

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21700357

研究課題名（和文） COUP-TF I 及び I I を標的とした神経幹細胞の時間特異性制御機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms underlying COUP-TF1/II-mediated temporal identity transition of neural stem cells

研究代表者

金田 勇人 (KANEDA HAYATO)

独立行政法人理化学研究所・免疫転写制御研究グループ・上級研究員

研究者番号：40528212

研究成果の概要（和文）：

COUP-TFs 下流遺伝子の同定とその機能解析から神経幹細胞の competence 変化による神経新生からグリア新生へのスイッチの主要な分子メカニズムを解明することができた。さらに、その制御によって神経幹細胞の分化ではなく分化能を bidirectional に制御することができるまでになり、ドラッグスクリーニングなどを想定した神経幹細胞の応用的利用の点でも重要な成果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

I succeeded in identification of the downstream effector of COUP-TFs and elucidation of the major molecular mechanisms underlying the neurogenic-to-gliogenic transition of developing neural stem cells. Furthermore, control of the effector enabled us to control the neural stem cell competence bi-directionally, neurogenic or gliogenic. These findings will greatly contribute to the clinical applications of neural stem cells for the treatment of CNS injury and disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：グリア、再生医学、時間特異性、神経幹細胞、神経発生、神経科学、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

神経ネットワークの形成には神経幹細胞から時期・領域特異的に適切な神経系細胞が生み出されることが重要である。しかし、発生の進行とともに神経幹細胞の性質が変化していくメカニズムは不明であった。我々は

独自開発した神経幹細胞培養法を用いてスクリーニングを行い、鍵となる分子として COUP-TF1/II の同定に成功した(Naka H, *Nature Neuroscience*, 2008)。COUP-TF1/II をノックダウンすると通常グリアを主に分化する発生後期型神経幹細胞になる期間培

養・継代を続けても、神経を作り続けるようになった (図 1)。

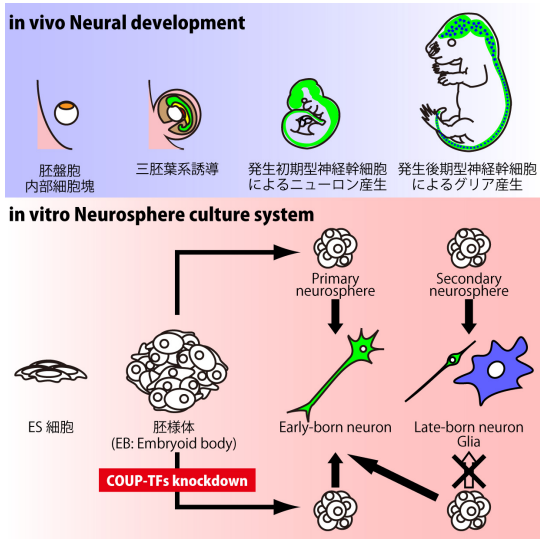


図 1 ES 細胞から神経幹細胞を誘導することで、生体の神経発生を模倣することができる改良 Neurosphere 法と COUP-TFI/II のノックダウンによる神経新生の継続

特筆すべきこととして、COUP-TFs は直接神経・グリア分化を制御しておらず、外部シグナル因子への応答性の変化についての制御に関与していることが分かった。これを“Competence の変化”と呼び、新しい制御メカニズムの存在を示したが、その分子の実体およびメカニズムは未解明であった (図 2)。

従来考えられてきた細胞運命を規定する転写因子の連続的発現モデル

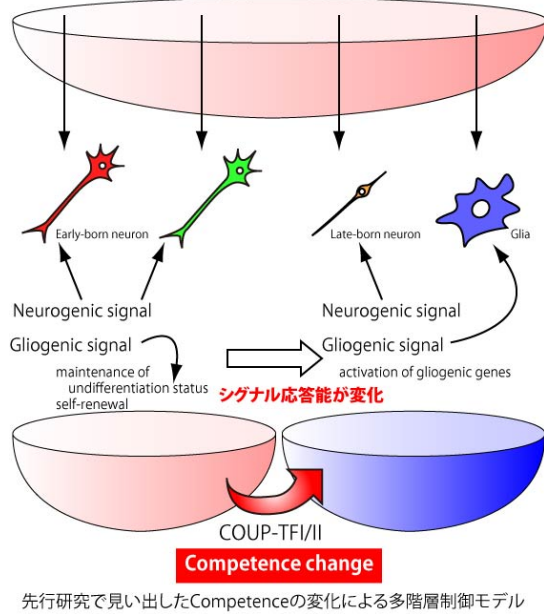


図 2 “Competence の変化”を組み込んだ新しい神経発生の分子メカニズムのモデル

2. 研究の目的

COUP-TFs を手掛かりとして、Competence の変化の分子メカニズムを解明し、神経幹細胞の時間特異性の制御機構を明らかにすること。

3. 研究の方法

先行研究で開発した改良 Neurosphere 法と実績のあるレンチウイルスベクターによる機能的スクリーニング法で、COUP-TFs 下流遺伝子を同定し、その機能解析を行うことで神経幹細胞の時間特異性の制御機構を明らかにする。

4. 研究成果

まず、マイクロアレイ解析で得られた候補遺伝子群をスクリーニングして下流遺伝子の同定に成功した。この下流遺伝子の機能解析を *in vitro*、*in vivo* 両面から行い、一連の実験からこの遺伝子が神経幹細胞の Neurogenic competence の分子実体であり、その抑制によって Gliogenic competence が獲得されることが明らかとなった。特筆すべきは、この遺伝子を強制発現させることによって発生段階が進んで Gliogenic となった神経幹細胞でさえ Neurogenic competence を回復させ、高効率に神経分化を誘導できるようになることができたことである (図 3)。

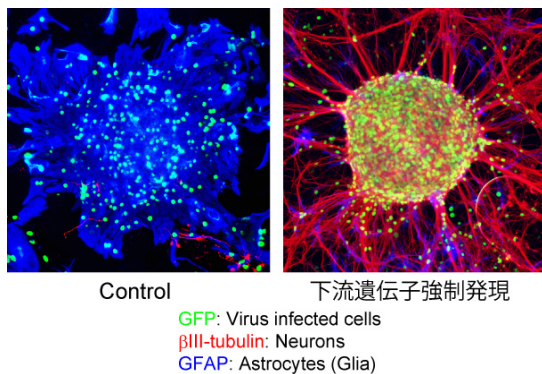


図 3 同定した COUP-TF 下流遺伝子の強制発現による神経分化能の回復

また、この遺伝子の発現制御による神経幹細胞の分化能制御において、GFAP の promoter 領域の DNA メチル化頻度に有意な変化が見られなかったことも興味深い。さらに、ヒト胎児脳由来神経幹細胞を用いて Competence の制御機構が進化的に保存されたメカニズムであるか確認を行ったところ、制御に関与する因子に多少違いはあるものの、Competence の変化自体はヒト神経幹細胞においても同様に働いており、Competence を制御することによってマウスの時と同様に神経分化能を回復させることができた (図 4)。

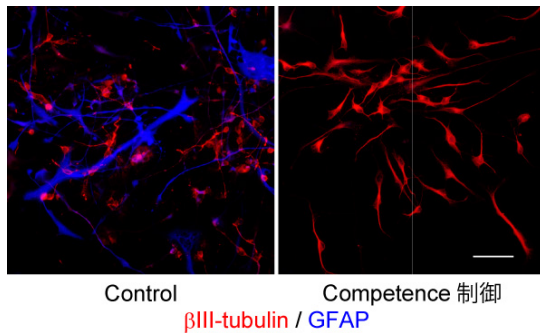


図 4 Competence 制御によるヒト胎児脳由来神経幹細胞における神経分化能の回復

3年間の研究を通して、COUP-TFs 下流遺伝子の同定とその機能解析から神経幹細胞の competence 変化による神経新生からグリア新生へのスイッチの主要な分子メカニズムを解明することができた。さらに、その制御によって神経幹細胞の分化ではなく分化能を bidirectional に制御することができるまでになり、ドラッグスクリーニングなどを想定した神経幹細胞の応用的利用の点でも重要な成果を得ることができた。今後はさらに Competence 制御についての解明を進め、神経幹細胞以外の幹細胞の性質の制御や発生以外の生命現象への関与などへと研究を進展させていく。

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 3 件)

- ① Sato T, Shimazaki T, Naka H, Fukami S, Satoh Y, Okano H, Lax I, Schlessinger J & Gotoh N.

FRS2alpha regulates Erk levels to control a self-renewal target Hes1 and proliferation of FGF-responsive neural stem/progenitor cells.

Stem Cells **28**, 1661-1673 (2010).

査読有

- ② 仲・金田 勇人, 島崎琢也, 岡野栄之
神経新生からグリア新生へのスイッチ
実験医学 Vol. 28 No. 5 (増刊), 179-186
(815-822) (2010).

査読無

- ③ Tao O, Shimazaki T, Okada Y, Naka H, Kohda K, Yuzaki M, Mizusawa H & Okano H.

Efficient generation of mature cerebellar Purkinje cells from mouse embryonic stem cells.

J Neurosci Res **88**, 234-247 (2010).

査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Naka H.
Stem cell ageing biology no Su-Su-Me
Invited lecture at Hokkaido
University School of Dentistry (Host:
Professor Masato Tamura of Department
of Oral Biochemistry and Molecular
Biology; 2010.9.8) (招待講演)
- ② Naka-Kaneda H, Nakamura S, Shimazaki
T & Okano H.
Neurogenesis-to-gliogenesis switch
of neural stem cells
The 8th Stem Cell Research Symposium,
Awaji Yumebutai, 0-1 (2010.5.13)
- ③ Naka-Kaneda H, Nakamura S, Shimazaki
T & Okano H.
Neurogenesis-to-gliogenesis switch
of neural stem cells
Global COE Program Symposium 2010,
Tokyo (2010.2.26)
- ④ Naka H, Nakamura S, Shimazaki T & Okano
H.
Temporal specification of neural stem
cells
The 7th Stem Cell Research Symposium,

Tokyo, P-41 (2009. 3. 15)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：神経分化促進剤

発明者：岡野栄之、島崎琢也、仲勇人

権利者：学校法人 慶應義塾

種類：

番号：PCT/JP2009/003195

出願年月日：2009. 7. 8

国内外の別：国外

○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

金田 勇人 (KANEDA HAYATO)

独立行政法人理化学研究所・免疫転写制御研究グループ・上級研究員

研究者番号：4 0 5 2 8 2 1 2