

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18362

研究課題名(和文) 成体脳神経幹細胞の性質を制御する分子実体の解明

研究課題名(英文) Analysis of the temporal gene expression changes in neural stem cells during brain maturation and aging

研究代表者

山田 真弓 (Yamada, Mayumi)

京都大学・医学研究科・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、様々なステージの脳神経幹細胞の遺伝子発現プロファイリングを行い、成体脳における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により神経幹細胞を回収し、RNAシーケンスを行った。パスウェイ解析等を行い、神経新生に関与し得る遺伝子を選択した。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において、機能解析を実施中である。将来的に、マウス個体内での機能解析を行なうために、脳内にウイルスインジェクションする実験系等のセットアップも行った。

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 NSCs during brain maturation and aging. I focused on the temporal gene expression changes during brain development and aging of neural stem cells (NSCs). To selectively identify NSCs, I generated GFAP-GFP; Nestin-mCherry double transgenic mouse. I isolated NSCs from the adult SVZ (2-, 6-, 18-month old mice) with fluorescence-activated cell sorting (FACS). I determined gene expression profiles of the isolated NSCs by the RNA-seq 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. In the NSCs derived from the adult brain, many genes related to neurogenesis were down-regulated. 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：神経新生 神経発生 RNAシーケンス 遺伝子発現プロファイリング 海馬歯状回 側脳室周囲 光遺伝学

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系において、神経細胞(ニューロン)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、ヒトを含めた哺乳類の成体脳においても、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、ニューロン新生が継続的に続いていることが分かってきた。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、ヘテロな集団であり、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., 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にしか分化しない。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は知られているが、どのような分子が成体脳神経幹細胞の性質を制御しているのかは、ほとんど明らかになっていない。

bHLH 型の転写因子である *Ascl1* (*Mash1*)、*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 bHLH 型転写因子の発現は振動していることを明らかにした。また、神経幹細胞から分化する際には、この 3 つの bHLH 型転写因子のうち 1 つの発現が優性になることが分かった。さらに、新規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* の持続的な発現はニューロン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., 2013)。

2. 研究の目的

成体脳におけるニューロン新生は記憶・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、成体においてニューロン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、ニューロン新生が高次脳機能に關与していることが明らかになってきた。このように生後発達期から成体期におけるニューロン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幹細胞の性質を制御する因子を明らかにする。さらに、このような解析を通して、成体脳におけるニューロン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) 胎生期から成体期における様々なステージにおいて、神経幹細胞の遺伝子発現プロファイルを行う

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(Tg)マウスを作製し、FACS により脳内の神経幹細胞を採取する。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 シークエンスを行う。それぞれのステージにおける遺伝子発現を比較し、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、選択した遺伝子の発現量や発現場所を調べる。これらの解析を通して、ニューロン新生に関与し得る新規の遺伝子を探索する。

(2) ニューロン新生に関与し得る遺伝子の機能解析

(1) で得られた、ニューロン新生に関与し得る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とき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、新規に開発した光遺伝学的手法も適用する。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を用いて、生体においても機能解析を行う。これらの解析を行うことによって、成体脳におけるニューロン新生のメカニズムを解明する。

(3) 成体脳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続的に観察する

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ニューロン新生が引き起こされる。これまで成体の神経幹細胞が、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、(1) で採取した成体脳の神経幹細胞を培養し、経時的な変化をタイムラプス顕微鏡で観察する。培養した場合、休眠状態から活性状態になるには、2週間程かかることが報告されている。そこで、(1) の解析で得られた候補遺伝子を強制発現させたり、発現抑制した時の変化についても観察する。申請者の所属する研究グループでは、光操作によって遺伝子発現を自在に制御する実験系を確立している。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することがで

き、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) 胎生期から成体期における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の解析

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 Tg マウス)の作製を行なった。FACSを用いて、成体脳の側脳室周囲の細胞から、GFP かつ mCherry 陽性細胞を回収した。同様に、胎児脳からも神経幹細胞を回収した。成体脳のサンプルでは、目的の細胞集団は、全体のわずか 1%程度しか存在していなかった。さらに、加齢に伴い神経幹細胞の数は劇的に減少するため、大量の Tg マウスが必要となった。そのため、数匹の Tg マウスを用いて、数十から数百個の神経幹細胞から cDNA を合成するプロトコルの確立を行なった。その結果、わずか数匹の Tg マウスを用いることによって、RNA シークエンスに必要なサンプルを準備することができた。

