

平成22年5月14日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005 ～ 2009

課題番号：17024027

研究課題名（和文） 2時間を刻む生物時計による神経分化制御

研究課題名（英文） Regulation of neurogenesis by two-hour cycle biological clock

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

研究成果の概要(和文):胎児神経幹細胞では Hes1 の発現は約2時間周期でオシレーションし、Hes1 によって周期的に抑制されるためプロニューラル遺伝子 Ngn2 や Notch リガンド Dll1 の発現もオシレーションした。Dll1 オシレーションによって Notch シグナルが相互に活性化されて神経幹細胞が維持された。一方、Hes1 の発現が無くなると、Ngn2 の発現が持続してニューロンに分化した。成体脳でも神経幹細胞からのニューロン新生が必須で、神経幹細胞は Notch-Hes 経路によって維持された。以上から、胎児および成体神経幹細胞制御におけるリズム遺伝子 Hes1 の重要性が明らかになった。

研究成果の概要(英文): In embryonic neural stem cells, Hes1 expression oscillates with a period of about two hours, and Hes1 oscillations drive oscillatory expression of the proneural gene Ngn2 and the Notch ligand Dll1. Dll1 oscillations lead to mutual activation of Notch signaling and maintenance of neural stem cells. When Hes1 expression disappears, Ngn2 is expressed in a sustained manner, thereby promoting neuronal differentiation. In the adult brain, neurogenesis from neural stem cells is essential, and neural stem cells are maintained by the Notch-Hes pathway. These results revealed the significance of the rhythmic gene Hes1 in regulation of embryonic and adult neural stem cells.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	27,400,000	0	27,400,000
2006年度	27,200,000	0	27,200,000
2007年度	25,900,000	0	25,900,000
2008年度	20,800,000	0	20,800,000
2009年度	22,200,000	0	22,200,000
総計	123,500,000	0	123,500,000

研究分野：神経発生生物学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：神経幹細胞、Hes1、Notch シグナル、オシレーション、プロニューラル遺伝子、短周期遺伝子発現リズム、ニューロン新生、成体脳

## 1. 研究開始当初の背景

神経幹/前駆細胞は、発生初期には対称分裂を繰り返して増殖するが、やがて非対称分

裂によって多くの種類のニューロンを産生し、最後にグリア細胞に分化する。このように、神経幹/前駆細胞は、発生の進行とともに

に徐々に分化能を変えていく。したがって、正しい数の多様な種類の細胞を生み出すには、神経幹/前駆細胞を最後まで維持し続けることが重要である。我々は、神経幹/前駆細胞の維持に Notch-Hes シグナルが必須な役割を担うことを明らかにしてきた。Mash1 や Neurogenin2 (Ngn2) などのプロニューラル遺伝子が働くと神経幹/前駆細胞はニューロンに分化する (図 1)。プロニューラル遺伝子は、Delta1 のような Notch リガンドの発現を誘導し、隣接細胞の Notch シグナルを活性化する。Notch シグナルが活性化されると、Notch の細胞内ドメイン (NICD) が切り出され、核に移行して RBPj と複合体を形成する。NICD-RBPj 複合体は、Hes1 や Hes5 といった転写抑制因子の発現を誘導する。Hes1 や Hes5 は、プロニューラル遺伝子の発現を抑制するため、Notch シグナルが活性化された細胞はニューロンに分化できず、神経幹/前駆細胞に止まる (図 1)。すなわち、ニューロンに分化しつつある細胞は、Notch シグナルを介して隣接細胞のニューロン分化を抑制する (側方抑制)。しかし、Hes1 や Hes5 を欠損すると、Notch シグナルが活性化されてもプロニューラル遺伝子の発現が抑制されず、すべての細胞がニューロンに分化する。その結果、神経幹/前駆細胞が枯渇し、細胞数の著しい減少や後から産生される種類の細胞欠損が起こる。このように、胎児脳では、Notch-Hes シグナルを介して神経幹/前駆細胞の維持とニューロンへの分化のバランスが保たれ、脳形成がうまくコントロールされている。

