

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22687017

研究課題名(和文) 幹細胞の多様化機構の分子基盤の解明および均一分化方法の開発

研究課題名(英文) Identification of the molecule basis on Hes1 oscillation that contributes to the heterogeneous differentiation of stem cells.

研究代表者

小林 妙子 (Kobayashi, Taeko)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：40402804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,700,000円、(間接経費) 5,910,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、抑制型の転写因子Hes1がES細胞内で周期的に発現振動(オシレーション)し、マウスES細胞分化のタイミングや運命決定に寄与している事を見いだしてきた。本研究課題により、1、Hes1の発現レベルが高く、Hes1がオシレーションしていないマウスES細胞では、Notchシグナルが抑制され、中胚葉分化が昂進する事、2、ヒトES細胞、iPS細胞においても、マウスES細胞と同様に、Hes1の発現レベルの低下によって神経分化が昂進する事、3、Hes1タンパク質を安定化する脱ユビキチン化酵素を同定し、その脱ユビキチン化酵素がHes1の安定化を介して幹細胞の神経分化を制御すること、を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Embryonic stem (ES) cells display heterogeneous responses upon induction of differentiation. We have shown that Hes1 expression oscillates in mouse ES cells and that this oscillating expression contributes to the heterogeneous responses. We found the following three results supported by this grant. 1. We found that Hes1 acts as an inhibitor but not as an effector of Notch signaling in ES cell differentiation and that sustained Hes1 expression promotes the preference for the mesodermal rather than the neural fate by suppression of Notch signaling. 2. We found that Hes1 depletion enhances the neural differentiation in both human ES and iPS cell lines as well as mouse ES cell lines. 3. We searched new regulators of Hes1 oscillation from affinity-purified proteins with Hes1 from mouse ES cells and found that the deubiquitinases stabilize Hes1 protein via removing ubiquitin molecules from Hes1, modulate Hes1 oscillation and regulate the neuronal differentiation of neural stem cells.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：Hes1 オシレーション 幹細胞分化

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、胚性幹(ES)細胞から様々な種類の細胞を分化誘導する方法が確立されてきた。しかし、いずれの系においても、ES細胞は均一に分化するのではなくばらばらに分化してゆく。たとえば、ES細胞から神経細胞を分化誘導する条件下では、神経幹細胞のマーカータンパク質 Sox1 や Nestin を発現する細胞が次第に現れるが、その分布やタイミングは多様であり、さらに、未分化な状態を維持し続ける細胞、他の性質を持つ細胞に分化してしまう細胞も共存する。そのため、純粋な分化細胞を得るには、セルソーターによる純化作業等が必要となる。この様な ES細胞分化の不均一性は長年観察されていたものの、そのメカニズムは全く分かっていなかった。

(2) bHLH ファミリーに属する抑制型の転写因子 Hes1 は、様々な細胞においてその発現を振動(オシレーション)させることが明らかになっていった。しかし、一方で、細胞が休眠状態を維持するには常に高レベルの Hes1 の発現が必須であり、発現が低いと老化や分化が進行することが報告されている。また、発生期の脳組織の構造を維持する(増殖していない)境界領域の細胞では一様に強く Hes1 の発現がみられることが報告されている。これらの細胞では、Hes1 の発現は振動していないと予想される。つまり、細胞は Hes1 の振動を維持したり失わせたりすることによって、細胞の性質を調節している可能性が考えられる。細胞内転写因子の発現や活性の動態変動による細胞機能調節は、NF- $\kappa$ B の核内外の移動によるオシレーションでも報告されている。しかし、Hes1 の振動を制御する細胞内の分子機構はほとんど明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

