戸, 2015.12

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 俊之(OHTSUKA, Toshiyuki)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・
准教授
研究者番号：20324709

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし

(4) 研究協力者：なし
()