

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22123004

研究課題名（和文）幹細胞から神経・グリアへの分化機構解明

研究課題名（英文）Mechanisms of neurogenesis and gliogenesis by neural stem cells

研究代表者

島崎 琢也 (Shimazaki, Takuya)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：00324749

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 75,200,000円

研究成果の概要（和文）：神経幹細胞発生における神経・グリア細胞分化のスイッチングの分子機構を解明するために、転写因子であるCoup-TF1/IIの下流および平行して機能している遺伝子の探索を行った。その結果、1) Coup-TF1/IIの下流でその発現が抑制されるmiRNAの1ファミリーであるmiR-17/106が、その機能標的遺伝子の1つであるp38MAP-Kinaseの発現抑制を介して神経・グリア細胞分化のスイッチングに主要な役割を果たしていることを見出した。2) miR-153がグリア分化に必須である転写因子NFIA/Bの発現制御を通して神経幹細胞のグリアへの分化のタイミング制御に寄与していることが明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We have explored novel factors which are integrated in the molecular machinery responsible for neurogenic-to-gliogenic transition of neural stem cells (NSCs) downstream of and in parallel with transcription factors Coup-TF1/II which are triggers of this transition. 1) We identified a miRNA family miR-17/106 as novel key regulators of the transition through downregulation of p38 MAP-Kinase downstream of Coup-TF1/II. 2) We found that the miR-153 mediated fine control of expressions of NFIA/B which are essential for gliogenesis is important in the molecular networks that regulate the timing of gliogenesis by NSCs in the developing CNS.

研究分野：発生生物学

キーワード：神経幹細胞 神経細胞 グリア 分化 転写因子 Coup-TF1/II miRNA p38MAP-kinase

1. 研究開始当初の背景

複雑な精神活動を担う多様な神経細胞を産出するための、中枢神経系の領域化およびそこに付随した特異的な神経細胞分化や神経幹細胞の分化等のメカニズムについては、これまでに非常に多くの情報が蓄積されてきている。その中で、中枢神経系の構築の基盤となる細胞種であり、発生期から成体にいたるまで中枢神経系に存在し続ける神経幹細胞に関する研究は、神経発生の更なる理解だけでなく、中枢神経系の再生医療や薬剤開発への応用が期待されている。しかしながら、最近、神経幹細胞の分化能は発生の進行に伴って変化することが明らかになってきており、例えば、発生初期にだけ生まれる特定の神経細胞種を発生後期あるいは成体神経幹細胞より分化させることは難しい。逆に、グリアへの分化能は発生の進行に伴って獲得して行く。このことは成体に存在する神経幹細胞の利用に限界があることを示唆している。その一方で、このような時系列特異的な変化が神経細胞の多様性形成に寄与しているとも考えられる。しかしながら、このような神経幹細胞分化能の時系列特異的制御に関して、その分子機構については本研究開始時点までほとんど分かっていなかった。その一方で我々は、それまで、神経幹細胞の増殖・分化および長期維持機構に関する研究と、マウス胚性幹細胞(ES細胞)からの *in vitro* での神経発生再構成系の開発を行ってきた。そして、その中で、神経幹細胞の増殖制御における細胞内シグナル伝達機構に時系列特異的な変化が存在することを見出し1)、そのような変化を含めた神経幹細胞の発生を *in vitro* で再構成することのできるES細胞の分化系を構築した2,3)。さらに、このES細胞の分化系を利用して、神経幹細胞の発生の初期と後期で発現の変化する遺伝子群のプロファイリング、および過剰発現とノックダウンによる機能スクリーニングを行い、神経幹細胞の時系列特異的な分化能の変化の制御に関与する転写因子としてオーファン型核内受容体の一種である Coup-TF1/II を同定した3)。Coup-TF1/II は発生初期に特異的な神経細胞のみに分化する初期神経幹細胞が発生後期に特異的な神経細胞およびグリアへも分化できる後期型に移行するのに必須の因子であったのである(図1)。

