

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24240049

研究課題名(和文) 神経幹細胞の細胞周期制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of cell cycle progression of neural 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) 36,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経幹細胞は、多分化能を持つとともに、活発に増殖する。神経幹細胞においてbHLH型転写因子Hes1の発現が2～3時間周期で振動すること、Hes1依存的にプロニューラル因子Mash1/Ascl1の発現も振動することがわかった。また、Mash1/Ascl1は発現が振動すると神経幹細胞の増殖能を活性化するが、定常発現になると神経幹細胞の分裂を止めてニューロン分化を誘導した。Hes1の発現が持続するとアストロサイトへの分化を誘導した。したがって、Mash1/Ascl1やHes1の発現が振動するか持続するかで、神経幹細胞の細胞周期の進行が活性化されるかどうか制御されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Neural stem cells actively proliferate while giving rise to many cell types. The expression of the bHLH factor Hes1 oscillates with a period of 2-3 hours, and Hes1 oscillation drives the oscillatory expression of the proneural factor Mash1/Ascl1. Mash1/Ascl1 activates the cell cycle progression when its expression oscillates but induces the cell cycle exit and neuronal differentiation when its expression is sustained. Hes1 induces astrocyte differentiation when its expression is sustained. Thus, the oscillatory versus sustained expression of Mash1/Ascl1 and Hes1 regulates the cell cycle progression of neural stem cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：神経幹細胞 細胞周期 Hes1 Mash1/Ascl1 bHLH因子 プロニューラル因子 発現振動 光遺伝学

1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞の自己複製と細胞分化は、bHLH型転写因子によって制御されている。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する Hes1、ニューロン分化を制御する Mash1/Ascl1、オリゴデンドロサイト分化を制御する Olig2 という3種類のbHLH型転写因子が重要な働きを担っていることが知られている。しかし、Hes1 が神経幹細胞の細胞周期を活性化して未分化性を維持したり、アストロサイトへの分化を決定したりするという相反する機能をどのような機序で発揮するのかよくわかっていなかった。また、Mash1 や Olig2 も、ニューロン分化とオリゴデンドロサイト分化以外に、神経幹細胞の増殖・維持を活性化することが知られているが、この相反する機能がどのような機序で発揮されるのか不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、同一因子が神経幹細胞の細胞周期を活性化して増殖を促進したり、細胞周期を抑制して細胞運命決定を促進するという相反する活性を発揮する機序を明らかにすることにした。

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型転写因子の融合たんぱく質が発現するような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。その結果、発現動態の重要性が示唆されたので、光応答性の転写因子である GAVPO のコドンを変化した hGAVPO を用いて、光照射依存的に発現動態を人工的にコントロールできる実験系を開発した。この系を用いて、Mash1/Ascl1 の発現動態を光制御した。

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

ホタルの発光たんぱく質であるルシフェラーゼと Hes1、Mash1/Ascl1、Olig2 の3種類のbHLH型転写因子の融合たんぱく質が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、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。したがって、発現動態の違いで異なる活性が発揮されることが、強く示唆された。

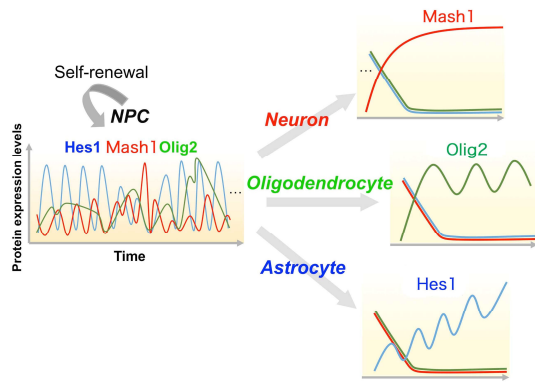


図1: 神経幹細胞(NPC)における bHLH 因子の発現動態。多分化能を持つ神経幹細胞では、3種類のbHLH型運命決定因子 Hes1, Mash1/Ascl1, Olig2 の発現が振動している。一方、細胞分化のときは、選ばれた1種類の因子の発現が持続するが、それ以外の因子の発現は無くなる。

(2) 光遺伝学的遺伝子発現制御による遺伝子発現動態の意義の解明

次に、発現動態の重要性を検証するために、Mash1/Ascl1 に注目して機能解析を行った。そのため、青色光照射で Mash1 の発現を誘導できる hGAVPO システムを作製し、これを Mash1/Ascl1 欠損神経幹細胞に導入した(図2左)。青色光の照射パターンを変えることによって、この神経幹細胞に Mash1/Ascl1 の発現振動や持続発現を誘導することが可能になった。そこで、Mash1/Ascl1 の3時間周期の発現振動を3日間誘導したところ、ニューロンの形成は見られなかったが、神経幹細胞の増殖能が活性化された。Mash1/Ascl1 の発現振動の振幅を強めてもニューロン分化は起こらなかった。また、6時間周期の発現振動を誘導したところ、増殖能の活性化は見られなかった。

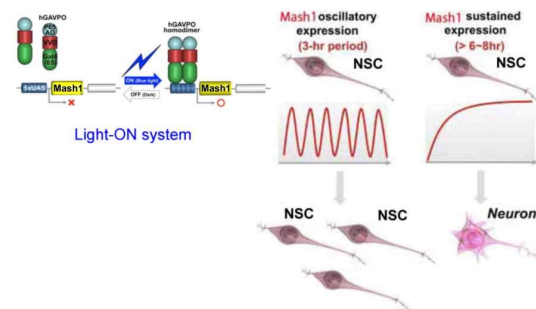


図2: Mash1/Ascl1 の光遺伝学的遺伝子発現制御。(左) hGAVPO は、光応答性ハイブリッドタンパク質 GAVPO のコドンを哺乳動物細胞に最適化したもの。青色光照射によって hGAVPO は活性化され、UAS の下流の遺伝子発現を誘導する。(右) Mash1/Ascl1 の発現動態と機能との関係についてしらべたところ、3時間周期で発現振動すると神経幹細胞の増殖能が活性化されたが、持続発現すると増殖を止めてニューロンに分化した。

一方、Mash1/Ascl1 の持続発現を3日間誘導したところ、細胞周期を離脱して効率よくニューロンに分化した。したがって、振動するか持続するかという発現動態の違いによって、同一因子が神経幹細胞の増殖能を活性化したり、増殖を止めてニューロン分化を決定できることが明らかになった。また、この技術を用いることによって、神経幹細胞の自己複製とニューロン分化誘導を光で制御できることが可能になった。以上から、多分化能および増殖能を持った幹細胞とは、複数の運命決定因子があたかもシーソーのように拮抗しながら発現の増減を繰り返す状態であることが明らかになった(図3)。

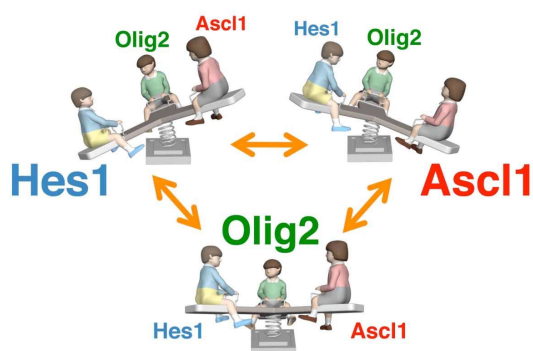


図3:シーソーモデル。多分化能と増殖能を維持した神経幹細胞とは、3種類の分化運命決定因子があたかも3人用シーソーのように拮抗し合っている状態である。

### (3)今後の展望

本研究は、自己複製能と多分化能の両立という神経幹細胞の根幹をなすメカニズムを明らかにした。この幹細胞の中心的な性質は、運命決定に関わる因子が発現振動することによって分かった。ただ、運命決定因子が発現動態の違いで相反する機能を発揮する分子機構は不明で、今後に残された課題である。下流遺伝子のプロモーターの反応性の違いなどが想定される。また、成体脳にも神経幹細胞は存在するが、今回解析した胎児期の神経幹細胞とは異なり、増殖能や分化能は限定的である。運命決定因子の発現動態に差があるのかどうか、今後の解析が待たれる。

Hes1 蛋白質は、神経幹細胞だけではなく、いわゆる万能細胞(ES 細胞・iPS 細胞)や造血幹細胞・皮膚幹細胞などほとんどの幹細胞で発現が確認されていることから、本研究で見出された細胞分化決定因子の周期的な発現(発現振動)による制御機構は、他の種類の幹細胞においても普遍的に使用されているメカニズムであると考えられる。実際、ES 細胞において Hes1 の発現振動が見られていることから、本研究成果は幹細胞研究全体への幅広い波及効果をもたらすことが予想される。また、神経幹細胞の自己複製とニューロン分化誘導を光で制御できる技術は、脳損傷や神経変性疾患に対する再生医療研究に貢献することが期待される。

## 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. 18<sup>th</sup> 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. 5<sup>th</sup> 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 4<sup>th</sup> 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.lif.kyoto-u.ac.jp/j/?post_type=labos&p=4912)

[http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/project/35/35\\_02.html](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 因子のダイナミックな制御」(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： 8 0 2 2 4 3 6 9