

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14950

研究課題名(和文) 成体脳のニューロン新生に関与する新規遺伝子の探索

研究課題名(英文) Finding novel adult neurogenesis-related genes in the mouse brain

研究代表者

山田 真弓 (Yamada, Mayumi)

京都大学・生命科学研究科・特定助教

研究者番号：50583457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウスの胎児脳から成体脳の様々なステージにおける神経幹細胞の遺伝子発現プロファイルを行い、成体脳の神経新生のメカニズム解明を目指した。神経幹細胞を蛍光タンパク質で標識した遺伝子改変マウスを用いて、FACSにより様々なステージの神経幹細胞を回収し、大規模なRNAシーケンスを行った。パスウェイ解析やGO解析を行い、神経新生関連遺伝子のスクリーニングを実施した。これらの遺伝子の機能解析を行うために、アデノ随伴ウイルスやレンチウイルスベクターを作製し、培養神経幹細胞あるいは初代神経培養細胞を用いて機能解析を実施した。さらに、機能解析のために新規光遺伝学ツールの開発にも取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで胎児脳または成体脳における神経幹細胞の遺伝子発現について報告した研究はいくつかあるが、本研究のように胎生期から成体老齢期において、大規模に神経幹細胞の遺伝子発現変動を観察した報告は少なかった。成体脳における神経新生は記憶・学習などの高次脳機能に関与していると考えられ、出生期から成体期にかけて、適切に神経幹細胞の性質が制御される必要がある。本研究では、大規模な遺伝子発現プロファイル解析から、神経新生に関与する遺伝子を探索し、生後脳・成体脳における神経新生のメカニズムを解明することによって、アルツハイマー病などの神経疾患の機能改善に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：To understand the precise mechanism of brain development and adult neurogenesis, it's important to unveil the temporal gene expression changes in neural stem cells (NSCs) during brain maturation and aging. I focused on the temporal gene expression changes during brain development and aging of NSCs. To specifically label NSCs in the mouse brain by fluorescence proteins, I generated GFAP-GFP; Nestin-mCherry double transgenic mouse. I isolated NSCs from the embryonic (E14), postnatal (P0) and adult brain (2-3 months old mice) with fluorescence-activated cell sorting (FACS). I determined gene expression profiles of the isolated NSCs by the RNA-sequence analysis. The temporal gene expression changes of NSCs were compared among embryonic, postnatal and adult stages. I highlighted up-regulated or down-regulated genes by 2-fold or more between the compared stages. I am trying to identify novel important genes response for the coordinated regulation of NSCs and neurogenesis.

研究分野：神経発生

キーワード：神経幹細胞 遺伝子発現プロファイル RNAシーケンス 神経新生 光遺伝学 海馬歯状回 側脳室周囲 転写因子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系において、神経細胞は胎生期から出生後しばらくの時期にのみ、神経幹細胞から生み出されると考えられてきた。しかし、最近の研究によって、側脳室周囲の脳室下帯や海馬の歯状回といった特定の領域では神経幹細胞が存在し、神経新生が継続的に続いていることが明らかとなってきた。さらに、神経幹細胞は胎生期、生後発達期、成体期において、自己複製能や多分化能などの性質が時々刻々と変化することが知られている。胎生期の神経幹細胞は、増殖が活発で様々な種類の神経細胞を生み出すことができる (*Yamada et al., JNS, 2014*)。それに対して、成体脳の神経幹細胞は大部分が休眠状態であり、限られた種類の神経細胞しか生み出さない。このように、胎生期から成体期にかけて、神経幹細胞の性質が大きく変化することが知られているが、どのようにして神経幹細胞の性質が制御されているのかは、未だ不明な点が多い。