神経幹/前駆細胞の維持に重要な役割を担う Hes1 の発現は一定ではなく、細胞間でばらついていた。また、以前、我々は、Hes1 の発現は多くの種類の細胞において約 2 時間周期で増減を繰り返す (オシレーション) ことを見出していた。この発現オシレーションは、ネガティブフィードバックで起こる。すなわち、Hes1 プロモーターが活性化されると転写抑制因子である Hes1 蛋白量が増加するが、Hes1 蛋白はプロニューラル遺伝子だけでなく、自分自身のプロモーターにも直接結合して発現を抑制する (図 2)。Hes1 mRNA および Hes1 蛋白ともに非常に不安定なため、新たな発現が抑制されると両者はすぐに分解されて無くなる。Hes1 蛋白が無くなると、抑制が解除されて、また新たな合成が始まる。このように、Hes1 はネガティブフィードバックを介して自律的に発現がオシレーションする (図 2)。神経幹/前駆細胞で Hes1 の発現がばらついていることから、これらの細胞でも Hes1 の発現がオシレーションしているのではないかと考えられた。Notch-Hes シグナル系の活性は今まで考えられてきたよりもっとダイナミックに変動することが示唆され、このシグナル系の発現動態の解明が、

神経幹/前駆細胞の維持の分子機構の理解に繋がることが期待された。

## 2. 研究の目的

上記の側方抑制経路は、Notch シグナルを活性化して神経幹/前駆細胞を維持するには、隣に Notch リガンドを発現する分化途中のニューロンが必要であることを示唆している。しかし、ニューロン分化が起こる前の発生の初期には、神経幹/前駆細胞のみが増殖し続けている。このような発生初期には、どのような分子機構で、神経幹/前駆細胞が維持されているのであろうか? 実は、ニューロン分化が起こる前の発生の初期でも、Hes1、Notch リガンド、およびプロニューラル遺伝子が salt-and-pepper 状に発現していることから、Notch シグナルが働いていることが示唆される (図 3)。すなわち、神経幹/前駆細胞においても、プロニューラル遺伝子が Notch リガンドの発現を誘導し、Notch シグナルを活性化していると考えられた。それでは、なぜ発生初期には、プロニューラル遺伝子はニューロン分化を引き起こせないのだろうか? 本研究では、これらの疑問に答えるべく解析を行った。

## 3. 研究の方法

神経幹/前駆細胞における Hes1 の発現動態を明らかにするために、リアルタイム・イメージング・システムを開発した。Hes1 は非常に不安定なため、ユビキチン化して不安定にしたルシフェラーゼをレポーターとして用いた。Hes1 プロモーターにユビキチン化ルシフェラーゼをつないだベクターをもつトランスジェニックマウスを作製し、神経幹/前駆細胞の分散培養や胎児脳のスライス培養を行い、超高感度 CCD カメラで発光を測定した。また、神経幹細胞における Notch シグナルの役割を明らかにするために、コンディショナル・ノックアウトマウスを作製した。

## 4. 研究成果

### (1) 神経幹/前駆細胞における発現オシレーション

Notch シグナル系はダイナミックな発現変動を示す (図 1-3)。Notch シグナル分子である Hes1 の発現をリアルタイム・イメージングによって解析したところ、神経幹/前駆細胞では 2-3 時間周期でオシレーションすることが明らかになった。マウス胎児脳組織切片を作製して免疫染色や in situ hybridization による発現解析を行ったところ、プロニューラル遺伝子 Ngn2 や Notch リガンド Delta1 の発現量が高い細胞では Hes1 の発現量は低く、逆に Ngn2 や Delta1 の発現量が低い細胞では Hes1 の発現量は高かった。すなわち、Ngn2 や Delta1 の発現量は Hes1 と

は逆の関係であった。Hes1 の発現はオシレーションするため、Ngn2 や Delta1 の発現も逆位相でオシレーションすることが示唆された。そこで、Ngn2 や Delta1 のプロモーターにユビキチン化ルシフェラーゼをつないだレポーターを作製して発現をリアルタイムで測定したところ、次のような2種類の発現パターンがあることがわかった。神経幹/前駆細胞では Ngn2 や Delta1 の発現はオシレーションしていたが、ニューロンに分化しつつある細胞では Ngn2 や Delta1 の発現は持続していた (図4)。Hes1 は、Ngn2 や Delta1 のプロモーターに直接作用して発現を抑制することから、Hes1 の発現がオシレーションする神経幹/前駆細胞では、Ngn2 や Delta1 の発現が Hes1 によって周期的に抑制されて逆の位相でオシレーションすると考えられた。一方、Hes1 の発現が無くなってニューロンに分化しつつある細胞では、Hes1 の抑制を受けないため Ngn2 や Delta1 の発現は持続すると考えられた。

