

神経幹細胞活性化と細胞分化における
bHLH 型転写因子 *Ascl1* の発現動態と機能の解析

末田 梨沙

目次

論文要旨

略語表

第1部 Hes1 と Ascl1 による成体神経幹細胞の 静止化・活性化機構の解明と活性化の技術開発	6
第1章 序論.....	7
1.1 神経幹細胞の増殖と分化は、胎仔期の脳形成と成体期の脳の維持に必須である	7
1.2 成体神経幹細胞は限られた場所に存在し、分化細胞は各種マーカーにより分類される	7
1.3 bHLH 型転写因子による胎生神経幹細胞の増殖・分化制御.....	9
1.4 Notch シグナル活性化機構と Hes ファミリー	10
1.5 成体神経幹細胞における Hes1, Ascl1 因子の関与.....	11
1.6 本研究の目的	11
第2章 実験方法	12
2.1 使用したトランスジェニック(Tg)マウスおよび培養神経幹細胞.....	12
2.2 発光タイムラプスイメージング	13
2.2.1 培養神経幹細胞のタイムラプスイメージング	14
2.2.2 成体脳スライスを用いたタイムラプスイメージング.....	14
2.3 免疫染色	16
2.3.1 培養細胞の免疫染色.....	16
2.3.2 成体脳凍結切片の作製と免疫染色.....	16
2.3.3 使用した抗体一覧	17
2.4 Tamoxifen と BrdU の投与	18
2.5 レンチウイルスベクターの作製.....	18
2.6 光遺伝学的手法による Ascl1 の誘導.....	18
2.7 成体脳海馬領域へのウイルスインジェクション	19
2.8 画像処理と定量	19
第3章 結果.....	21

3.1	Hes1 は活性化神経幹細胞に比べ静止神経幹細胞で発現レベルが高い.....	21
3.2	Hes1 および Ascl1 は振動発現を成体神経幹細胞で行う	23
3.2.1	Hes1 および Ascl1 は静止状態および活性化状態の移行期に発現レベルを変化させる	23
3.2.2	成体脳スライス中の神経幹細胞において Hes1 および Ascl1 は振動発現を行う 25	
3.3	<i>Hes1</i> のノックアウトは Ascl1 の発現を一過性に亢進させる	27
3.4	Hes1 強制発現は Ascl1 の発現と細胞増殖を抑制する	29
3.5	Ascl1 を光遺伝学的手法で誘導することで静止状態の神経幹細胞は活性化される ..	31
3.5.1	Ascl1 を E47 と共に誘導することで静止状態の培養神経幹細胞を活性化できる 31	
3.5.2	光遺伝学的手法を用いた Ascl1-E47 の振動発現によって成体脳内の神経幹細胞を活性化できる	33
3.6	Ascl1 を <i>Hes5</i> プロモーターで誘導することで静止状態の神経幹細胞は長期的に活性化される	35
3.6.1	<i>Hes5</i> プロモーターを用いた Ascl1 の誘導は下流の Dll1 の振動発現を誘導する 35	
3.6.2	<i>Hes5</i> プロモーターによる Ascl1 の誘導は静止状態の培養神経幹細胞を効率的に活性化する	37
3.6.3	<i>Hes5</i> プロモーターは成体脳内で神経幹細胞特異的に発現誘導をおこなう 38	
3.6.4	<i>Hes5</i> プロモーターを用いた Ascl1 の誘導により、海馬歯状回に存在する静止神経幹細胞を活性化できる.....	39
3.6.5	Ascl1 の誘導により Radial glial cell 数の減少とニューロン数の増加が起こる 42	
第 4 章 考察.....		44
4.1	Hes1 の高発現と Ascl1 の発現抑制について	44
4.2	神経幹細胞の維持機構や活性化手法、および pHes5-Ascl1 を用いた場合の利点	45
4.3	他の幹細胞における静止化・活性化の制御機構および今後の応用	46
第 2 部 オリゴデンドロサイト分化における Ascl1 の 振動発現とその役割 ...		49
第 1 章 序論.....		50
1.1	オリゴデンドロサイトの発生について	50

1.2	オリゴデンドロサイト系譜の細胞のマーカーによる分類.....	51
1.3	Ascl1 の発現はニューロン分化だけでなくオリゴデンドロサイト分化にも重要である	51
1.4	本研究の目的	52
第 2 章 実験方法		53
2.1	使用したトランスジェニックマウス.....	53
2.2	成体脳スライスを用いたタイムラプスイメージング	53
2.3	オリゴデンドロサイトに分化誘導した培養神経幹細胞のタイムラプスイメージング ..	53
2.4	免疫染色	54
2.5	オリゴデンドロサイト前駆細胞分化誘導時における Ascl1 の発現誘導	54
2.6	画像処理と定量	55
第 3 章 結果.....		57
3.1	Ascl1 はオリゴデンドロサイト前駆細胞において発現し、神経前駆細胞よりも発現レベルが低い.....	57
3.2	Ascl1 は成体脳スライス中のオリゴデンドロサイト前駆細胞において振動発現する	59
3.3	Ascl1 はニューロン分化よりもオリゴデンドロサイト分化過程において発現レベルが低い	61
3.4	Ascl1 の持続発現はオリゴデンドロサイト前駆細胞への分化を抑制しニューロン分化を促進する	62
3.5	Ascl1 の持続発現は細胞の増殖能を低下させる	63
第 4 章 考察.....		64

参考文献

謝辞

論文要旨

神経幹細胞や前駆細胞の増殖や分化は、脳を発生期にかたちづくり、成体期においても神経幹細胞を長期維持するために、様々な因子によって厳密に制御されている。中でも bHLH 型転写因子は、細胞の運命決定を担うマスター因子として機能する重要な役割を持つ。近年の報告から、Ascl1 や Hes1 をはじめとする bHLH 因子は、発現が振動することや持続することが知られており、その発現レベルおよび発現動態によって異なる機能をもつことが示されている。本研究では、第一部で成体神経幹細胞の活性化とニューロン分化における Hes1 および Ascl1 の発現動態と機能を明らかにし、さらに第二部でオリゴデンドロサイト前駆細胞における Ascl1 の発現動態を明らかにした。

第一部：胎仔期の神経幹細胞は、活発に増殖と分化を行う。これまでに、Hes1 は 2-3 時間周期の振動発現を行うこと、Ascl1 は Hes1 に抑制されて逆位相での振動発現を行うが、この振動発現が神経幹細胞の増殖を促進させることが明らかになっていた。一方で成体の神経幹細胞は、増殖や分化をほとんど行わない静止状態にある。これまでに、静止状態は Hes1 の上流因子である Notch シグナルが関与すること、Ascl1 が静止状態では発現せず活性化状態の一部の神経幹細胞で発現することが報告されていた。しかしながら、静止状態を維持する機構や活性化状態への移行に Hes1 や Ascl1 がどのような詳細は明らかになっていなかった。本研究では、まず免疫染色とライブイメージングによりそれぞれの発現を解析した。静止状態と活性化状態での Hes1 の発現を比べると、静止状態で発現が高く活性化状態では低いレベルで振動していた。一方、Ascl1 は静止状態では発現が見られず、活性化状態では振動発現を示した。次に、成体神経幹細胞において *Hes1* のノックアウトと強制発現実験を行った。*Hes1* および *Hes* 関連遺伝子群非存在下では Ascl1 の発現が上がりほぼすべての神経幹細胞が活性化してニューロンに分化し、3 週間以内に枯渇した。Hes1 を強制発現すると Ascl1 の発現が下がり神経幹細胞は活性化されなくなった。最後に、静止状態の神経幹細胞に Ascl1 の発現を誘導して活性化を試みた。光遺伝学的手法あるいは *Hes5* プロモーターを利用した Ascl1 の振動発現によって、脳内に存在する静止状態の成体神経幹細胞を効率的に活性化し、ニューロン新生を促進することに成功した。以上から、成体神経幹細胞の静止状態は Hes1 の高発現とそれに伴う Ascl1 の発現抑制によって維持されること、静止状態から活性化状態への移行時に Hes1 が低下して Ascl1 が振動発現を開始することが明らかになった。さらに Ascl1 の振動発現の誘導により静止状態の神経幹細胞を活性化させて新たなニューロンを作り出すことが可能となった。

第二部：Ascl1 は、ニューロン分化のパイオニア因子として知られているが、前述のとおり神経幹細胞の増殖にも関与し、さらにオリゴデンドロサイト産生にも重要な役割をもつ。しかしオリゴデンドロサイトへの分化運命決定時の Ascl1 の発現動態はこれまでに明らかになっていない。本研究ではタイムラプスイメージングにより、Ascl1 の発現がオリゴデンドロサイト前駆細胞において振動していることを明らかにした。さらに神経幹細胞がオリゴデンドロサイト前駆細胞に分化する条件下で Ascl1 を持続発現させるとニューロン分化が亢進し、オリゴデンドロサイト前駆細胞に分化する割合が減少したため、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖や維持には Ascl1 の振動発現が重要であることが示唆された。

略語表

bHLH : basic helix-loop-helix

Hes : Hairy and enhancer of split

Ascl1: Achaete-scute homolog 1

SVZ (LV) : Subventricular zone (Lateral ventricle) 脳室下帯 (側脳室)

SGZ (DG): Subgranular zone (Dentate gyrus) 顆粒細胞層下帯 (海馬齒状回)

NLS : Nuclear localization signal

DCX : Doublecortin

Luc2: Luciferase 2

MCM2 : Minichromosome maintenance 2

GFAP : Glial fibrillary acidic protein

GAVPO: GAL4-VIVID-P65 optimized transcription factor

Dll1: Delta-like 1

BMP: Bone morphogenetic protein

NG2: Neural/glial antigen 2

CNPase : 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase

第1部

Hes1 と Ascl1 による成体神経幹細胞の
静止化・活性化機構の解明と活性化の技術開発

第1章 序論

1.1 神経幹細胞の増殖と分化は、胎仔期の脳形成と成体期の脳の維持に必須である

神経幹細胞は自身で増殖する自己複製能および多分化能をもった未分化な細胞である。脳の発生過程において、神経幹細胞は胎生初期には盛んに自己増殖を繰り返し、数を増やす。胎生中期から後期には、非対称分裂によって神経幹細胞を維持すると同時に多数のニューロンやグリア細胞を産生する。このように胎生期の神経幹細胞は適切な時期に増殖・分化を活発に行うことで脳を構成するために必要な細胞を産生している (Alvarez-Buylla et al., 2001) (Götz & Huttner, 2005)。

一方で、成体脳の神経幹細胞は多くが G0/G1 期の静止状態にあり (Ming & Song, 2011)、数%の神経幹細胞が活性化状態となり新しいニューロンを生み出している (Seri et al., 2001)(Lagace et al., 2007) (Imayoshi et al., 2008) (Bonaguidi et al., 2011)(Encinas et al., 2011)(Pilz et al., 2018)。しかしながら、加齢とともにニューロンを生み出す能力は低下する。この静止状態は成体神経幹細胞を長期的に維持し、ニューロン新生を生涯保つための機構と考えられている (Urbán et al., 2019)。一方で、ニューロン新生は記憶や学習に重要であることから (Zhao et al., 2008)、ニューロン新生を活性化させるメカニズムが近年注目されている。

1.2 成体神経幹細胞は限られた場所に存在し、分化細胞は各種マーカーにより分類される

胎仔脳神経幹細胞は脳室帯に多数存在する一方、成体脳神経幹細胞は数も少なく、側脳室の脳室下帯 (SVZ: subventricular zone) および海馬歯状回の顆粒細胞層下帯 (SGZ: subgranular zone) の限られた場所に存在している (Gage, 2000)。これらの領域には、神経幹細胞から分化した神経前駆細胞やニューロンなども含まれ (図 1. A,B)、それぞれの形態や特異的分子マーカーの発現を確認することで分類可能である (図 1. C,D)。

SVZ では、神経幹細胞 : TypeB, 神経前駆細胞 : TypeC, 新生ニューロン : TypeA, SGZ では、神経幹細胞 : Type1, 神経前駆細胞 : Type2, 新生ニューロン : Type3 と名付けられている。Type1(TypeB)細胞は、増殖マーカー(Ki67, MCM2)を発現するかしないか、または BrdU の取り込みがあるかないかで、活性化状態か静止状態かに分類される。活性化状態となった Type1(TypeB)細胞は、増殖能力の高い Type2(TypeC)細胞を産生し、Type2(TypeC)細胞が Type3(TypeA)細胞を産生する。Type 2 細胞はさらに、Ascl1 の発現がみられる Type 2a 細胞と DCX の発現がみられる Type 2b 細胞とに大別される (Doetsch, 2003)(Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009)。

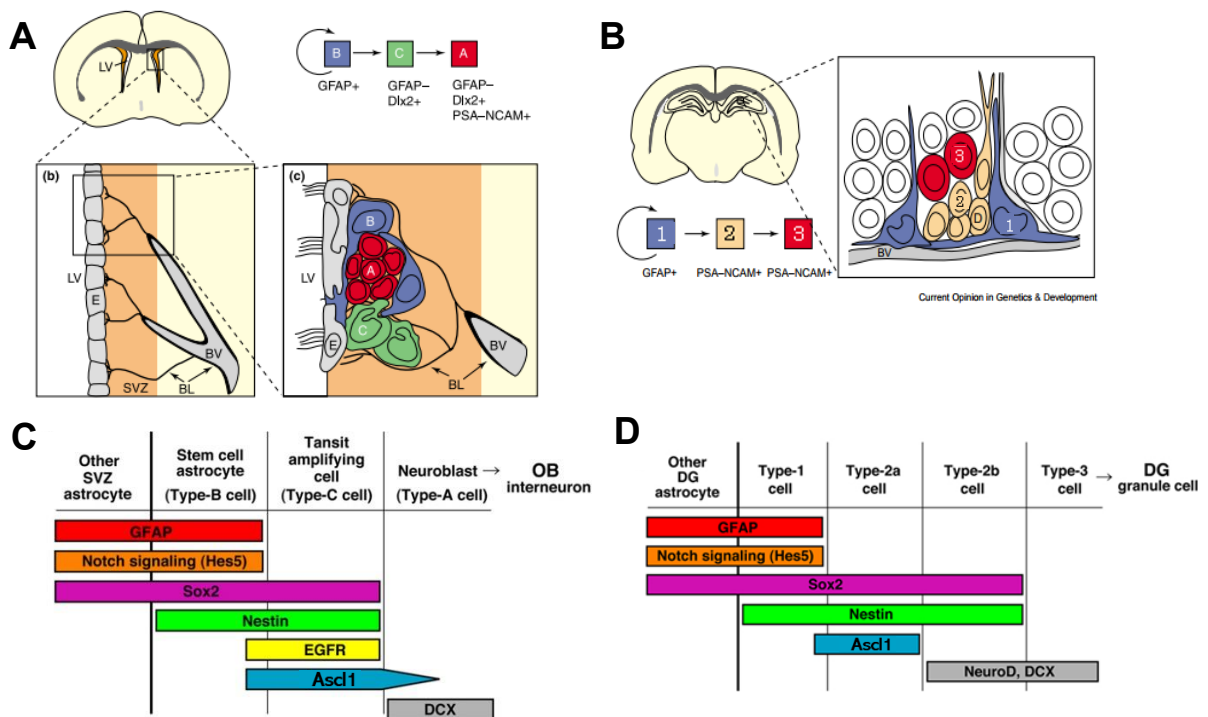


図 1：側脳室下帯および海馬歯状回顆粒細胞層下帯に存在する神経幹細胞と分化した細胞とのマーカーによる分類

(A)SVZ と(B)SGZ の領域を含むマウス成体脳の冠状面の模式図と、そこに存在する細胞の種類と構成。(C) SVZ と(D)SGZ に存在する TypeB,C,A cell および Type 1,2,3 cell が発現するステージ特異的なマーカータンパク質。

(A,B :Doetsch, 2003 より図を改変した。 C,D :Imayoshi et al., 2011 より図を改変した。)

1.3 bHLH 型転写因子による胎生神経幹細胞の増殖・分化制御

神経幹細胞の増殖や分化は、核内の転写因子が細胞周期の亢進や脱出に関与する遺伝子発現を抑制・促進し制御している。先行研究から、神経幹細胞のアストロサイト、ニューロン、オリゴデンドロサイトへの運命決定を担う因子として、Hes1, Ascl1, Olig2 が報告されている。

Hes1 は自身のプロモーターに結合して転写を抑える negative autoregulation により、2-3 時間周期での振動発現を行う。Hes1 タンパク質や mRNA の半減期が短いことも振動発現を引き起こす要因のひとつである。Hes1 の振動発現はプロニューラル因子の発現を制御することで神経幹細胞の未分化性を維持すると考えられている (Shimojo et al., 2008)。

Ascl1 は、Hes1 タンパク質が *Ascl1* 遺伝子のプロモーターに存在する class C site へ結合するために、周期的に発現抑制される (H.Chen et al., 1997)。これにより Ascl1 は Hes1 と逆位相で振動発現が誘導される。これまでの光遺伝学的手法を用いた Ascl1 の発現誘導実験から、Ascl1 の 2-3 時間周期での振動発現は神経幹細胞の増殖を誘導し、6 時間以上の持続発現はニューロン分化を引き起こすことが報告されている。神経幹細胞の未分化性と増殖能は、Hes1, Ascl1, Olig2 これらの因子が振動発現することで保たれていると考えられる (Imayoshi et al., 2013) (図 2)。