そこで、神経幹細胞を特異的に蛍光タンパク質で標識するトランスジェニックマウスを作製し、FACSにより脳内の神経幹細胞を採取する方法を検討した。このマウスを用いて、様々なステージのマウス脳から神経幹細胞から採取し、大規模なRNAシーケンスを実施してきた。それぞれのステージにおける遺伝子発現パターンを比較し、特に解析がほとんどされていない生後・成体期において、発現量が著しく変化する遺伝子に着目した。real-time RT-PCR, *in situ* hybridization、あるいは免疫染色によって、上記で得られた候補遺伝子の発現量や発現場所を調べ、神経新生に関与する新規の遺伝子の探索を実施してきた。

また、bHLH型の転写因子である *Ascl1*、*Hes1*、*Olig2* は、それぞれニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの分化における運命決定を制御しており、神経幹細胞に共発現している。申請者の所属するグループでは、胎児脳から取り出した神経幹細胞を用いて、単一の細胞レベルにおけるタイムラプスイメージングにより、これらの因子の発現が振動していることを明らかにした。さらに、光遺伝学を用いた手法により、*Ascl1* の発現パターンを光照射により操作することに成功した。*Ascl1* の持続的な発現は神経細胞への分化を誘導したのに対し、*Ascl1* の振動発現は神経幹細胞の増殖を促進した。これらの結果から、神経幹細胞の多分化能とは複数の分化運命決定因子の発現が振動している状態であり、細胞分化とは単一の分化運命決定因子が持続的に発現している状態であることが明らかになった (*Imayoshi et al., Science, 2013*)。

2. 研究の目的

成体脳における神経新生は記憶・学習などの高次脳機能に重要であると考えられる。実際に、成体において神経新生を阻害したマウスでは、記憶の長期保持能が野生型マウスよりも著しく低下したことから、神経新生が高次脳機能に関与していることが明らかになってきた。このような生後発達期から成体期における神経新生が適切に継続されるためには、神経幹細胞の性質が厳密に制御されている必要がある。

本研究では、胎生期、生後発達期、成体期における神経幹細胞の遺伝子発現プロファイル解析を行い、特に成体脳において神経新生に関与する新規遺伝子の探索を行う。さらに、このような解析を通して、成体脳の神経新生のメカニズムを明らかにし、アルツハイマー病などの神経疾患の脳機能改善への応用に貢献できればと考えている。

3. 研究の方法

(1) 胎児脳から成体脳の様々なステージにおける、神経幹細胞の遺伝子発現プロファイル

神経幹細胞を特異的に蛍光タンパク質で標識するトランスジェニックマウスを作製し、FACSにより脳内の神経幹細胞を採取する。さらに、胎児脳から成体脳の様々なステージの神経幹細胞からRNAを採取し、大規模なRNAシーケンスを実施する。本課題では、それぞれのステージにおける遺伝子発現パターンを比較し、特に解析がほとんどされていない生後・成体期において、発現量が著しく変化する遺伝子に着目する。real-time RT-PCR, *in situ* hybridization、あるいは免疫染色によって、上記で得られた候補遺伝子の発現量や発現場所を調べる。神経新生に関与する新規の遺伝子を探索する。

(2) 神経新生関連遺伝子の機能解析

(1) で得られた、神経新生関連遺伝子を培養神経幹細胞等に強制発現あるいは発現抑制した時に見られる表現型の解析を行う。これらの遺伝子の発現制御には、申請者が新規に開発した光遺伝学的手法を適用する。さらに、子宮内エレクトロポレーション法やウイルスインジェクションと組み合わせて、脳における機能解析を行う。

(3) 神経幹細胞が休眠状態から活性状態に変化する様子を継時的に観察する

成体の神経幹細胞の大部分は休眠状態にある。休眠状態の神経幹細胞の一部が活性型になり神経新生が引き起こされる。これまで成体脳の神経幹細胞が、休眠状態から活性状態へと変化する様子やメカニズムについてはほとんど調べられていない。そこで、神経幹細胞を培養し、(1)で得られた神経新生関連遺伝子を強制発現あるいは発現抑制して、経時的な変化をタイムラプス顕微鏡で観察する。さらに、新規に開発した光操作技術によって遺伝子発現を制御する実験系の確立を行う。レンチウイルスを用いて、光操作系を遺伝子導入することによって、さまざまな遺伝子の発現をコントロールし、その時に見られる細胞の変化をタイムラプス顕微鏡によって観察する。

4. 研究成果

(1) 胎児脳から成体脳の様々なステージにおける、神経幹細胞の遺伝子発現プロファイル
神経幹細胞において蛍光タンパク質を発現するマウス (GFAP-GFP; Nestin-mCherry-nls
ダブルトランスジェニックマウス) の作製を行なった。FACSを用いて、GFPかつmCherry陽性細胞の神経幹細胞を回収した。この手法を用いて、胎生期や成体若齢期 (2-3ヶ月齢)、成体老齢期 (12ヶ月齢以上) といった様々なステージの神経幹細胞を回収して、RNAシーケンスを行った。それぞれのステージの遺伝子発現を比較して、2倍以上の発現変動のある遺伝子を抽出した。さらに、その中から、発現量の高いものを数百個選択し、GO解析やパスウェイ解析を行い、神経新生に関与し得る遺伝子の絞り込みを行った。

bHLH型転写因子 *Ascl1* は胎児脳や成体脳において、神経細胞分化に重要な因子であることが知られている。そこで、*Ascl1* に結合し得る遺伝子や、パスウェイ解析を行い、*Ascl1* の下流に存在する遺伝子に着目した解析も行なった。さらに、アルツハイマーモデルマウスを用いて、同様に神経幹細胞のRNAシーケンスを行い、遺伝子発現プロファイル解析を実施した。

(2) 神経新生関連遺伝子の機能解析

(1) で選別した遺伝子の機能解析を行なうために、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルスベクターの作製を行なった。ウイルスを初代神経培養細胞や培養神経幹細胞に感染

させて目的の遺伝子の過剰発現を行い、神経分化への影響を観察した。さらに、脳内での機能解析も行なうために、脳へウイルスインジェクションを行い、表現型を観察した。

これまで、bHLH 型転写因子 *Ascl1* が示すダイナミックな発現変動が細胞増殖や神経分化の正確さやタイミングを制御する上で、重要な役割を担っていることが示唆されてきた。しかしながら、*Ascl1* の発現変動が、どのようにして細胞増殖や神経分化の正確さやタイミングを制御しているのかは未だ不明である。このような個々の遺伝子が示すダイナミックな発現変動の機能的意義が明らかになれば、神経幹細胞を対象とした再生医療の発展が期待される。しかし、これまでに報告されている既存の遺伝子発現操作技術では、分化運命決定因子が示す数時間周期の発現変動の機能的意義を検証することは不可能であった。そこで、新規の光作動性システムの開発にも取り組んだ。酵母などで報告されている光作動性モジュールと、哺乳類の遺伝子発現制御に使用される Tet システムを組み合わせ、哺乳類細胞において最適化するため、数多くの機能的スクリーニングを実施した。その結果、

TetR(1-206)のC末端の配列とリンカー配列を含めた部分の立体構造が哺乳類細胞における最適化には重要であることが見出し、世界に先駆けて Tet システムの光操作技術の開発に成功した (図 1) (*Yamada et al., Cell Reports, 2018*, 特許出願済。また、2018 年 10 月 10 日付京都新聞において紹介された)。この新規光作動性転写因子は、培養細胞レベルだけではなく、マウス脳の神経幹細胞やニューロンでも機能することが確認できている。今後は、この光操作法の優れた時間分解能という強みを積極的に活用して、神経幹細胞の分化制御メカニズムの解明に取り組んでいきたい。