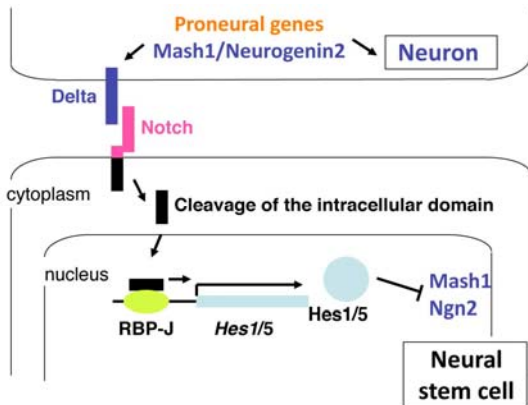


図1: Notch-Hes シグナルを介した側方抑制。

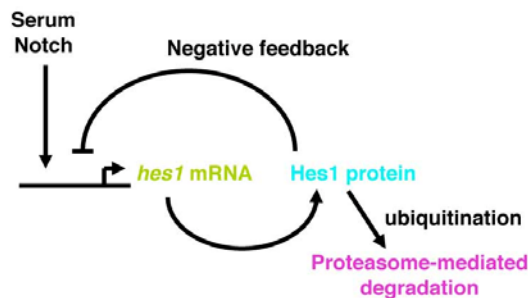


図2: ネガティブフィードバックによる Hes1 の発現オシレーション。

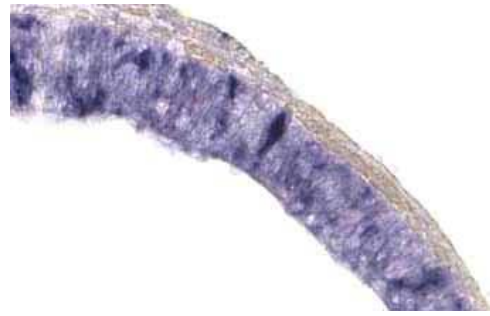


図3: 胎生 9.5 日マウス背側終脳における Delta1 の発現。神経幹/前駆細胞に salt-and-pepper 状に発現している。

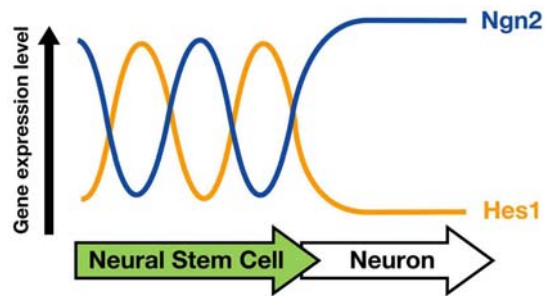


図4: 神経幹/前駆細胞と分化しつつあるニューロンにおける Hes1 と Ngn2 の発現動態。

Ngn2 はニューロン分化を決定・促進するが、多くの下流遺伝子の発現がオンになるのに時間がかかるため、Ngn2 の発現が2-3時間周期でオシレーションしているときは、それらの下流遺伝子はオンにならないようであった。Ngn2 の発現が持続すると初めてすべての下流遺伝子の発現がオンになり、ニューロン分化が始まると考えられた。Ngn2 の発現が2-3時間周期でオシレーションしているときは、Delta1 のように素早く反応する遺伝子が選択的にオンになっているようであった。Delta1 の発現オシレーションによって、神経幹/前駆細胞はお互いに Notch シグナルを活性化しあって未分化性を維持すると考えられた。したがって、Ngn2 は発現動態の違いによって、まったく異なる現象を引き起こすことが示唆された。すなわち、Ngn2 の発現がオシレーションすると神経幹/前駆細胞の維持に働き、持続するとニューロン分化に働くと考えられた。

発生初期には、神経幹/前駆細胞では Hes1 オシレーションによって Ngn2 や Delta1 の発現がオシレーションし、集団全体で Notch シグナルを活性化しあって未分化状態を維持しているらしい。発生初期に Ngn2 や Delta1 が salt-and-pepper 状に発現していることはよく知られているが、陽性細胞がいち早くニューロン分化を開始すると信じられてきた。しかし、我々の結果から、salt-and-pepper