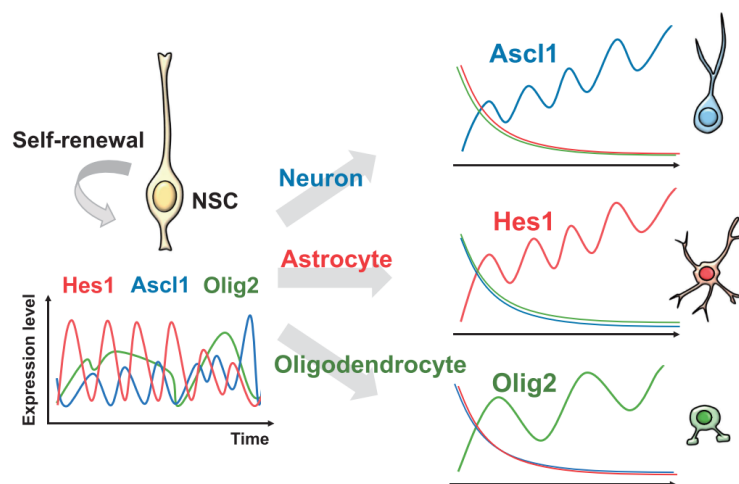


図 2 : bHLH 型転写因子の発現動態と細胞の運命決定

神経幹細胞では、bHLH 型転写因子は拮抗して発現し未分化性を保つ。どれかひとつの転写因子の発現が優位になることで分化が起こる。(Kageyama et al., 2020 より図を引用した。)

1.4 Notch シグナル活性化機構と Hes ファミリー

Notch シグナル伝達経路は、神経幹細胞の膜上に発現している Notch タンパク質が、隣接細胞の Dll1 等からシグナルを受けることにより活性化される。その後、Notch タンパク質が γ セクレターゼにより切断され、Notch intracellular domain: NICD が核内に移行する。NICD は転写因子としてはたらしき、同じく転写因子である Rbpj (Recombination Signal Binding Protein For Immunoglobulin Kappa J Region) や転写共役因子である MAML (Mastermind-like) と複合体を形成して標的遺伝子である Hes の発現を活性化させる(図 3)。

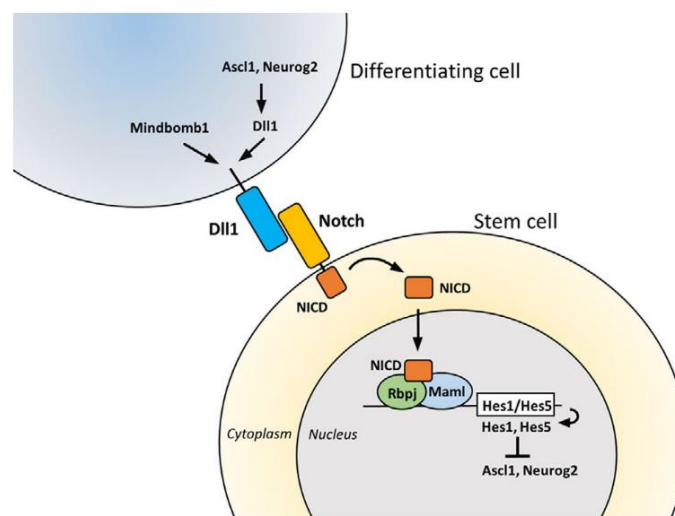


図 3 : Notch シグナルの活性化機構

Hes の発現は、隣接細胞からの Dll1 の入力をもつ膜タンパク質の Notch が受け取ることで誘導される。(Sueda & Kageyama, 2019 より図を引用した。)

Hes は多数のファミリーを持つ遺伝子で、胎生期の神経幹細胞において *Hes1*, *Hes3*, *Hes5*, *Hey1* が発現している。*Hes1* と *Hes5* を神経幹細胞や前駆細胞で欠損させると、*Ascl1* や *Neurog2* などのプロニューラル因子の発現が上昇してニューロン分化が亢進し、幹細胞の枯渇及び脳のサイズの減少を招くことから、特に *Hes1* と *Hes5* が神経幹細胞維持に重要な機能をもつと考えられている (Ohtsuka et al., 1999) (Hatakeyama et al., 2004)。また、ファミリー遺伝子のどれかが欠損しても他のファミリー遺伝子が機能を補償するため、たとえば *Hes3*, *Hes5*, *Hey1* のうちどれかひとつをコンベンショナルノックアウトしても、マウスの発生は正常である。しかし、*Hes1* のコンベンショナルノックアウトは胎生致死となる (Ishibashi et al., 1995) (Tomita et al., 1996)。このことから、*Hes1* は他のファミリー遺伝子に比べ重要な Notch のエフェクターであると考えられる。また、胎生期の神経幹細胞において *Hes5* を強制発現しても *Ascl1* の転写は抑制されず (Bansod et al., 2017)、*Hes* ファミリーの中では *Hes1* が主に *Ascl1* の発現を制御している。

1.5 成体神経幹細胞における Hes1, Ascl1 因子の関与

成体において Ascl1 は、静止状態の神経幹細胞で発現しないこと、活性化状態の神経幹細胞の一部において低レベルで発現していること、神経前駆細胞において高レベルで発現していることが報告されている (Pastrana et al., 2009) (Kim et al., 2011) (Andersen et al., 2014)。また、脳を障害する薬剤 (グルタミン酸受容体のアゴニスト: カイニン酸) の投与による神経幹細胞の増殖においても、Ascl1 の発現が伴う (Andersen et al., 2014)。さらに、Ascl1 を発現する神経幹細胞の子孫細胞を追跡した研究では、生後 1 か月の成体脳 SGZ において、1 つの神経幹細胞は 2 か月間で平均 4.8 個のクラスターを形成し、ほとんどが神経前駆細胞とニューロンをつくりだすこと、アストロサイトを作り出した神経幹細胞は 2.4% であり、オリゴデンドロサイトはつくりださなかったことが報告されている (Pilz et al., 2018)。一方、*Ascl1* のコンディショナルノックアウトをタモキシフェン依存的に 2 か月齢の成体神経幹細胞特異的に行うと、ほとんどが増殖マーカーを発現しなくなり、さらに DCX を発現する neuroblasts もノックアウトから 1 か月後には観察されなくなった (Andersen et al., 2014)。このことから、Ascl1 は神経幹細胞の活性化に必要であることが示されている。しかしながら、静止化と活性化において Ascl1 の発現制御がどのように行われているかは不明な点が多い。

Hes1 については、これまでに直接的な成体神経幹細胞への影響を報告した論文は少ないが、Hes1 の上流である Notch シグナルが神経幹細胞の静止状態の維持に関与する報告がある。たとえば生後マウスにおいて *Notch1* をノックアウトすると、神経幹細胞がニューロン分化を起し、NSC のプールが減少する (Breunig et al., 2007)。成体脳で *Rbpj* をノックアウトすると、神経幹細胞は Ascl1 を発現して活性化状態となるが、ある程度ニューロンを産生した後に枯渇する (Imayoshi et al., 2010)。一方で、前述のように Hes1 をはじめとする Notch シグナルは胎生期の活性化神経幹細胞の維持にも必須であり、活性化と静止化の両状態の維持を Notch シグナルがどのように制御しているのかは不明である。

1.6 本研究の目的

本研究では、Hes1 と Ascl1 の発現に着目した成体神経幹細胞の静止化・活性化機構の解明と、Ascl1 を用いた静止状態を活性化する技術開発を目的とした。

第2章 実験方法

2.1 使用したトランスジェニック(Tg)マウスおよび培養神経幹細胞

発光レポーターマウス

- Luc2-Hes1 fusion BAC Tg mouse (ICR) (#RBRC06013)
Hes1 コーディング領域の N 末に Luc2(Luciferase2)の cDNA を挿入した BAC(bacterial artificial chromosome) Tg マウスで、ルシフェラーズの発光を用いて、Hes1 タンパク質の発現変動を可視化できる(Imayoshi et al., 2013) (図 4.A 上)。
Luc2-Hes1 培養神経幹細胞はこのマウス(E14.5)より樹立された。
- Luc2-Ascl1 fusion BAC Tg mouse (ICR) (#RBRC06019)
Ascl1 コーディング領域の N 末に Luc2 の cDNA を挿入した BAC Tg マウスで、ルシフェラーズの発光を用いて、Ascl1 タンパク質の発現変動を可視化できる(Imayoshi et al., 2013) (図 4.B)。
Luc2-Ascl1 培養神経幹細胞はこのマウス(E14.5)より樹立された。
- Hes5-Ub-NLS-Luc2 Tg mouse (ICR) (#RBRC06025)
Hes5 プロモーター制御下で、核移行シグナルをもつ不安定型 Luc2 が発現する(Imayoshi et al., 2013) (図 4.C)。
pHes5-UbLuc2 培養神経幹細胞はこのマウスより樹立された。
- Dll1-Ub1-Luc Tg mouse (ICR)
Dll1 プロモーター制御下で、不安定型 Luciferase が発現する(Shimojo et al., 2008) (図 4.C)。pDll1-Luc 培養神経幹細胞はこのマウス(E14.5)より樹立された。

蛍光レポーターマウス

- Venus-Hes1 fusion knock-in mouse (ICR) (#RBRC06010) (Imayoshi et al., 2013)
Hes1 コーディング領域の N 末に Venus を挿入した knock-in マウス。
- Nestin-NLS-mCherry Tg mouse(ICR) (#RBRC06016)(Furutachi et al., 2015)
Nestin プロモーター制御下で、核移行シグナルをもつ mCherry が発現する。

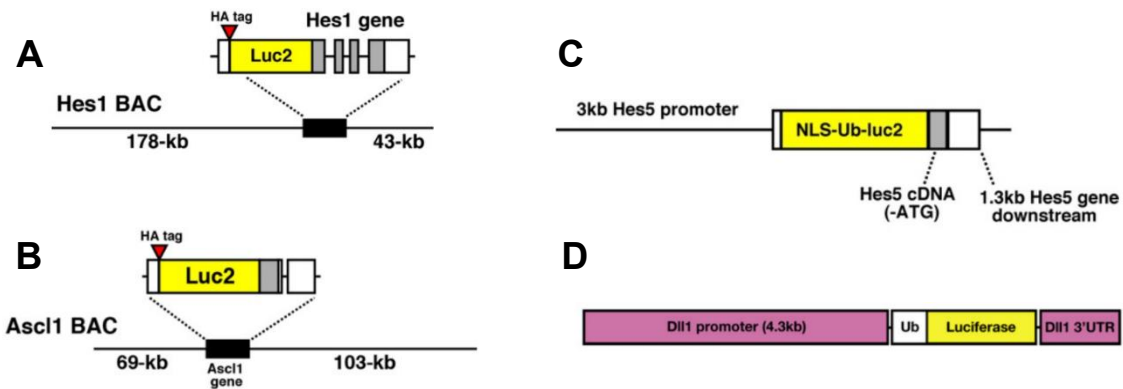


図 4：タンパク質の発現動態またはプロモーター活性を可視化するためのレポーターマウス (A-C) Luc2-Hes1 BAC Tg マウス(A)。Luc2-Ascl1 BAC Tg マウス(B)。Hes5-Ub-NLS-Luc2 Tg マウス(C)。図は http://imayoshi.web.fc2.com/Itaru_Imayoshi_Ph.D./Mouse_strains.html より引用。(D) Dll1-Ub1-Luc Tg マウス。図は(Shimojo et al., 2008)より引用。

そのほか

- ・ Ai14(R26-CAG- LoxP-Stop-LoxP-tdTomato) (C57BL/6) Jackson Laboratory より入手
CAG 下流に lox-stop-lox カセットと tdTomato の遺伝子が配置され、*Rosa26* 遺伝子座に挿入されている。Cre による組換えにより恒常的に tdTomato が発現する。
- ・ Nestin-CreERT2 Tg mouse (C57BL/6) (Imayoshi et al., 2006)
Nestin プロモーター下流で、タモキシフェン依存的に遺伝子組み換えを行う CreERT2 を発現する。
- ・ Hes1-floxed mouse (Imayoshi et al., 2008) (RBRC05995 & RBRC06047)
- ・ Rosa26-LoxP-Stop-LoxP-Hes1-ires-EGFP knock-in mouse
- ・ Rosa26-LoxP-Stop-LoxP-CFP knock-in mouse
- ・ Hes3-null;Hes5-null (Hatakeyama et al., 2004)(RBRC06043)
- ・ Hey1-null 相賀 裕美子博士より譲与(Kokubo et al., 2005)

2.2 発光タイムラプスイメージング

転写因子の発現動態は、レポーターの発現をタイムラプスイメージングすることで観測可能である。特に Luciferase をレポーターとした場合は、基質である Luciferin 存在下で素早く発光反応を起こすため、対象の遺伝子の発現をすぐに検出することが可能である。撮影は暗室で行い、冷却した CCD カメラ(Princeton Instruments, VersArray もしくは Andor Technology, iKon-M 934) の付属した倒立顕微鏡 (Olympus IX81, IX83) を用いた。ソフトウェアはそれぞれ Image-Pro Plus (Media Cybernetics) もしくは Metamorph (Molecular Devices) を用いた。

2.2.1 培養神経幹細胞のタイムラプスイメージング

培養神経幹細胞は、通常（活性化）培地 [DMEM/F-12 (Gibco), N-2 MAX media supplement (R&D Systems), 20 ng/ml EGF (Gibco), 20 ng/ml bFGF (Wako), ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク)] を使用し、Laminin コートディッシュ上で 37°C、5%CO₂ で培養した。静止化を誘導する場合は、ディッシュ中の通常培地を除き、PBS(Phosphate buffered saline) で 1 回 wash したのちに静止化誘導培地 [DMEM/F-12 (Gibco), N-2 MAX media supplement (R&D Systems), 50 ng/ml BMP4 (R&D Systems), 20 ng/ml bFGF (Wako), ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク)] を添加した。増殖マーカーを発現しない静止状態は、通常培地交換から 2-3 日ほどで誘導される。

Luc2-Hes1 Tg マウスから樹立された Luc2-Hes1 神経幹細胞は、通常培地から静止化誘導培地に交換して 1 日後、顕微鏡にセットし 40 倍の対物レンズを使用しタイムラプス撮影を開始した。培地には Luciferin 1mM が添加された。

