

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 4 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830010

研究課題名(和文) 神経発生過程における遺伝子発現動態の解明と神経分化の誘導

研究課題名(英文) Induction of neurogenesis by manipulating gene expression

研究代表者

播磨 有希子(Harima, Yukiko)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・研究員

研究者番号：20712946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経発生は、発達中の胎児脳だけではなく成体脳でも行われているが、その活性は老化とともに低下し、成体脳に存在する神経幹細胞の多くは静止状態にある。海馬に存在する静止状態の神経幹細胞の活性化に成功すれば、記憶形成に関わる神経新生を誘導できる可能性が高い。そこで我々は、海馬における静止状態の神経幹細胞を活性化させ、神経新生を誘導することを目的に研究を行っている。その結果、静止状態の神経幹細胞を活性化できる遺伝子発現の組み合わせが培養細胞レベルで見つかった。現在、マウス成体脳を用いてそれらの結果が再現できるか検証を行っている。

研究成果の概要(英文)：Neurogenesis is occurring not only in the developing fetal brain but also in the adult brain. However, the activity of neurogenesis declines with aging, and many of the neural stem cells present in the adult brain are in the quiescent state. Successful activation of quiescent neural stem cells in the hippocampus is likely to induce neurogenesis associated with memory formation. Therefore, we are studying to activate quiescent state neural stem cells in the hippocampus to induce neurogenesis. As a recent result, we found a combination of gene expressions capable of activating dormant neural stem cell in culture. Currently, we are attempting to show whether these results can be reproduced in the real adult mouse brain.

研究分野：神経発生

キーワード：神経発生 オプトジェネティクス 静止状態の神経幹細胞 活性化

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現のオシレーションとは、生体内で特定の遺伝子発現の ON/OFF が周期的なリズムで繰り返される興味深い現象である。発現がオシレーションすることで知られる bHLH 型転写因子の中で、*Hes* 遺伝子群は発生過程で重要な役割を担うことが分かっている。転写、翻訳後の *Hes* タンパク質は、ネガティブフィードバックにより自らの転写を抑制するが、不安定なためすぐに分解され、再び転写が再開する。このようなメカニズムによって遺伝子発現のオシレーションが繰り返される (図 1)。

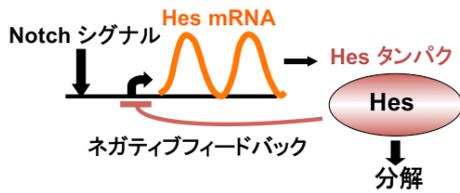


図 1. *Hes* 遺伝子群のオシレーションの模式図

神経発生過程では、神経幹細胞の増殖や神経細胞やグリア細胞への分化のタイミングは、bHLH 型転写因子によって、厳密に制御されている (図 2a)。神経細胞への分化決定に重要な因子として知られる *Mash1* は、神経幹細胞ではオシレーションする *Hes1* によって周期的に抑制され、分化過程の神経前駆細胞では定常発現することが明らかになった (図 2b) [①,②]。

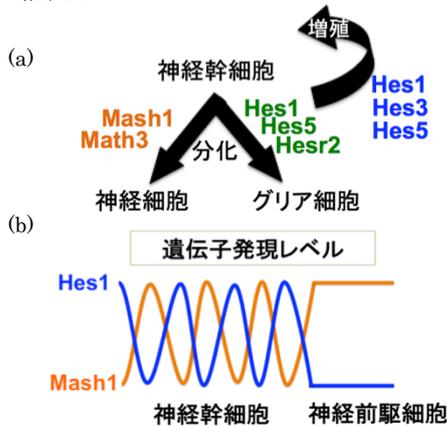


図 2. (a)神経発生過程における神経幹細胞の増殖の維持と分化の模式図 (b)神経幹細胞と神経前駆細胞における *Hes1* と *Mash1* の発現パターン

そして、*Mash1* は細胞周期を活性化させるとともに、細胞周期を止めて神経細胞への分化を促進させるが、このように同一因子が相反する機能を持つ分子機構に関して不明の点が多かった。しかし、我々の研究室で樹立したオプトジェネティクス (光遺伝学) の技術を応用して遺伝子発現パターンを自在に制御した結果、*Mash1* の発現がオシレーションするか、定常発現するかという発現パターンの違いでその機能を変化させることが明

らかになった (図 3) [③]

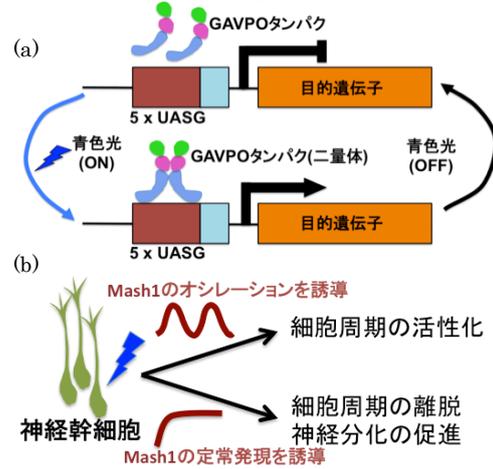


図 3. (a)オプトジェネティクスの技術の概要。青色光の ON/OFF により遺伝子発現のスイッチを切り替えることができる。(b)オプトジェネティクスの技術を応用し、*Mash1* の発現パターンを操作して明らかになった実験結果

2. 研究の目的

神経発生は、発達中の胎児脳だけではなく成体脳でも行われているが、その活性は老化とともに低下し、成体脳に存在する神経幹細胞の多くは静止状態にある (図 4)。海馬に存在する静止状態の神経幹細胞の活性化に成功すれば、記憶形成に関わる神経新生を誘導できる可能性が高い。そこで我々は、海馬における静止状態の神経幹細胞を活性化させ、神経新生を誘導することを目的に研究を行った。具体的には、神経幹細胞の増殖に必要とされる *Hes1* と *Mash1* の発現パターンを静止状態と活性状態の神経幹細胞で観察し、オプトジェネティクスの技術を用いて活性化が可能かどうか検証を行った。この研究の特色は、遺伝子発現の誘導を薬剤ではなくオプトジェネティクスの技術を用いて行う事により ON/OFF の切り替えが素早くできるため、数時間周期での遺伝子発現のオシレーションの誘導が可能である点である。そして、この技術を用いて成体脳の神経発生を亢進させるという手法に本研究のオリジナリティーがある。

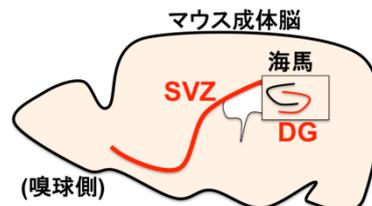


図 4. マウス成体脳の模式図。成体脳では神経幹細胞は SVZ (側脳室下帯) と DG (海馬歯状回) の二箇所に存在し、それらの多くが静止状態にある。

### 3. 研究の方法

まず、培養神経幹細胞を用いて、静止状態と活性状態における Hes1 タンパク質と Mash1 タンパク質の発現パターンの観察を行った。増殖因子 (EGF) 入りの培養液を、BMP 入りの培養液に交換することにより、活性状態の培養神経幹細胞を静止状態へ誘導した。そして、Hes1 や Mash1 タンパク質の発現パターンを観察するため、それぞれのレポーターを持つトランスジェニックマウスから作製した培養神経幹細胞を用いて実験を行った (図 5)。

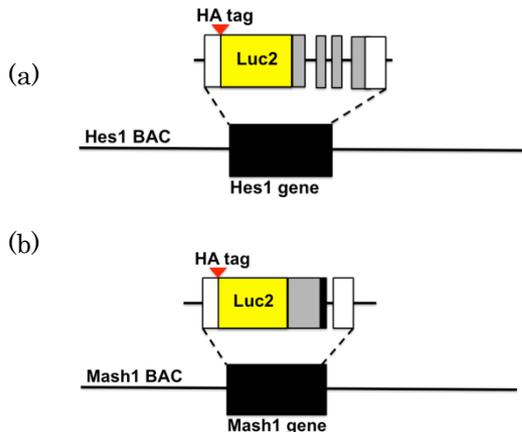


図 5. Hes1 タンパク質(a)と Mash1 タンパク質(b)の発現パターンを観察するために、それぞれの遺伝子の第 1 エキソンの N 末端側にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポーター

Hes1 タンパク質や Mash1 タンパク質の発現量は、それぞれのレポーターの発現によって正確に反映されることが分かったので[3]、静止状態や活性状態の神経幹細胞での発現パターンを、培養神経幹細胞や成体脳スライスを用いて観察を行った。

そして、光誘導システムを搭載したレンチウイルスを作製し、培養神経幹細胞や老齢マウスの海馬領域に感染させ、活性状態の神経幹細胞における Mash1 の発現パターンを光照射により再現することにより、静止状態の神経幹細胞が活性化できるか検証を行っている。



図 6. 光誘導システムを導入したマウス。オプトジェネティクス技術を応用し、老齢マウスに多く存在する静止状態の神経幹細胞の活性化、神経新生の亢進を目指す。

### 4. 研究成果

培養神経幹細胞を用いて、静止状態と活性状態における Hes1 と Mash1 の発現パターンを観察した。その結果、Hes1 の発現は、静止状態の培養神経幹細胞では高いレベルで、活性状態では低いレベルでオシレーションしていることが分かった。また、Mash1 の発現は、活性状態の培養神経幹細胞ではオシレーションしていたが、静止状態では発現レベルが低下し確認できなかった (図 7)。そこで、静止状態の神経幹細胞に Mash1 のオシレーションを誘導したら活性化できるのではないかと考え、検証を行った。

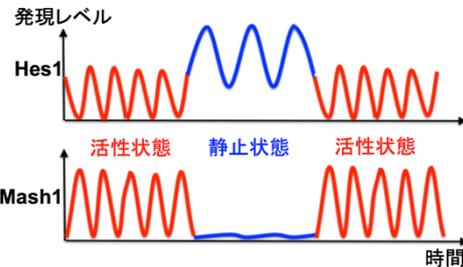
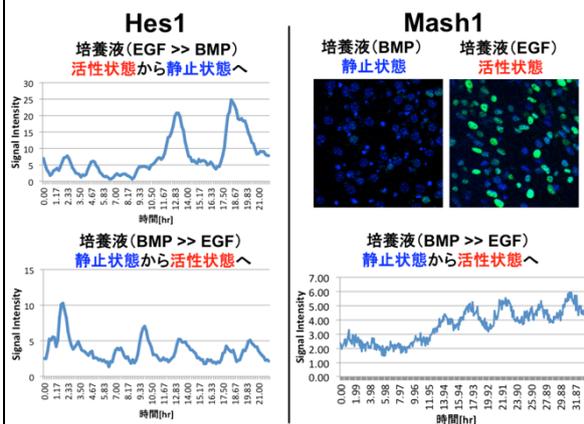


図 7. 培養神経幹細胞における Hes1 タンパク質と Mash1 タンパク質の発現パターン

まず、光照射によって Mash1 タンパク質を誘導するよう改変したレンチウイルスを培養神経幹細胞に感染させ、光照射による Mash1 タンパク質の誘導効率を確認した。その結果、静止状態の培養神経幹細胞での光照射による Mash1 タンパク質の誘導効率は、活性状態に比べて著しく低いことが分かった (図 8a)。そして、この現象には、静止状態の培養神経幹細胞における Mash1 タンパク質の不安定性が関与していることが分かった。そこで、我々は Mash1 タンパク質の安定性に関与する E47 を Mash1 と同時に発現させた。その結果、静止状態の培養神経幹細胞において、光照射による Mash1 タンパク質の誘導効率が増加した (図 8b)。

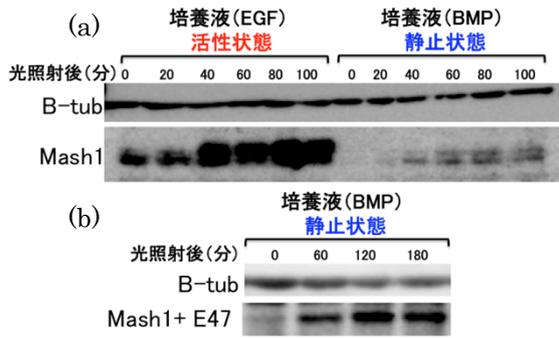


図 8. (a) 活性状態と静止状態の培養神経幹細胞における Mash1 タンパク質の光照射による誘導効率を経時的に観察したもの。(b) 光照射によって Mash1 を E47 と同時に誘導することにより、静止状態の培養神経幹細胞における Mash1 タンパク質の誘導効率が増加した。

さらに、Mash1 タンパク質の発現は、神経幹細胞において 2~3 時間周期でオシレーションするため、光照射を 3 時間毎に行った時の Mash1 タンパク質と mRNA の発現レベルの推移を静止状態の神経幹細胞で調べた。その結果、3 時間周期の光照射により、Mash1 タンパク質の発現は蓄積したが、Mash1 mRNA の発現レベルはオシレーションすることが分かった。さらに、Mash1 の下流因子である Dll1 mRNA の発現がオシレーションしていたことから、3 時間周期の光照射では Mash1 タンパク質の活性もオシレーションすることが分かった (図 9)。

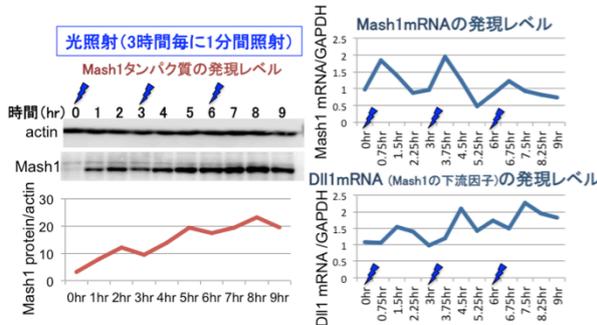


図 9. 光照射を 3 時間周期で行った時の Mash1 タンパク質、Mash1 mRNA、Dll1 mRNA の発現レベルの推移。

そして、Mash1 タンパク質と E47 を周期的な光照射によって数日間誘導することにより、静止状態の培養神経幹細胞を活性化させることに成功した (図 10)。現在、同じシステムを搭載したレンチウイルスを老齢マウスの海馬領域に感染させ、神経幹細胞の活性化や神経新生の亢進が再現できるか検証を行っている。

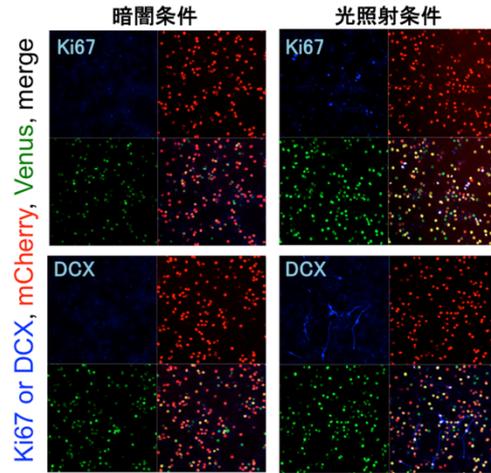


図 10. 静止状態の神経幹細胞において Mash1 と E47 を光照射によって数日間誘導し、確認できた培養神経幹細胞の活性化と神経新生の亢進。Ki67 は活性状態の細胞の指標で、DCX は初期の神経細胞の指標である。mCherry と Venus の二重陽性細胞は、光誘導システムが導入された細胞を示している。

#### <引用文献>

- ① Hirata, H. et al., (2002) *Science* 298, 840-843
- ② Shimojo, H. et al., (2008) *Neuron* 58, 52-64
- ③ Imayoshi, I., Isomura, A. et al., (2013) *Science* 342, 1203-1208

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Shimojo, H., Harima, Y., Kageyama, R. Visualization of Notch signaling oscillation in cells and tissues, *Methods in Molecular Biology*, 査読有, Volume 1187 (2014) 169-179
- ② Harima, Y., Imayoshi, I., Shimojo, H., Kobayashi, T., Kageyama, R., The roles and mechanism of ultradian oscillatory expression of the mouse Hes genes, *Seminars in Cell&Development Biology*, 査読有, Volume34 (2014) 85-90

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

播磨 有希子 (HARIMA, Yukiko)  
 京都大学・ウイルス研究所・研究員  
 研究者番号: 20712946