状の発現は単に発現オシレーションの一瞬間を見ているだけで、陽性細胞は次の瞬間に陰性に、逆に陰性の細胞は陽性になること、したがって陽性の細胞も陰性の細胞も等価であって、陽性の細胞がいち早くニューロン分化を開始するわけではないことが強く示唆された。これは、側方抑制に関して、今までの考え方をまったく変えるものである。

## (2) 境界領域におけるHes1の持続発現

神経管は、境界構造によっていくつものコンパートメントに区切られる。一般に、細胞は境界構造を越えて遊走しないので、それぞれのコンパートメントは一つのユニットとして発生する。コンパートメント内の神経幹/前駆細胞は盛んに増殖してニューロンを産生するのに対して、境界構造を構成する細胞はあまり増殖せず、一般にニューロンを産生しない。発現解析をしたところ、コンパートメント内の神経幹/前駆細胞ではHes1の発現がオシレーションするが、境界領域の細胞はHes1を持続発現することがわかった。

Hes1の発現動態の違いがコンパートメントと境界の細胞の性質の差に関係しているのかどうかをしらべるために、コンパートメント由来の神経幹/前駆細胞にHes1を持続発現させてみた。その結果、これらの細胞はニューロンに分化しなくなり、また増殖も遅くなった。逆に、Hes1や関連遺伝子を欠損させたマウスをしらべたところ、境界領域の細胞がニューロンに分化した。したがって、Hes1の持続発現が境界領域の細胞の維持に重要な役割をもつことが明らかになった。

次に、線維芽細胞を用いて、Hes1の発現をオシレーションさせたり持続させたりする制御機構を探った。Stat3はリン酸化されると活性型になり、Socs3等の下流遺伝子の発現を誘導する。Socs3は脱リン酸化酵素で、リン酸化Stat3を不活性型に変える。このネガティブフィードバックの結果、リン酸化Stat3とSocs3の量が逆位相でオシレーションすることがわかった。さらに、リン酸化Stat3はHes1蛋白の不安定性にも関わっており、Stat3-Socs3経路が抑制されるとHes1蛋白が安定になり、持続発現するようになった。同様に、神経幹/前駆細胞でStat3-Socs3経路を抑制すると、Hes1の発現がオシレーションしなくなった。これらの結果から、Stat3-Socs3経路によってオシレーションするか持続するかというHes1の発現動態が制御されることが示された。境界領域でStat3-Socs3経路が抑制されているかどうかはよくわかっておらず、今後の課題である。

## (3) 成体脳の神経幹細胞におけるNotch-Hesシグナル

成体脳にも神経幹細胞があり、新生したニ

ューロンは高次脳機能に重要な役割を担う。成体脳の神経幹細胞でコンディショナルにNotch-Hesシグナルを欠損させると、神経幹細胞が枯渇し、ニューロン新生が起こらなくなった。したがって、成体脳の神経幹細胞の維持にNotch-Hesシグナルが必須な役割を担うことが示された。成体脳の神経幹細胞は、胎児の神経幹/前駆細胞と比較して増殖やニューロン産生能が低い。また、予備的な実験から、成体脳の神経幹細胞ではHes1の発現が持続することが示唆された。今後、リアルタイムイメージングを行って、成体脳の神経幹細胞におけるHes1の発現動態を明らかにする必要がある。

今回、単に遺伝子が発現しているかどうかだけでなく、遺伝子発現動態の違いによって細胞の性質が大きく変わることが明らかになった。今後、他の遺伝子についても発現動態を解析する必要がある。また、神経幹/前駆細胞は経時的に分化能が変化することが知られているが、その分子機構はよくわかっていない。このような経時的变化にHes1やNgn2の発現オシレーションの関与が示唆されるので、今後、この可能性についても解析する必要がある。