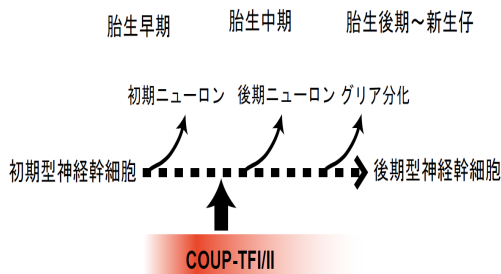


図1. 時系列特異的に制御される神経幹細胞の分化と Coup-TF1/II の役割. 時系列に沿って生まれる様々なニューロンやグリアは中枢神経系の多様性を創出しているが、それには神経幹細胞の時系列特異的な変化が大きく寄与しており、Coup-TF1/II はその進行に必要な因子である

2. 研究の目的

Coup-TF1/II が神経幹細胞発生における神経・グリア細胞分化のスイッチングを含めた時系列特異的な分化能変化の進行に寄与しているが、その分子機構の全体像は未だつかめていなかった。そこで本研究は、下記を目的として開始された。

(1) この Coup-TF1/II の下流で発現が制御されている遺伝子群を DNA マイクロアレイや ChIP-Seq 等の解析により同定し、それらの機能を明らかにすることによって、その制御機構の全容解明に当たる。

(2) Coup-TF1/II と平行して神経幹細胞の時系列特異的な分化能変化に関与していると思われる転写因子群の機能解析を行うとともに、Coup-TF1/II を含めた遺伝子間相互作用を明らかにする。

(3) (1) および (2) の成果も踏まえ、発生初期の幼若な神経幹細胞において、その高い多能性を規定している遺伝子群を、ES細胞分化系を用いた機能スクリーニングにより同定する。

3. 研究の方法

(1) Coup-TF1/II の下流で発現が制御されている機能遺伝子群の同定

マウス ES 細胞分化系を利用した Coup-TF1/II の遺伝子ノックダウン実験と DNA マイクロアレイ解析によって、発生後期のグリアへの分化能を持つ神経幹細胞よりも初期のグリアへの分化能をまだ獲得していない神経幹細胞で発現が有意 (>2 倍) に高く、Coup-TF1/II の下流で発現が抑制される遺伝子群を多数同定し、さらに抗 Coup-TF1/II 抗体を用いた ChIP-Seq 解析により発生初期型の神経幹細胞中で Coup-TF1/II が結合しているゲノム部位も解析するとともに、これらの解析結果を統合し、Coup-TF1/II の標的遺伝子の候補を絞り込み、さらにマウス ES 細胞分化系を用いた機能解析を行った。機能解析はノックダウンおよび強制発現をそれぞれ初期型神経幹細胞および後期型神経幹細胞で行い、それらの時系列特異的なニューロンおよびグリアへの分化能を *in vitro* で検定するスクリーニングをまず行った。このスクリーニングにおいてニューロンおよびグリア分化能に変化を引き起こした遺伝子については、上述のレンチウイルスベクターを用いた機能解析と同様の解析をマウス胎仔脳内へのウイルス注入による *in vivo* 実験によって行った。

(2) 転写因子を中心とした神経幹細胞の時系列特異的な分化能制御機構の解明

神経幹細胞の発生の初期と後期で発現が変化するが、Coup-TF1/II のノックダウンには反応しない遺伝子群のプロファイリングを DNA マイクロアレイ解析により行い、その中で顕著な発現変化を示す遺伝子群に対して、Coup-TF1/II の標的遺伝子候補と同様に ES 細胞分化系を利用した機能スクリーニングを行い、神経幹細胞の時系列特異的分化能変化への関与が示唆されたものに関しては、in vivo での機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) miR-17/106b-p38 系による神経・グリア細胞分化のスイッチング制御

Coup-TF1/II の下流で発現が抑制される遺伝子群を多数同定、機能スクリーニングを行った結果、複数の microRNA (miRNA) が Coup-TF1/II の下流で神経・グリア細胞分化のスイッチングに関与していることを見出した。具体的には、これらの強制発現によって、神経・グリア細胞分化のスイッチングが阻害され、Tough Decoy ベクターシステムを用いた機能阻害によって、初期型神経幹細胞におけるグリアの早期分化が起きた。さらに、これらのうち、同じファミリー miRNA で、共通の標的認識配列を持つ miR-17, 106b に関してはその機能標的遺伝子の 1 つが p38MAP-Kinase であることを見出した。すなわち、p38 を強制発現させると初期型神経幹細胞におけるグリアの早期分化が起き、特異的阻害剤や shRNA による遺伝子ノックダウンによる機能阻害によって、高い神経分化能が維持された。そして驚いたことに、グリアへの分化傾向が極度に高まった後期型神経幹細胞に miR-17 を強制発現させると、初期型のように高い神経分化能を示し、p38 の機能阻害でも同様の表現型が見られた。尚、神経幹細胞における miR-17/106b の発現は発生初期で高く、発生が進むにしたがって低下していくのに対して、p38 のタンパク質レベルはその逆のパターンを示した。これらのことは、Coup-TF1/II の下流で、miR-17/106b-p38 系による制御が神経・グリア細胞分化のスイッチングに主要な役割を果たしていることを示している (図 2)。

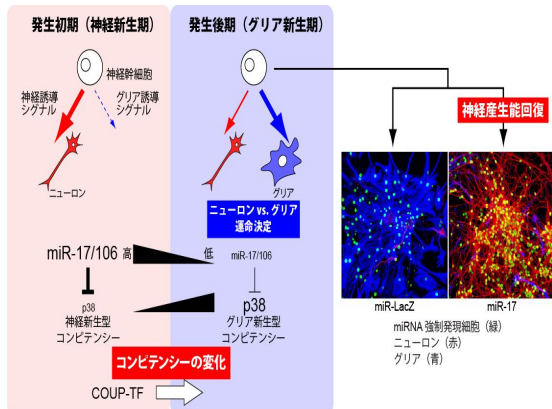


図 2 . miR-17/106b-p38 系による神経幹細胞における神経・グリア細胞分化のスイッチング制御 . miR-17/106 と p38MAP キナーゼの発現量のバランスで、神経幹細胞のコンピテンシーが制御され、神経新生型からグリア新生型へと変遷し、miR-17 の強制発現によって神経産生能が回復する .

(2) miR-153-NFIA/B 系によるグリア分化のタイミング制御

Coup-TF1/II や Coup-TF1/II と平行してグリア分化調節因子として機能する転写因子ファミリーの Nuclear Factor 1 A(NFIA)の下流で神経・グリア細胞分化のスイッチングに関与している遺伝子を探索してきた結果、新たに 3 つのマイクロ RNA (miR-124, 153, および 219) が NSCs における神経・グリア細胞分化のスイッチングに関与していることを見出した。具体的には、これらの強制発現によってマウス ES 細胞由来神経幹細胞のグリア細胞分化へのスイッチングが阻害された。そして、これらのうち miR-153 は、NSCs を含む未分化細胞においては、発生初期の神経新生期で高発現し、成体に至るまで神経新生を活性に行っている外側基底核原基を除くほとんどの中枢神経系の領域で胎生中期以降急激のその発現が低下するが、マウス胎仔大脳皮質に強制発現させると、アストロサイトへの分化が抑制された。続いて、バイオインフォマティクスや DNA マイクロアレイ解析による遺伝子発現プロファイリングによる探索により miR-153 の標的遺伝子候補を絞り込み、そして、それらの 3' UTR のレポーターアッセイおよびマウス ES 細胞分化系を用いた機能解析を行ったところ、NFIA と NFIB を標的としてそれらの発現を抑制することを見出した。さらに、マウス胎仔大脳皮質に強制発現させると NFIA および NFIB タンパク質の発現が低下し、逆に miR-153 に特異的に結合する 2 本鎖の 2' O Methyl RNA を利用した機能阻害を行うと、NFIA および NFIB タンパク質の発現が亢進し、アストロサイト分化が促進された。これらのことから、miR-153 は NFIA/B タンパク質の発現制御を通してグリア分化のタイミング制御に寄与していることが明らかとなった (図 3)。

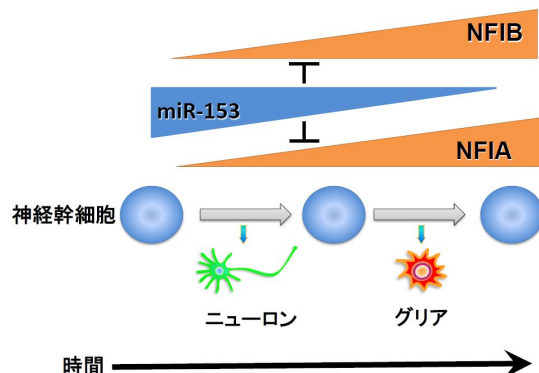


図3 . miR-153-NFIA/B 系によるグリア分化のタイミング制御 . 神経幹細胞のグリアへの分化タイミングには miR-153 による転写因子 NFIA および B の発現制御が寄与している。

以上の発見は、神経幹細胞の発生時期特異的な分化制御機構の理解をさらに深めるものであり、今後これらに機能遺伝子群の上流および下流における制御機構を明らかにすることによって、平行して機能している遺伝子群を含めた制御ネットワークの全容解明につながると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Naka-Kaneda H, Shimazaki T, Okano H. MicroRNA-mediated regulation of the neurogenic-to-gliogenic competence transition of neural stem/progenitor cells. *Neurogenesis* 1, e29542, (2014). DOI: 10.4161/neur.29542. (査読有)

Naka-Kaneda H, Nakamura S, Igarashi M, Aoi, H, Kanki H, Tsuyama J, Tsutsumi S, Aburatani H, Shimazaki T, Okano H. The miR-17/106-p38 axis is a key regulator of the neurogenic-to-gliogenic transition in developing neural stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111, 1604-9 (2014). DOI: 10.1073/pnas.1315567111. (査読有)

Tomioka T, Shimazaki T, Yamauchi T, Oki T, Ohgoh M, Okano H. LIM homeobox 8 (Lhx8) is a key regulator of the cholinergic neuronal function via a tropomyosin receptor kinase A (TrkA)-mediated positive feedback loop. *J Biol Chem* 289, 1000-10 (2014). DOI: 10.1074/jbc.M113.494385. (査読有)

〔学会発表〕(計 8 件)

津山 淳, Jens Bunt, Linda J. Richards, 岩成 宏子, 望月 康弘, 浜窪 隆雄, 島崎 琢也, 岡野 栄之: 神経幹細胞のグリア分化能を制御する発生時期特異的な因子の同定 第 14 回日本再生医療学会総会 2015. 3.19、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

津山 淳, 島崎 琢也, 岡野 栄之: Analysis of the function and searching for downstream of NFIA transcription factor in gliogenesis. 第 36 回日本神経科学大会 2013. 6. 21、国立京都国際会館 (京都府京都市)

Kaneda H, Nakamura S, Shimazaki T, Okano H: Bidirectional Control of Neural Stem Cell Competence. 第 35 回日本分子生物学会

年会 2012.12.14、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

Tsuyama J, Shimazaki T, Okano, H: Role of NFIA Transcription Factor in Gliogenesis. 第 35 回日本分子生物学会年会 2012.12.14、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

Kaneda H, Nakamura S, Shimazaki T, Okano H: Bidirectional Control of Neural Stem Cell Competence. 第 35 回日本神経科学大会 2012.9.19、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

Kaneda H, Nakamura S, Shimazaki T, Okano H: BIDIRECTIONAL CONTROL OF THE COMPETENCE OF MOUSE AND HUMAN NEURAL STEM CELLS. 10th International Society for Stem Cell Research, 2012.6.14, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan

Tsuyama J, Shimazaki T, Okano H: ROLE OF NFIA TRANSCRIPTION FACTOR IN GLIOGENESIS. 10th International Society for Stem Cell Research, 2012.6.13, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan

Kaneda H, Nakamura S, Shimazaki T, Okano H: BIDIRECTIONAL CONTROL OF COMPETENCE IN MOUSE AND HUMAN NEURAL STEM CELLS. 第 10 回幹細胞シンポジウム 2012.5.31、淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市)

〔図書〕(計 1 件)

Shimazaki T. Regulatory mechanisms underlying theneurogenesis-to-gliogenesis switch by neural stem cells. In: Kegeyama R, Yamamori T (eds), *Cortical Development, Neural Diversity and Neocortical Organization* pp63-88, Springer, Tokyo (2013).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
なし

取得状況 (計 0 件)
なし

〔その他〕

<http://www.okano-lab.com/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

島崎 琢也 (SHIMAZAKI, Takuya)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 00324749