

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02449

研究課題名（和文）遺伝子発現の光操作技術を用いた神経幹細胞の制御機構の解析

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of neural stem cells revealed by optical manipulation of gene expressions

研究代表者

今吉 格（Imayoshi, Itaru）

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：60543296

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝子発現の光操作システムについて、改良を実施した。具体的には、低分子化合物 Dox と青色光によって遺伝子発現誘導活性を制御できる、PA-Tet システムの開発に成功した。PA-Tet システムを利用して、神経幹細胞における遺伝子発現を操作し、休眠状態からの活性化やニューロン分化における分子メカニズムの解析を実施し、その一旦を明らかにした。加えて、PA-Tet システムを利用して、マウス成体脳における神経幹細胞の光操作が可能であることを実証した。これにより、Ascl1 や Hes1 の発現動態のダイナミックな変化が、神経幹細胞の制御において重要な役割を担っていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が独自に開発した遺伝子発現の光操作システムを用いることで、神経幹細胞において、遺伝子発現を光操作することが可能になった。それにより、Ascl1 や Hes1 などの転写因子や、Notch シグナルエフェクターのダイナミックな発現変化が、神経幹細胞の分化制御に与える影響を明らかにすることができた。加えて、光操作の手法を適応することで、マウス脳内に存在する神経幹細胞の光コントロールが可能であることを実証した。これらの成果は、脳神経系の再生医療技術の発展に貢献するものであると考えられる。

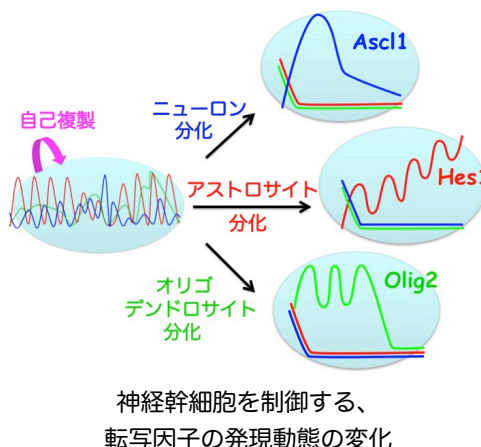
研究成果の概要（英文）：We have succeeded in optimizing PA-Tet gene expression system. The gene expression control activity of PA-Tet can be regulated by Dox and blue light. By using PA-Tet system, we manipulated gene expression in neural stem cells and analyzed the molecular mechanism underlying processes in activation from quiescent state and neuronal differentiation. In addition, we showed neural stem cells in the adult mouse brain can also be controlled by light with the developed PA-Tet gene expression system. From these achievements, we showed that the dynamic gene expression changes in Ascl1 and Hes1 are critically important for regulations of neural stem cells.

研究分野：神経発生学

キーワード：神経幹細胞 ニューロン新生 光遺伝学 転写因子

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の脳神経系は、ニューロンやグリア細胞が複雑かつ精緻なネットワーク構造を形成し、高次脳機能を制御している。そのためには、発生・発達期において、神経幹細胞から、ニューロンやグリア細胞が秩序立って産生される必要がある。また、神経幹細胞は成体脳にも存在し、ニューロンを新生することで、様々な脳機能の維持や最適化に関与していることが明らかになっている。このように神経幹細胞は、発生・発達期だけでなく、成体脳においても、細胞分裂・細胞分化・休眠状態が厳密に制御されている必要があると考えられる。しかしながら、これらの神経幹細胞制御の分子メカニズムについては、未だ不明な点が多かった。我々は、神経幹細胞の維持や分化運命決定を決定的に制御する bHLH 型転写因子に着目して研究を行ってきた。その中で、bHLH 型転写因子の振動発現に着目し、それらのタンパク質変動を単一細胞レベルで可視化できる実験系を構築し、また、それらの発現動態を光を用いて人工的に操作する実験系を確立し、転写因子のダイナミックな発現振動の意義を明らかにしてきた。



2. 研究の目的

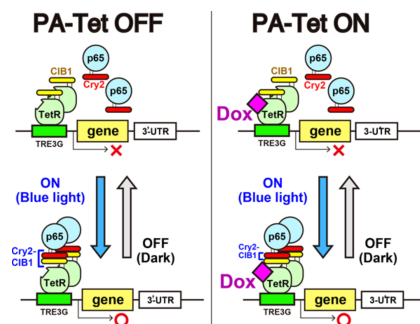
本課題では、転写制御因子や細胞シグナル経路の、ダイナミックな発現や活性化状態の変化に着目し、それらの挙動をリアルタイムイメージング技術によって可視化するとともに、我々が開発してきた遺伝子発現の光操作技術を用いて人工的に摂動を加えることで、検証実験を行う。また、培養神経幹細胞だけでなく、発生期胎児脳や、成体脳に存在する内在性の神経幹細胞のイメージングや光操作を行うことで、神経幹細胞を制御する転写因子ネットワークの解明を目指す。

3. 研究の方法

これらの研究を進めるにあたり、遺伝子発現の光制御技術の改良・充実を行った。新規に開発した光制御技術も積極的に取り入れ、転写因子や細胞シグナル経路のダイナミックな制御が、どのように協調的に制御され再現性の良い脳発生が実現するのかについて検証をおこなった。また、細胞機能の光制御技術を、成体脳神経幹細胞やニューロン新生の研究にも適応し、様々な介入実験を含む構成的アプローチを用いて、成体脳が持つ可塑的性質の新たな側面を明らかにすることに取り組んだ。

4. 研究成果

神経幹細胞における遺伝子発現の光操作をより厳密に実施するために、Photo-Activatable (PA)-Tet システムの改良を行い、神経幹細胞の休眠状態からの活性化・細胞増殖・ニューロン分化・グリア細胞分化などを光でコントロールする手法を開発した。また、この手法を成体マウス脳・海馬に存在する神経幹細胞に適応し、内在性の神経幹細胞を活性化し、ニューロン新生を誘導できることを示した。また、将来的な再生医療実現に繋げるために、より生体深部への透過性の優れた近赤外光を用いた遺伝子発現の光制御技術を開発した。さらに、培養神経幹細胞だけでなく、脳オルガノイド等の立体組織中に存在する神経幹細胞に対して、選択的にパターン光を照射し、遺伝子発現や細胞分化運命決定を人為的に制御するための光学技術を開発した。また、本課題で構築した手法によって光操作した神経幹細胞に対して、次世代シーケンサーを用いて、遺伝子発現プロファイリングを行なった。現在シーケンスタータの詳細解析を行なっているが、光操作の対象としている遺伝子 (Ascl1 等) と相乗的に機能すると考えられるエピゲノム修飾因子を同定することができ、神経幹細胞の分化制御機構の理解の深化につなげたいと考えている。