## 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60件)

- ①. Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K., and Kageyama, R. (2010) Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in the developing and adult brains. **J. Neurosci.** 30, 3489-3498. 査読有
- ②. Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H., and Imayoshi, I. (2009) Dynamic regulation of Notch signaling in neural progenitor cells. **Curr. Opin. Cell Biol.** 21, 733-740. 査読有
- ③. Kobayashi, T., Mizuno, H., Imayoshi, I., Furusawa, C., Shirahige, K., and Kageyama, R. (2009) The cyclic gene *Hes1* contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. **Genes & Dev.** 23, 1870-1875. 査読有
- ④. Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H., and Imayoshi, I. (2008) Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition. **Nature Neurosci.** 11, 1247-1251. 査読有
- ⑤. Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M.,

- Mori, K., Ikeda, T., Itoharu, S., and Kageyama, R. (2008) Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. **Nature Neurosci.** 11, 1153-1161. 査読有
- ⑥. Imayoshi, I., Shimogori, T., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2008) Hes genes and neurogenin regulate non-neural versus neural fate specification in the dorsal telencephalic midline. **Development** 135, 2531-2541. 査読有
- ⑦. Nakayama, K., Satoh, T., Igari, A., Kageyama, R., and Nishida, E. (2008) FGF induces oscillations of Hes1 expression and Ras/ERK activation. **Curr. Biol.** 18, R332-R334. 査読有
- ⑧. Shimojo, H., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2008) Oscillations in Notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. **Neuron** 58, 52-64. 査読有
- ⑨. Kageyama, R., Yoshiura, S., Masamizu, Y., and Niwa, Y. (2007) Ultradian oscillators in somite segmentation and other biological events. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, Vol. LXXII, 451-457. 査読無
- ⑩. Niwa, Y., Masamizu, Y., Liu, T., Nakayama, R., Deng, C.-X., and Kageyama, R. (2007) The initiation and propagation of Hes7 oscillation are cooperatively regulated by Fgf and Notch signaling in the somite segmentation clock. **Dev. Cell** 13, 298-304. 査読有
- ⑪. Yoshiura, S., Ohtsuka, T., Takenaka, Y., Nagahara, H., Yoshikawa, K., and Kageyama, R. (2007) Ultradian oscillations in Stat, Smad and Hes1 expression in response to serum. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104, 11292-11297. 査読有
- ⑫. Kageyama, R., Ohtsuka, T., and Kobayashi, T. (2007) The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. **Development** 134, 1243-1251. 査読有
- ⑬. Liu, A., Li, J., Marin-Husstege, M., Kageyama, R., Fan, Y., Gelinas, C., and Casaccia-Bonnel, P. (2006) A molecular insight of Hes5-dependent inhibition of myelin gene expression: old partners and new players. **EMBO J.** 25, 4833-4842. 査読有
- ⑭. Zhu, X., Zhang, J., Tollkuhn, J., Ohsawa, R., Bresnick, E.H., Guillemot, F., Kageyama, R., and Rosenfeld, M.G. (2006) Sustained Notch signaling in progenitors is required for sequential emergence of distinct cell lineages during organogenesis. **Genes & Dev.** 20, 2739-2753. 査読有
- ⑮. Baek, J.H., Hatakeyama, J., Sakamoto, S., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2006) Persistent and high levels of Hes1 expression regulate boundary formation in the developing central nervous system. **Development** 133, 2467-2476. 査読有
- ⑯. Imayoshi, I., Ohtsuka, T., Metzger, D., Chambon, P., and Kageyama, R. (2006) Temporal regulation of Cre recombinase activity in neural stem cells. **Genesis** 44, 233-238. 査読有
- ⑰. Masamizu, Y., Ohtsuka, T., Takashima, Y., Nagahara, H., Takenaka, Y., Yoshikawa, K., Okamura, H., and Kageyama, R. (2006) Real-time imaging of the somite segmentation clock: revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cell. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 103, 1313-1318. 査読有
- ⑱. Ohtsuka, T., Imayoshi, I., Shimojo, H., Nishi, E., Kageyama, R., and McConnell, S.K. (2006) Visualization of embryonic neural stem cells using Hes promoters in transgenic mice. **Mol. Cell. Neurosci.** 31, 109-122. 査読有
- ⑲. Ohsawa, R., Ohtsuka, T. and Kageyama, R. (2005) *Mash1* and *Math3* are required for development of branchiomotor neurons and maintenance of neural progenitors. **J. Neurosci.** 25, 5857-5865. 査読有
- ⑳. Paquin, A., Barnabé-Heider, F., Kageyama, R., and Miller, F.D. (2005) C/EBP phosphorylation biases multipotent cortical precursors to generate neurons rather than astrocytes in vivo. **J. Neurosci.** 25, 10747-10758. 査読有
- [学会発表] (計 115 件)
- ①. Kageyama, R.: The role of Hes1 oscillations in regulation of stem/progenitor cells. The Notch Meeting. Athens, Greece, Sept 27-Oct 1, 2009.
- ②. Kageyama, R.: Ultradian oscillators in somite segmentation and other biological events. Symposium on Developmental Biology. London, UK, June 17-19, 2009.
- ③. Kageyama, R.: The role of Hes1 in proliferation and differentiation of neural stem cells. EMBO Workshop/ 5<sup>th</sup> International Symposium on bHLH transcription factors. London, UK, May 7-8, 2009.
- ④. Kageyama, R.: Ultradian oscillators in