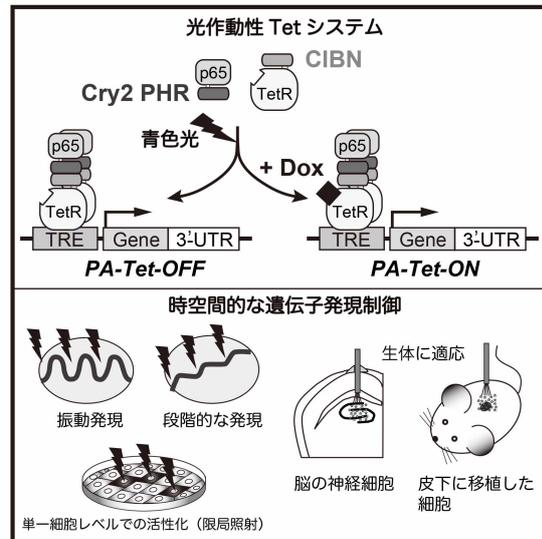


図 1:新規光操作技術を用いた神経幹細胞の光操作

3) 神経幹細胞が休眠状態から活性状態に変化する様子を継時的に観察する

胎児脳由来の培養神経幹細胞に BMP を添加して休眠状態にした後、FGF や EGF を含む培地に置き換え、休眠状態から分裂状態へと変化する様子を、タイムラプス顕微鏡を用いて観察した。培養神経幹細胞に添加する BMP 濃度の検討を行ない、さらに、タイムラプス観察中に細胞へのダメージを抑えながら、培地交換できるように工夫した。遺伝子発現プロファイル解析で抽出した神経新生関連遺伝子を強制発現あるいは発現抑制した時に、細胞がどのような挙動を示すか、タイムラプス顕微鏡を用いて観察した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamada Mayumi, Suzuki Yusuke, Nagasaki Shinji C., Okuno Hiroyuki, Imayoshi Itaru	4. 巻 25
2. 論文標題 Light Control of the Tet Gene Expression System in Mammalian Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 487 ~ 500.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.09.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Taeko Kobayashi, Wenhui Piao, Toshiya Takamura, Hiroshi Kori, Hitoshi Miyachi, Satsuki Kitano, Yumiko Iwamoto, Mayumi Yamada, Itaru Imayoshi, Seiji Shioda, Andrea Ballabio, Ryoichiro Kageyama	4. 巻 10
2. 論文標題 Enhanced lysosomal degradation maintains the quiescent state of neural stem cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13203-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Mayumi Yamada, Shinji C Nagasaki, Takeaki Ozawa, Itaru Imayoshi	4. 巻 152
2. 論文標題 Light-mediated Control of Gene Expression in Mammalian Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 66-77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2019.12.018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mayumi Yamada
2. 発表標題 Optimization of the photo-activatable gene expression system in mammalian cells
3. 学会等名 The 17th International Joint Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mayumi Yamada
2. 発表標題 Optimization of light-inducible gene expression system in mammalian cells
3. 学会等名 第12回神経発生討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mayumi Yamada
2. 発表標題 New optical tools for manipulating gene expressions in neural stem cells
3. 学会等名 第9回光操作研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mayumi Yamada
2. 発表標題 Novel optical tools for manipulating gene expressions in neural stem cells
3. 学会等名 第11回神経発生討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田真弓、長崎真治、今吉格
2. 発表標題 神経幹細胞におけるbHLH型転写因子のダイナミックな発現制御機構
3. 学会等名 日本神経科学学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 今吉 格、山田 真弓	4. 発行年 2018年
2. 出版社 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 「細胞」生後脳・成体脳におけるニューロン新生と神経幹細胞の制御機構	

1. 著者名 今吉 格、山田 真弓	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 4
3. 書名 「Clinical Neuroscience」遺伝子発現の光制御	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 光活性化可能な T e t 発現制御システム	発明者 今吉格、山田真弓、 鈴木裕輔、長崎真治	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-163617	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

researchmap https://researchmap.jp/myamada
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----