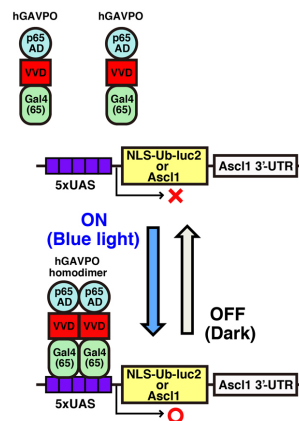


PA-Tet システムによる遺伝子発現の光制御

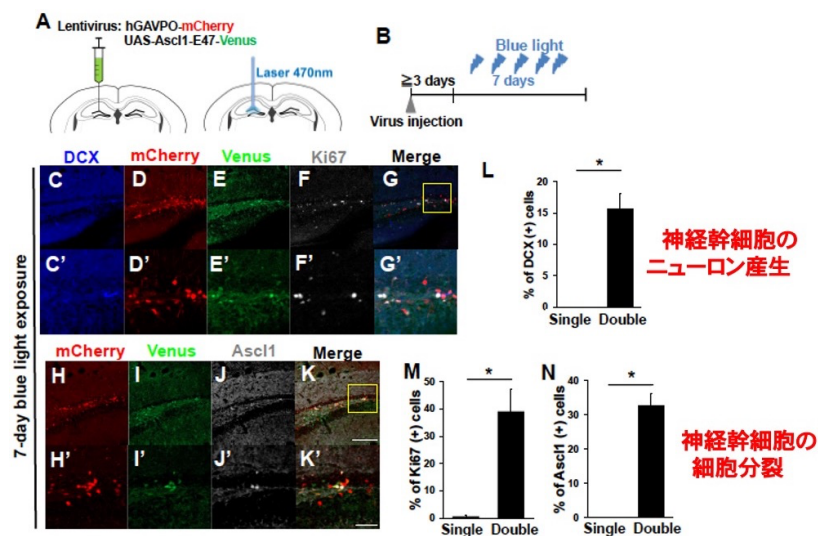
また、PA-Tet システムは、青色光に加えて、低分子化合物 Dox によるコントロールも可能であるので、より厳密な遺伝子発現のコントロールが可能である。したがって、本課題の遂行には、主として PA-Tet システムを使用しているが、平行して、PA-Gal4/UAS システムを構成する光駆動性の Gal4 転写因子の改良に成功し (PA-Gal4cc)、神経幹細胞での遺伝子発現の光制御に適応可能なことを示し、論文発表を行った。

遺伝子発現の光操作手法を用いることで、神経幹細胞からグリア細胞の分化制御メカニズムの解析が可能になると考えられた。具体的には、オリゴデンドロサイトの分化制御を担う転写因子 *Olig1/2* を、PA-Tet システムを用いて光操作できる神経幹細胞株を樹立した。これらの細胞株では、*Olig1/2* の遺伝子発現動態を、光操作できることを確認した。また、並行してライブイメージング解析した結果、*Olig1/2* の遺伝子発現は、神経幹細胞からオリゴデンドロサイトへの分化過程において、様々な特徴的な変化を示すことが明らかになった。現在、この過程を光操作によって模倣する再構成実験をおこなっており、*Olig1/2* の発現動態のどのような変化が、神経幹細胞の分化制御において、重要な役割を担っているのかについて、詳細な解析を行なっている。

また、遺伝子発現の光操作システムを、内在性の神経幹細胞に導入し、光ファイバー等を用いて光照射を行い、成体動物の脳内で神経幹細胞の人為的操作を試みた。光駆動性の Gal4/UAS システムを、レンチウイルスベクターを用いて成体マウスの海馬の神経幹細胞に導入し、*in vivo* におけるニューロン分化誘導が可能であるか、検証を行った。



光駆動性の Gal4/UAS システム



(A,B) *Ascl1* の光操作システムを、マウス成体脳・海馬の神経幹細胞に導入し、光ファイバーを介して、光照射を行なった。その結果、休眠状態の神経幹細胞の細胞増殖の活性化(M,N)と、ニューロン新生の誘導(L)が確認された。

この検証により、転写因子 *Ascl1* を成体脳の神経幹細胞で光操作することで、ニューロン新生を誘導できることが示された。本成果については、論文発表を行った。今後は、本課題で開発した PA-Tet を導入した神経幹細胞株をモデル動物脳に移植し、光コントロールすることでニューロン新生を誘導し、脳機能ネットワークへの組み込みや改善に寄与し得るのかについて、検証を進めていきたいと考えている。

