

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20610001

研究課題名 (和文) 神経幹細胞の多能性維持・脱分化機構の解明

研究課題名 (英文) Analysis of the molecular mechanisms regulating the maintenance of multipotency and the dedifferentiation of neural stem cells

研究代表者 大塚 俊之 (OHTSUKA TOSHIYUKI)  
京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：20324709

## 研究成果の概要 (和文)：

胎生期の神経幹細胞を Hes1 プロモーター:EGFP により可視化したトランスジェニックマウスを用いて、脳の異なる発生段階 (幹細胞増殖期、深層ニューロン産生期、浅層ニューロン産生期、グリア産生期) 及び脳の異なる領域 (胎生 11 日齢) の GFP 陽性幹細胞を FACS により回収し、マイクロアレイを用いた Gene Expression Profiling を行い、各発生段階特異的及び脳領域特異的な遺伝子発現を網羅的に探索し、各ステージにおいて著明な増減を示す遺伝子や終脳前後部において異なる発現を示す遺伝子 (転写因子) を多数同定した。

これら候補遺伝子の機能を解析をするため、In Utero Electroporation 法による強制発現実験を行い、いくつかの遺伝子において神経幹細胞からのニューロン分化或いは遊走を抑制する活性が確認された。また、これらの遺伝子の siRNA を用いたノックダウン実験を行い、Tcf3 及び Klf15 のノックアウトにおいて、神経幹細胞からニューロンへの分化促進を認め、これらの転写因子が各発生段階において神経幹細胞の維持に重要な機能を果たしていることを明らかにした。

## 研究成果の概要 (英文)：

To shed light on the temporal and regional differences of embryonic neural stem cells, we sorted the green fluorescent protein (GFP)-positive neural stem cells from the telencephalon of pHes1-d2EGFP transgenic mouse embryos at different developmental stages, and from different regions of the telencephalon of the transgenic mice at embryonic day 11.5, and performed gene expression profiling. Among dozens of transcription factors differentially expressed by cells in the ventricular zone during the course of development, several of them exhibited the activity to inhibit neuronal differentiation when overexpressed. Furthermore, knock-down of *Tcf3* or *Klf15* led to accelerated neuronal differentiation, suggesting that these transcription factors play critical roles in the maintenance of neural stem cells at early and late embryonic stages, respectively.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成 21 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 22 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：幹細胞医・生物学

キーワード：発生・分化、脳・神経、神経科学、再生医学、幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

脳の発生過程においては、神経幹細胞から厳密に制御されたタイミングでまず皮質深層のニューロンが産生され、続いて皮質浅層のニューロン、最後にグリアが産生される。この神経幹細胞の性質変化のタイミングは細胞系譜の決定とともに、細胞数の決定（増殖）に重要で、脳の形態形成に決定的な影響を与える。また、哺乳動物の脳新皮質は各機能領域に分けられ、皮質の各層も特異的な機能を持つことにより複雑な高次脳機能が営まれている。

このように神経幹細胞は時間的・空間的に刻々と性質を変えて様々な細胞を産み出し、これが細胞の多様性、機能の多様性の源となり、脳の複雑な形態形成を制御している。細胞移植実験により、発生初期の幹細胞は皮質深層及び浅層のニューロンを産み出すポテンシャルがあるが、発生後期の幹細胞は徐々にポテンシャルを失い、浅層のニューロンしか産生できなくなると報告されている。この失われたポテンシャルを回復させ、多分化能を再獲得（脱分化）できれば、より幅広い細胞系譜への分化能を有した幹細胞が得られ、任意のニューロン・グリア産生が可能となり、再生移植医療において非常に重要な発展に繋がる。

こうした神経幹細胞の性質の継時的変化には、転写因子や細胞外因子に対する受容体の発現変化などが想定されており、分子レベルで一部明らかになっているが、これまで神経幹細胞のマーキング及び分離回収が困難であったため、網羅的に解析することが困難であった。

## 2. 研究の目的

脳の発生過程においては、神経幹細胞から厳密に制御されたタイミングでまず皮質深層のニューロンが産生され、続いて皮質浅層のニューロン、最後にグリアが産生される。この神経幹細胞の性質変化のタイミングは、細胞系譜や細胞数を規定する上で重要で、脳の形態形成に決定的な影響を与える。

また、哺乳動物の脳新皮質は各機能領域に分けられ、皮質の各層も特異的な機能を持つことにより複雑な高次脳機能が営まれている。

このように神経幹細胞は時間的・空間的に刻々と性質を変えて様々な細胞を産み出し、

これが細胞の多様性、機能の多様性の源となり、脳の複雑な形態形成を制御している。

神経幹細胞は発生過程において徐々にポテンシャルを失うことが知られているが、この失われていくポテンシャルを回復させ多分化能を再獲得（脱分化）できれば、より幅広い細胞系譜への分化能を有した幹細胞が得られ、任意のニューロン・グリア産生が可能となり、再生移植医療において非常に重要な発展に繋がる。

本研究では、胎生期の神経幹細胞を可視化したトランスジェニックマウスを用いて神経幹細胞を選択的に回収し、マイクロアレイを用いた Gene Expression Profiling を行うことにより、脳の発生過程における神経幹細胞の性質（ポテンシャル）の変化を明らかにし、その変化を制御する分子の特定を行う。また、失われたポテンシャルの再獲得によって、より多能性を有したナイーブな幹細胞への脱分化を誘導する手法の開発を目的とする。更に、層特異性及び領域特異性の形成に関わる分子メカニズムを解明し、神経幹細胞から任意の（層特異的・領域特異的）ニューロン・グリアの産生を試みる。

こうした研究から得られた知見を基に、神経幹細胞における遺伝子発現を操作することによって、幹細胞の多能性維持・再獲得と特異的細胞への分化誘導を任意にコントロールすることにより、実際の神経再生医療への応用に繋げる研究を進める。

## 3. 研究の方法

胎生期の神経幹細胞を Hes1 プロモーター:EGFP により可視化したトランスジェニックマウスの終脳から GFP 陽性幹細胞を FACS により回収し、マイクロアレイを用いた Gene Expression Profiling により、各発生段階及び脳の領域特異的な遺伝子発現の網羅的解析を行う。これにより脳の発生過程における神経幹細胞の性質変化の実態を明らかにし、対称分裂から非対称分裂への移行やニューロン・グリア分化に関わる遺伝子の特定を進める。

それらの遺伝子の強制発現やロックダウン等により発現を操作することで、発生初期段階の神経幹細胞の持つ多分化能の再獲得（脱分化）を試みる。また、各種遺伝子を組み合わせ発現操作することにより、皮質深層ニューロン産生時期、浅層ニューロン産生時期、グリア産生時期に相当する神経幹細胞

を創出し、任意の<領域特異的>ニューロン・グリア産生を目指す。

更に領域特異性を規定する遺伝子を明らかにし、その発現を操作することで、任意の<領域特異的>ニューロン・グリア産生を目指す。

再生医療への応用に向け、In Utero Electroporation 等による遺伝子発現操作（強制発現・ノックダウン等）、細胞移植実験、遺伝子改変マウスの作製等により、in vivo での解析を行う。

#### 4. 研究成果

胎生期の神経幹細胞を Hes1 プロモーター:EGFP により可視化したトランスジェニックマウスを用いて、脳の異なる発生段階（幹細胞増殖期、深層ニューロン産生期、浅層ニューロン産生期、グリア産生期）及び脳の異なる領域（胎生 11 日齢）の GFP 陽性幹細胞を FACS により回収し、マイクロアレイを用いた Gene Expression Profiling を行い、各発生段階特異的及び脳領域特異的な遺伝子発現を網羅的に探索し、各ステージにおいて著明な増減を示す遺伝子や終脳前後部において異なる発現を示す遺伝子（転写因子）を多数同定した。

これらの遺伝子（転写因子）の発現パターンを in situ hybridization により解析し、実際に神経幹細胞が存在する脳室周囲帯に発現を認める遺伝子を絞り込んだ。

こうして得られた候補遺伝子の機能を解析するため、In Utero Electroporation 法による強制発現実験を行い、いくつかの遺伝子において神経幹細胞からのニューロン分化或いは遊走を抑制する活性が確認された。また、これらの遺伝子の siRNA を用いたノックダウン実験を行い、Tcf3 及び Klf15 のノックアウトにおいて、神経幹細胞からニューロンへの分化促進を認め、これらの転写因子が各発生段階において神経幹細胞の維持に重要な機能を果たしていることを明らかにした。

#### 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 12 件）

- ① 高嶋良樹、大塚俊之、Aitor Gonzalez、他 2 名、イントロン遅延は体節時計の周期的遺伝子発現に必須である、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108: 3300-3305, 2011、査読有

- ② 影山龍一郎、大塚俊之、下條博美、今吉格、神経前駆細胞における Notch シグナルのダイナミックな発現及び側方抑制の新所見、Nature Neuroscience 11: 1247-1251, 2008、査読有
- ③ 今吉格、坂本雅行、大塚俊之、他 7 名、成体マウス前脳の構造的及び機能的統合性維持における継続的ニューロン新生の役割、Nature Neuroscience 11: 1153-1161, 2008、査読有
- ④ 中村隆宏、大塚俊之、他 7 名、Hes1 が角膜発生及び角膜上皮幹細胞／前駆細胞の機能を制御する、Stem Cells 26: 1265-1274, 2008、査読有
- ⑤ 下條博美、大塚俊之、影山龍一郎、Notch シグナルのオシレーションが神経前駆細胞の維持を制御する、Neuron 58: 52-64, 2008、査読有

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① 大塚俊之、大脳新皮質発生における神経幹細胞の遺伝子発現プロファイリング、第 17 回東アジア医科学シンポジウム、台北、台湾、2010 年 7 月 1 日

〔図書〕（計 0 件）

〔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

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 俊之 (OHTSUKA TOSHIYUKI)  
京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：20324709

(2)研究分担者：なし  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者：なし  
( )

研究者番号：