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用いて、RNA シークエンスを行った。これら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のリストを作成した。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、どのような遺伝子の発現が変動しているのかを網羅的に調べた。また、既存のデータベースや文献と比較して、ニューロン新生に関与し得る遺伝子の絞り込みを行った。さらに、ニューロン新生との関連は報告されていないが、発生・発達・加齢に伴って、大きく発現変動する遺伝子についても調べたところ、脂質代謝等に関する遺伝子が多く抽出された。

bHLH 型転写因子 *Ascl1* は培養神経幹細胞

だけではなく、胎児脳や成体脳においても、神経発生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、Ingenuity などを用いて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 シークエンスを行ったので、遺伝子発現プロファイル解析中である。

(2) ニューロン新生に関与し得る遺伝子の機能解析

(1) で抽出した遺伝子について、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、ニューロン新生への影響を観察するために実験系を確立中である。さらに、生体内での機能解析も行なうために、脳内にウイルスインジェクションする実験系や遺伝子発現の光制御システムのセットアップを行なった。脳内にインジェクションするウイルスの精製度が低いと、ニューロン新生に影響を与えることが分かった。そこで、精製度が高く、かつ、高タイトルのウイルスを作製するため、条件検討を行なった。ほぼプロトコールが確立されつつある。

また、申請者の所属する研究グループでこれまで用いてきた光作動性システムには、暗所においてリーク発現が見られるなどの欠点があった。そこで、新規の光作動性システムの開発を行なった。酵母などで報告されている光作動性モジュールを哺乳類細胞において最適化するため、大規模なスクリーニングを行なった。その結果、既存の光作動性システムと比較して、暗所でのバックグラウンド活性はるかに低く、また、遺伝子発現の光誘導の最大値も大幅に増加するものを作

製することに成功した。

今後は、遺伝子発現プロファイル解析で得られたニューロン新生に関与し得る遺伝子について、ウイルスや光作動性システムを用いて、機能解析を行う予定である。

特に、Ascl1 の下流因子は、Ascl1 と同様に振動発現している可能性が高いため、新規の光作動性システムを用いて、人工的に発現パターンを制御し、機能解析を行う予定である。

(3) 成体脳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

(1) で FACS により得られた、成体脳側脳室周囲の神経幹細胞を培養した。成体脳の神経幹細胞は大部分が休眠状態にあるため、培養には数週間の時間を要したが、凍結ストックを作製することができた。しかし、この神経幹細胞を解析に必要な量まで増やすには時間がかかるため、以下の予備実験を行なった。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。

今後は、胎児脳由来、あるいは、成体脳由来の神経幹細胞に、遺伝子発現プロファイル解析で選んだニューロン新生に関与し得る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する。

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 0 件)

[学会発表](計 6 件)

Yamada M; Novel optical tools for manipulating gene expressions in neural stem cell
第 11 回神経発生討論会にて講演、2018 年 3 月 17-18 日、金沢大学

山田真弓、今吉格

New Optical Tools for Manipulating Gene Expressions in Neural Stem Cells

第 9 回光操作研究会(2017)にて講演

山田真弓、今吉格

遺伝子発現の光操作技術と幹細胞研究への応用、第 8 回光操作研究会(2016)にて講演

山田真弓、今吉格

生後脳海馬ニューロン新生の異常と発達障害の関与について (Impairment of the hippocampal postnatal neurogenesis and its involvement in the neurodevelopmental disorder)
Neuro2016 シンポジウムにて講演

Yamada, M. and Imayoshi, I.

Dynamic regulation of Olig2 expression in oligodendrocyte differentiation

ISDN 2016, May 11-14th, 2016

Yamada, M. and Imayoshi, I.

Dynamic regulation of Olig2 expression in oligodendrocyte differentiation

XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, July 15-18th, 2015

〔図書〕(計 4 件)

山田真弓、今吉格

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、「細胞」6月号 50 (7), 2018 p.4-7『特集 幹細胞の恒常性維持とその破綻：幹細胞研究の最前線』

山田真弓、今吉格

遺伝子発現の光制御「Clinical Neuroscience」36 巻 8 号「光が開く神経科学の未来 オプト

ジェネティクスと光イメージング」

Imayoshi I, **Yamada M** and Suzuki Y

Regulatory mechanism of neural progenitor cells revealed by optical manipulation of gene expressions, Uehara-Zaidan proceedings, Springer, 2018, 印刷中

Yamada, M. and Hoshino, M.

Anatomy and histology of the cerebellum; Pre-cerebellar nuclei

Essentials of cerebellum and cerebellar disorders, Springer, 63-67, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<https://brainnetworks.jimdofree.com>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山田 真弓 (YAMADA, Mayumi)

京都大学・大学院生命科学研究科・特定助
教

研究者番号： 5 0 5 8 3 4 5 7