上述したように、発生期の脳においては、それらの特定の領域(空間的な位置)や、発生ステージ(時間)において、必要なセルタイプのみが、選択的に幹細胞から産生される。例えば、脳の背側からは興奮性ニューロンが産生され、腹側からは抑制性ニューロンが産生される。また、脳の背側の大脳皮質領域においては、初期はニューロンが産生され、後期にはグリア細胞が産生される。このような、脳の特定の領域や発生ステージにおける選択的な細胞の分化には、パターンニング因子やホメオボックス遺伝子による制御に加えて、エピゲノム修飾による制御が重要な働きを担っていることが知られている。本課題で実施した研究から、このエピゲノム修飾による遺伝子発現の変化は、*Ascl1* や *Hes1* などの分化運命決定因子の振動発現の振幅の大きさを決めるメカニズムであるという仮説を考えるに至っている。例えば、ニューロンを活発に産生しているステージでは、ニューロン分化とグリア分化を制御する分化運命決定因子は、どちらも振動発現を

示しているが、グリア分化決定因子の振幅は抑えられており、ニューロン分化決定因子の振幅は大きくなるように調整されており、これらの変化は、分化運命決定因子の発現調節領域のエピゲノム修飾によって決定されているという仮説を今後検証する計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sueda, R., *Imayoshi, I. (equal contribution), Harima, Y., and *Kageyama, R.	4. 巻 33
2. 論文標題 High Hes1 expression and resultant Ascl1 suppression regulate quiescent versus active neural stem cells in the adult mouse brain.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes Dev	6. 最初と最後の頁 511-523
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/gad.323196.118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 *Imayoshi, I., Tabuchi, S., Matsumoto, M., Kitano, S., Miyachi, H., *Kageyama, R. and Yamanaka, A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Light-induced silencing of neural activity in Rosa26 knock-in and BAC transgenic mice conditionally expressing the microbial halorhodopsin eNpHR3.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 3191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-59984-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi, T., Piao, W., Takamura, T., Kori, H., Miyachi, H., Kitano, S., Iwamoto, Y., Yamada, M., Imayoshi, I., Shioda, S., Ballabio, A. and Kageyama, R.	4. 巻 10
2. 論文標題 Enhanced lysosomal degradation maintains the quiescent state of neural stem cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 5446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-13203-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamada, M., Nagasaki, C.S., Ozawa, T. and *Imayoshi, I.	4. 巻 152
2. 論文標題 Light-mediated control of gene expression in mammalian cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurosci Res.	6. 最初と最後の頁 66-77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2019.12.018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Mayumi, Suzuki Yusuke, Nagasaki Shinji C., Okuno Hiroyuki, Imayoshi Itaru	4. 巻 25
2. 論文標題 Light Control of the Tet Gene Expression System in Mammalian Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 487 ~ 500.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.09.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada, M., Nagasaki, C.S., Suzuki, Y., Hirano, Y. and *Imayoshi, I.	4. 巻 23
2. 論文標題 Optimization of light-inducible Gal4/UAS gene expression system in mammalian cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci. 2020.101506	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 今吉 格
2. 発表標題 神経幹細胞の制御機構 と生後脳ニューロン新生
3. 学会等名 第 2 1 回 京都大学・生命科学研究科シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 今吉 格
2. 発表標題 遺伝子発現の光操作技術 と神経幹細胞研究への応用
3. 学会等名 Chemistry For Neuroscience 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 今吉 格
2. 発表標題 Regulatory mechanism of neural stem cells revealed by optical manipulation of gene expressions
3. 学会等名 ExCELLS若手リトリート（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 今吉 格
2. 発表標題 Regulatory mechanism of neural stem cells revealed by optical manipulation of gene expressions
3. 学会等名 第17回幹細胞シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 今吉 格
2. 発表標題 Regulatory mechanism of neural stem cells revealed by optical manipulation of gene expressions
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 今吉 格
2. 発表標題 Regulatory mechanism of neural stem cells revealed by optical manipulation of gene expressions
3. 学会等名 第11回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 今吉 格
2. 発表標題 Toward understanding and manipulation of neural bases underlying animal behaviors and psychiatric diseases
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 今吉 格
2. 発表標題 発生発達期暴露による嗅球神経新生影響～毒性評価としての嗅球利用を探る～
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
デンマーク	Novo Nordisk Foundation	University of Copenhagen	