我々は、ES細胞において Hes1 が 3-5 時間の周期で発現振動(オシレーション)していること、オシレーションが細胞間で同調していないために、細胞間で不均一な発現量を示すことを見いだしていた。また、このオシレーションは Hes1 が発現を制御する下流遺伝子の発現変動を引き起こし、ES細胞の分化のタイミングや運命決定を調節していることを明らかにしていた(図1)。さらに、Hes1 の振動を失った Hes1 のノックアウト ES細胞では、約 100%の効率で神経系に分化誘導することを見いだしていた。これらの結果は、Hes1 の短周期のオシレーションが、幹細胞の不均一性を維持するメカニズムの一つであること、また、様々な分化ポテンシャルをもつ細胞を共存させることによって、一つの外界シグナルに対して、多様な細胞応答を可能にする戦略となりうることを示していた。これらの成果を元に、以下の点に着目して研究を行った。

(1) マウス ES細胞を用い、Hes1 の発現を人為的に操作することによって、幹細胞を神経系以外の細胞(中胚葉や内胚葉)にも均一に分化できるかどうかを検討した。

(2) ヒトの ES細胞、iPS細胞でも、Hes1 のレベルを操作して細胞分化を操作できるかどうかを検証し、効率的かつ均一な幹細胞分化の方法を確立することを試みた。

(3) Hes1 のオシレーションを支える細胞内の分子機構を明らかにし、明らかになった分子機構を利用して Hes1 の発現動態を操作し、細胞分化を制御する方法の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) Hes1 を均一に持続発現するマウス ES細胞を作成し、その分化の傾向や分化を制御する分子機構を調べた。どの発生のステージでも構成的に発現する Rosa プロモーター下に Hes1 を導入したノックイン ES細胞を用いて、分化の程度や下流のシグナル経路を解析した。

(2) ヒト iPS細胞、ヒト ES細胞で Hes1 のノックダウンを行い、Hes1 の発現レベルを低下させ、神経分化を効率よく誘導できるかどうかを調べた。ヒト細胞への遺伝子導入には、導入効率の良いレンチウイルスを用いた。

(3) Hes1 のオシレーションは Hes1 タンパク質の安定性に依存する。Hes1 タンパク質の安定性を制御し、Hes1 オシレーションを制御する因子の同定を以下の手法で試みた。

① Hes1 の特異抗体を用いたアフィニティ精製を行い、Hes1 タンパク質と相互作用するタンパク質因子をマウス ES細胞から抽出し、プロテオーム解析で同定した。②発現がオシレーションする転写因子では、転写ネットワーク内に自らの振動を制御する管理システムの存在が示唆されている。例えば、転写因子 p53 では、その下流遺伝子産物である Mdm2 がユビキチン付加酵素として p53 タンパク質を不安定化し、その振動を制御する。我々は、ES細胞を用いた転写産物の Gene Chip 解析、クロマチン免疫沈降産物の tiling array 解析(ChIP-chip)により、Hes1 により直接制御される遺伝子群を既に同定していた。

①②の解析で同定された候補因子の中から、Hes1 タンパク質の安定性に関わると考えられる因子をピックアップし、培養細胞における強制発現やノックダウンによる変化を解析した。また、効果のある因子について、神経幹細胞へ遺伝子導入を行い、分化の影響を調べた。遺伝子導入には、マウス胎児脳組織内の神経幹細胞へのエレクトロポレーション法を利用した。Hes1 の振動の解析には、Hes1 の発現をルシフェラーゼで可視化できる培養繊維芽細胞を用いたリアルタイムイメージング、並びに、血清刺激による発現振動の継時的観察を行った。

#### 4. 研究成果

(1) Hes1 を均一に高発現しているマウス ES 細胞株を用い、Hes1 の発現レベルが一定で高い状態では、ES 細胞は中胚葉分化へ向かうこと、しかし、機能細胞への最終分化には Hes1 レベルの減少が必要であることを明らかにした。また、Hes1 は Notch シグナル下流で機能するエフェクターであるが、ES 細胞では、Hes1 は Notch シグナルを負に制御するインヒビターとして機能して、Notch シグナルを介した分化の運命決定を制御していることを明らかにした(Genes to Cells, 2010)。Hes1 の発現振動がどのように幹細胞分化の運命決定に寄与しているのか、その分子メカニズムを明らかにすることができた(図2)。