somite segmentation and other biological events. 8<sup>th</sup> International Conference on Information Processing in Cells and Tissues. Ascona, Switzerland, April 5-9, 2009.

- ⑤. Kageyama, R.: Oscillations in Notch signaling regulate proliferation and differentiation of neural progenitor cells. 9<sup>th</sup> International Congress on Cell Biology. Seoul, Korea, Oct 7-10, 2008.
- ⑥. Kageyama, R.: Oscillations in Notch signaling regulate maintenance of neural progenitor cells. 18<sup>th</sup> International Congress of Eye Research. Beijing, China, Sept 24-29, 2008.
- ⑦. Kageyama, R.: Oscillations in Notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. 2<sup>nd</sup> International Congress on Stem Cells and Tissue Formation. Dresden, Germany, July 6-9, 2008.
- ⑧. Kageyama, R.: The role of Hes1 in brain development. The Notch Meeting. Athens, Greece, Sept 23-27, 2007.
- ⑨. Kageyama, R.: The mechanism of ultradian oscillations in the somite segmentation and other events. 72<sup>nd</sup> Cold Spring Harbor Symposium. Cold Spring Harbor, USA, May 30-June 4, 2007
- ⑩. Kageyama, R.: Ultradian clocks that regulate somite segmentation and other events. Joint Spring Meeting of the Genetics Society, the British Society for Developmental Biology and the British Society of Cell Biology. Edinburgh, UK, March 29-April 1, 2007.
- ⑪. Kageyama, R.: Roles of bHLH genes in neural development. 16<sup>th</sup> Biennial Meeting of the International Society of Developmental Neuroscience. Banff, Canada, Aug. 24-28, 2006.
- ⑫. Kageyama, R.: Roles of *Hes* bHLH genes in neural development. 7th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry. Singapore, July 2-5, 2006.
- ⑬. Kageyama, R.: Roles of *Hes* genes in neural development. Cortical Development. Santorini, Greece, May 12-15, 2005.
- ⑭. Kageyama, R.: Roles of *Hes* genes in neural development. 3<sup>rd</sup> International Symposium on Basic Helix-Loop-Helix Genes. Rome, Italy, May 9-10, 2005.

[図書] (計 5 件)

- ①. Kageyama, R., Niwa, Y., and Shimojo, H. (2010) Developmental timing and oscillating gene expression. **McGraw-Hill 2010 YearBook of Science & Technology**,

pp102-104.

- ②. Niwa, Y., Shimojo, H., and Kageyama, R. (2009) Ultradian oscillation networks in somite segmentation and other biological events. In **Systems Biology** (Eds, S. Nakanishi, R. Kageyama, and D. Watanabe) Springer, pp. 199-207.
- ③. Kageyama, R., Ohtsuka, T., and Hatakeyama, J. (2006) Roles of Hes bHLH factors in neural development. In *Transcription Factors in the Nervous System* (Ed. G. Thiel). Wiley-VCH Verlag, Weinheim. pp3-22.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 多能性幹細胞からの神経細胞の分化誘導方法

発明者 : 影山 龍一郎、小林 妙子

権利者 : 国立大学法人京都大学

種類 : 特許

番号 : 特願 2009-168045

出願年月日 : 2009 年 7 月 16 日

国内外の別 : 国内

○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

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/Kageyama/index.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし