

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840003

研究課題名(和文) クロマチン制御を介した神経幹細胞の運命転換メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms underlying fate transitions of neural stem cells by regulation of chromatin state

研究代表者

岸 雄介 (Kishi, Yusuke)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00645236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経幹細胞は、発生時期依存的にその分化運命を変化させることが知られているが、そのメカニズムは不明な点が多い。我々はこれまでに、クロマチン制御因子であるHMGAタンパク質群が神経幹細胞のニューロン分化能に重要であることを示してきた。よって本研究ではHMGAタンパク質群による神経幹細胞の運命制御機構を明らかにすることを目指した。

その結果、HMGAタンパク質群の重要な下流因子で、かつ神経幹細胞のニューロン分化能を制御する新規遺伝子を同定することに成功した。これらの因子は、他の組織幹細胞の制御にも重要であることが示唆されており、様々な幹細胞共通の制御メカニズムに迫れたと考えている。

研究成果の概要(英文)：One of the fundamental questions in understanding tissue development is how multipotent progenitors/tissue stem cells give rise to various cell types in a defined order to achieve appropriate tissue organization. Neural stem/progenitor cells (NPCs) attract much attention since these cells give rise to a sequence of neuronal and glial cell types in a developmental-stage dependent manner with striking precision. Previously, we have shown that high mobility group A (HMGA) proteins play pivotal roles in driving fate switches of NPCs during neocortical development. In this study, we identified the genes *Imp2*, which is upregulated by HMGA proteins, as novel regulators of neurogenic potential of NPCs.

研究分野：分子生物学

キーワード：神経幹細胞 クロマチン HMGA

1. 研究開始当初の背景

大脳新皮質は多くの異なる種類のニューロンとグリア細胞等から構成され、それらが正確に配置されることで機能する。脳発生過程において、各種ニューロンとグリアは共通の前駆細胞(大脳新皮質神経幹細胞、radial glia)から産み出される。これらの様々な分化細胞は神経幹細胞からランダムに生み出されるのではなく、発生の時間に従って順序良く生み出される。そして、ニューロンについては後から生まれたニューロンがより脳表層へと移動するため、産生される時間順序が、おおよそ大脳皮質内の空間順序に対応することになる。さらにこのニューロン分化期が終了するとアストロサイトを産生するようになる(グリア分化期)。アストロサイトは整然と並んだ皮質板ニューロンの間を埋めるように配置され、ニューロンの機能を様々な形で支持する。このように、神経幹細胞内の発生時間に従った運命制御機構は、大脳皮質の空間配置を決めるのに非常に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

我々は以前、HMGA タンパク質群と呼ばれるクロマチンの構成因子が、神経幹細胞のクロマチンを核全体で制御しており、神経幹細胞のニューロン分化能に重要であることを発見した(Kishi et al., Nat. Neurosci., 2012)。HMGA タンパク質群は HMGA1、HMGA2 という2つの遺伝子からコードされ、リンカーヒストン H1 と拮抗してクロマチン構造を制御することがわかっている。ゲノム上では主に AT-rich な領域に結合することがわかっているのみで結合する DNA 配列に特異性はないと考えられており、広範なゲノム領域を制御する。また、HMGA タンパク質群は神経系のみならず造血系などでも胎児期に発現が高く、その発現は発生、加齢とともに徐々に減少していくことがわかっていた。

この HMGA タンパク質群を、ニューロン分化能を持つ早期の神経幹細胞においてノックダウンしたところニューロン分化が失われ、逆にニューロン分化能を失った後期の神経幹細胞において過剰発現するとニューロン分化能が回復した。重要なことにこれらの結果は *in vitro* のみならず *in vivo* の神経幹細胞においても観察された。このことは、HMGA タンパク質が神経幹細胞のニューロン分化能に必須の役割を果たしていること、特に過剰発現の結果は HMGA タンパク質群が神経幹細胞にニューロン分化能を賦与するリプログラミングファクターとして機能することを示唆している。

しかしながら、以前の結果からは HMGA タンパク質群がどのようにして神経幹細胞のニューロン分化能に貢献しているかは明らかになっていない。本研究ではそのメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、HMGA タンパク質群がクロマチン制御を介して特定の遺伝子の転写を制御し得ることに注目し、HMGA タンパク質群の下流で神経幹細胞のニューロン分化能に重要な遺伝子の探索を行った。

胎生期神経幹細胞の初代培養系の細胞や *in vivo* 大脳新皮質に遺伝子導入を行い、遺伝子発言解析や神経幹細胞の分化運命の解析を行った。

4. 研究成果

HMGA タンパク質群の下流遺伝子を探索するために、グリア分化期である発生後期の *in vitro* 初代培養系神経幹細胞に HMGA2 を過剰発現し、発現変動する遺伝子を DNA マイクロアレイにより解析した。多くの遺伝子の発現が変化したが、そのうち i) HMGA2 の過剰発現により発現上昇した遺伝子、ii) 発生早期神経幹細胞で発生後期神経幹細胞より発現が高い遺伝子、に注目したところ、Imp2 という遺伝子はその条件を満たすことがわかった。

Imp2 は、RNA 結合タンパク質をコードしており、このタンパク質は結合した mRNA の局在や翻訳を制御することが知られていた。一方で、胎生期神経幹細胞における役割は全くわかっていなかった。そこでまず、*in situ* hybridization によりその発現パターンを調べたところ、発生早期の神経幹細胞において発現が高いことがわかった。

よって、発生早期の神経幹細胞における役割を調べるために、*in vitro* 初代培養系においてノックダウン、過剰発現を行い神経幹細胞の分化運命に与える役割を調べた。その結果、Imp2 は神経幹細胞のニューロン分化能を正に制御することがわかった。

さらに、Imp2 の *in vivo* での役割を調べるために、*in utero* electroporation を用いて Imp2 を過剰発現したところ、発生後期神経幹細胞でもニューロン分化ができるようになることがわかった(Fujii et al., Genes Cells, 2013)。以上の結果は HMGA タンパク質群や同様に、下流で発現制御される IMP2 も発生時期依存的な神経系前駆細胞の運命制御に関わっている事を示唆している。

また本研究では、Imp2 以外にもいくつかの HMGA2 の重要な下流因子を同定した(未発表)。HMGA タンパク質群や Imp2 を含むこれらの遺伝子は、我々の発表後、造血幹細胞や筋幹細胞などの分化運命やその維持に重要であることが報告された。このことは、様々な組織幹細胞において HMGA-Imp2 の経路が共通に重要な役割を果たしていることを示唆している。すなわち、神経幹細胞における HMGA タンパク質群の役割を解析することで、幹細胞性に共通に関わるメカニズムに迫ることができた。

また、HMGA タンパク質群に類似したクロマチン制御因子である HMGN タンパク質群が大脳新皮質神経幹細胞のアストロサイト分化能に重要であることも明らかにした (Nagao et al., Stem Cells, 2014)。神経幹細胞のアストロサイト分化能を制御する因子はこれまでに同定されていないが、HMGN タンパク質群はその過剰発現で発生早期神経幹細胞を強制的にアストロサイト分化に誘導することがわかった。

これらの結果から、HMGA や HMGN といった一連のクロマチン制御因子が強調して神経幹細胞の分化運命を制御していることが明らかとなってきた。

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 4 件)

Yasuhiro Itoh, Maiko Higuchi, Koji Oishi, Yusuke Kishi, Tomohiko Okazaki, Hiroshi Sakai, Takaki Miyata, Kazunori Nakajima and Yukiko Gotoh
The PDK1-Akt Pathway Regulates Radial Neuronal Migration and Microtubules in the Developing Mouse Neocortex
PNAS, 113(21):E2955-64, 2016, 査読有
doi: 10.1073/pnas.1516321113

Motoshi Nagao, Darin Lanjakornsiripan, Yasuhiro Itoh, Yusuke Kishi, Toru Ogata and Yukiko Gotoh
HMGN family proteins promote astrocyte differentiation of neural precursor cells.
Stem Cells. 32(11), 2983-2997, 2014, 査読有
doi: 10.1002/stem.1787

Yuki Fujii, Yusuke Kishi and Yukiko Gotoh
IMP2 regulates differentiation potentials of mouse neocortical neural precursor cells
Genes Cells., Feb;18(2):79-89., 2013, 査読有
doi: 10.1111/gtc.12024

Kelsey Tyssowski, Yusuke Kishi and Yukiko Gotoh
Chromatin regulation of neural development
Neuroscience, 264, 4-16, 2014, Review, 査読有
doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.10.008

[学会発表](計 17 件)

Yusuke Kishi, Yusuke Hirabayashi,

Kelsey Tyssowski, Haruhiko Koseki, Yutaka Suzuki and Yukiko Gotoh
Locus-Specific Expansion of Polycomb Domain Determines the Temporal Repression of the Neurogenic Genes in Neocortical Development
International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function
2015 年 8 月
淡路夢舞台 (兵庫県淡路市)

岸雄介

クロマチン制御による神経幹細胞の制御機構の解明
平成 27 年度大分大学全学研究推進機構デュアトラックプログラムセミナー
2015 年 5 月
大分大学 (大分県由布市)

Yusuke Kishi, Shintaro Hirano and Yukiko Gotoh
Global genomic regulation associated with neuronal maturation
The 8th Annual Meeting for Japanese Developmental Neuroscientists
2015 年 3 月
九州大学 (福岡県福岡市)

岸雄介、平林祐介、Kelsey Tyssowski、古関明彦、堀内映美、鈴木穰、後藤由季子
ポリコムドメインの拡大が大脳新皮質神経系前駆細胞のニューロン分化能を制限する
第 37 回日本神経科学大会
2014 年 9 月
パンフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

岸雄介、平林祐介、Kelsey Tyssowski、後藤由季子
HMGA タンパク質群による神経幹細胞の運命転換における Polycomb domain の制御
2014 新学術領域細胞運命制御若手の会
2014 年 4 月
浜名湖ロイヤルホテル (静岡県浜松市)

Yusuke Kishi, Yusuke Hirabayashi, Kelsey Tyssowski, Nao Morimoto-Suzuki, Masafumi Tsuboi and Yukiko Gotoh
Competition between PcG and HMGA on the neurogenic gene loci
3rd German-Japanese Bilateral Event on Neural Stem Cells and Mammalian Neurogenesis
2013 年 10 月
ラフォーレ蔵王リゾート&スパ (宮城県刈田群蔵王町)

[図書](計 3 件)

岸雄介

神経細胞における RNA-seq -シングルセル
RNA-Seq による新たな細胞種の発見を例に-
羊土社, 実験医学別冊 NGS アプリケーション
RNA-Seq 実験ハンドブック, 212-216
2016 年 3 月

岸雄介

神経発生における遺伝子発現パターンの制
御メカニズム
クバプロ, プレインサイエンス・レビュー
2016, 213-236
2016 年 3 月

川路啓太、京塚和佳奈、岸雄介

神経発生におけるローカルおよびグローバ
ルなクロマチン制御
羊土社, 実験医学増刊, Vol.33, No.10,
1604-1611
2015 年 6 月

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~molbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東京大学大学院薬学系研究科 助教
岸 雄介 (Yusuke Kishi)

研究者番号 : 00645236