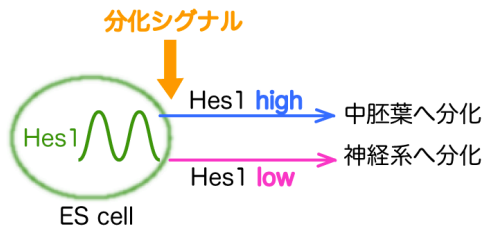


図1. ES 細胞分化と Hes1 オシレーション

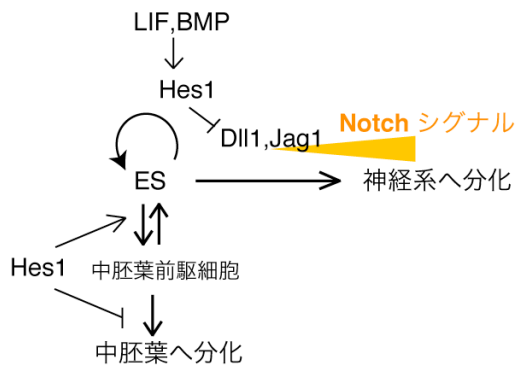


図2. Hes1 は Notch シグナルを抑制し、ES 細胞から中胚葉前駆細胞への分化を促進する

(2) ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞においても、ノックダウンにより Hes1 の発現レベルを低下させると、神経系に、より分化しやすいことを明らかにした(Genes, 2011)。ヒトにおいてもマウスと同様に、ES 細胞、iPS 細胞における Hes1 の発現レベルが、神経分化効率に寄与している事を示した。Hes1 の発現振動が、ヒト幹細胞においても、分化の多様性に寄与することを示唆する結果である。

(3) Hes1 タンパク質はユビキチン化を受けてプロテアソームによって分解される。前述の手法により同定された候補遺伝子の中から、ユビキチン・プロテアソーム系に関わる因子をピックアップして解析を行った。その結果、ある脱ユビキチン化酵素が、細胞内で Hes1 タンパク質と相互作用して、その脱ユビキチン化を促進し、Hes1 タンパク質を安定化していることが分かった。培養繊維芽細胞において、同定された脱ユビキチン化酵素ホモ

ログをノックダウンすると、Hes1 タンパク質が不安定化し、Hes1 オシレーションが減弱すること、オシレーションしている細胞でもその周期が長くなることが分かった。さらに、胎児脳組織内の神経幹細胞において、脱ユビキチン化酵素のノックダウンにより、神経分化の昂進が観察され、一方、脱ユビキチン化酵素の強制発現により、神経分化が抑制されることが分かった。以上の結果から、Hes1 タンパク質の翻訳後修飾による安定性制御が、Hes1 のオシレーションや幹細胞分化に重要な役割を持つことが明らかになった。この結果から、Hes1 のオシレーションを制御する細胞内の分子機構の一つを明らかにする事が出来た(投稿中)。

今後、同定された他の因子の解析も行い、その機能と幹細胞分化における Hes1 オシレーション制御について解析を進め、その分化制御機構を明らかにしていく予定である。

#### 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 8 件)

- ① 小林妙子、影山龍一郎、Hes1 regulates embryonic stem cell differentiation by suppressing Notch signaling., Genes to Cells, 査読有、Vol.15、2010、pp.689-698、doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01413.x.
- ② 影山龍一郎、丹羽康隆、下條博美、小林妙子、大塚俊之、Ultradian oscillations in Notch signaling regulate dynamic biological events., Curr. Top. Dev. Biol., 査読有、Vol.92、2010、pp.311-331、doi: 10.1016/S0070-2153(10)92010-3.
- ③ 小林妙子、影山龍一郎、幹細胞分化の運命決定に寄与するリズム現象、医学のあゆみ、査読無、Vol.235、2010、pp.953-954、<http://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiBookDetailNew.aspx?BC=923509>
- ④ 小林妙子、影山龍一郎、Hes1 oscillations contribute to heterogeneous differentiation responses in embryonic stem cells., Genes, 査読有、Vol.2、2011、pp.219-228、doi: 10.3390/genes2010219.
- ⑤ Ueo T, Imayoshi I, Kobayashi T, Ohtsuka T, Seno H, Nakase H, Chiba T, Kageyama R. The role of Hes genes in intestinal development, homeostasis and tumor formation., Development, 査読有、Vol.139、2012、pp.1071-1082、doi: 10.1242/dev.069070
- ⑥ 小林妙子、影山龍一郎、Expression dynamics and functions of Hes genes in development and diseases., Cur. Top. Dev. Biol., 査読有、2014、印刷中
- ⑦ Nagashima F, Suzuki IK, Shitamukai A, Sakaguchi H, Iwashita M, Kobayashi T, Tone S, Toida K, Vanderhaeghen P, Kosodo Y., Novel and robust transplantation reveals the

acquisition of polarized processes by cortical cells derived from mouse and human pluripotent stem cells., Stem Cells Dev., 査読有、2014、印刷中

- ⑧播磨有希子、今吉格、下條博美、小林妙子、影山龍一郎、The roles and mechanism of ultradian oscillatory expression of the mouse Hes genes., Semin. Cell Dev. Biol., 査読有、2014、印刷中、doi: 10.1016/j.semcdb.2014.04.038.

[学会発表] (計 9 件)

- ①小林妙子、振動遺伝子Hes1によるES細胞の分化調節機構、理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理 II」(招待講演)、2010年4月8-9日、独立行政法人理化学研究所・和光
- ②小林妙子、The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of mouse embryonic stem (ES) cells by regulating Notch signaling activation. 第49回日本生体医工学会大会 (招待講演)、2010年6月25-27日、大阪国際交流センター
- ③小林妙子、振動遺伝子Hes1はNotchシグナル制御を介してES細胞の多様な分化応答に寄与する、Neuro 2010 (第33回日本神経科学大会・第53回日本神経科学学会大会・第20回日本神経回路学会大会)、2010年9月2-4日、神戸コンベンションセンター
- ④小林妙子、Hes1 contributes to diverse differentiation responses of ES cells by regulating Notch signaling, "TheNotchMeeting\_2010" - Notch & Stem Cells 2010、2010年10月3-6日、Athens, Greece
- ⑤小林妙子、転写因子Hes1の発現振動によるES細胞の分化調節機構、定量生物学の会 第3回年会 (招待講演)、2010年11月26-28日、東京大学生産技術研究所
- ⑥小林妙子、Hes1はNotchシグナルを抑制してES細胞の分化を制御する。BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会)、2010年12月7-10日、神戸ポートアイランド
- ⑦小林妙子、幹細胞について、臨床検査部会講演会(京都私立病院協会主催)(招待講演)、2011年2月3日、COCON烏丸8階 京都私立病院協会会議室
- ⑧小林妙子、転写因子Hes1の発現振動によるES細胞の分化調節機構、第18回日本時間生物学会シンポジウム「哺乳類の時計と振動原理」(招待講演)、2011年11月25日、名古屋大学 野依記念学術交流会館
- ⑨小林妙子、転写因子Hes1の発現振動によるES細胞の分化調節機構、第8回「生物数学の理論とその応用」Theory of Biomathematics and Its Applications VIII ミニシンポジウム「リズムと生物学」(招待講演)、2011年1月17日、京都大学 数理解析研究所

[図書] (計 1件)

小林妙子、脳科学辞典、Hes ファミリー、2013、<http://bsd.neuroinf.jp/wiki/Hes> ファミリー

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

①ホームページ等

[http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/Kageyama/research\\_stemcell.html](http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/Kageyama/research_stemcell.html)

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/about/y2009/kageyama200908.html>

②アウトリーチ活動

サイエンスカフェ、第15回 iCeMS(京都大学物質-細胞統合システム拠点)カフェ「リズムにのる細胞」  
<http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/j/rsch/scg/2013/08/21-cafe15report.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 妙子 (KOBAYASHI, Taeko)  
京都大学・ウイルス研究所・助教  
研究者番号：40402804