Luc2-Ascl1 Tg マウスから樹立された Luc2-Ascl1 神経幹細胞のイメージングは、Luc2-Ascl1 のシグナル解析を容易にするために Wild Type マウスから樹立された神経幹細胞を等量混ぜて行った。35mm ガラスボトムディッシュに細胞を撒き、静止化誘導培地で 3 日間培養して休眠状態を誘導した。イメージングを行う 30 分前に通常（活性化）培地に交換し、Luciferin 1mM と生細胞イメージング用の核プローブである SiR-DNA(Cytoskeleton, Inc) 500nM を加えた。撮影は 40 倍の対物レンズを使用し、露光時間は Luminescence フィルター：4min、Bright-field フィルター：100msec、iRFP フィルター：100msec に設定し、5 分のインターバルで画像取得した。

解析には ImageJ を用いた。Luminescence チャンネルには Spike Noise Filter 0.05 の処理を行い、宇宙線のノイズを除去した。iRFP のチャンネルには Median 1.0 の処理を行い、Plugin の Particle Analysis と Dynamic Particle Analyzer により、細胞核のトラッキングを行った。正確に 1 細胞がトラッキングされたものに関して、Luminescence チャンネルと iRFP チャンネルのそれぞれで輝度のグラフと Montage 画像を作製した。グラフはベースラインを 1 にするため、y 値を一定の初期値で割って補正した。細胞の Montage 画像は Luminescence チャンネルに Gaussian Blur 1.0 の処理を行い、ノイズを除去した。

2.2.2 成体脳スライスを用いたタイムラプスイメージング

Luc2-Hes1 マウスおよび Luc2-Ascl1 マウスに、Nestin-mCherry マウスを掛け合わせて得た成体マウス (2-3 か月齢) を使用した。脳スライスは、断頭し脳を摘出した後、Cutting solution*1 中で酸素を Bubbling させながら、ビブラトーム (Leica, VT1200S) を用いて海馬領域または側脳室領域を 150µm 厚に切り作製した。次に脳スライスを Bath solution*2 中

で30分間酸素を Bubbling し、cell culture insert (12mm, Millicell, PICM0RG50) にスライスを載せ、コラーゲンゲル(新田ゼラチン, Cellmatrix Type 1-A) でスライスの上をコーティングした。これを 35mm のガラスボトムディッシュ (IWAKI) に置き、スライス下部(インサートとの接着面)が Luciferin を含む 300 μ m の Culture medium*3 と接するようにし、37 $^{\circ}$ C、CO₂ 5%、O₂ 80%のインキュベーター中で静置した。静置から 5-7 時間後にサンプルを顕微鏡にセットし、40 倍の対物レンズを用いて、露光時間は Luminescence フィルター：9-29min、Bright-field フィルター：100msec、RFP フィルター：100msec に設定し、15-30 分のインターバルで撮影を行った (図 5)。発光を検出しやすい Ascl1 は 9-19 分の露光、発光のレベルが低い Hes1 は 19-29min の露光で撮影した。

解析は培養細胞と同様に ImageJ を使い、Luminescence チャンネルには Spike Noise Filter 0.05 の処理を行いノイズを除去した。発光が検出された細胞を ROI で囲って手動でトラッキングを行い、個々の細胞の stack 動画を作製して輝度を測定しグラフと Montage 画像を得た。細胞の Montage 画像は Luminescence チャンネルに Gaussian Blur1.0 の処理を行い、ノイズを除去した。

*1 Cutting solution (280mM sucrose, 2mM KCl, 10mM HEPES, 0.5mM CaCl₂, 10mM MgCl₂)

*2 Bath solution (135mM NaCl₂, 5mM KCl, 10mM HEPES, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂)

*3 Culture medium (Bath solution, 5% Horse Serum, 5%Fetal Bovine Serum)

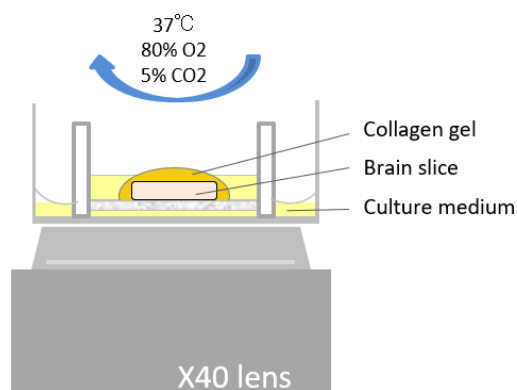


図 5：成体脳スライスイメージングのセット模式図

サンプルはカルチャーインサートを用いて培養し、倒立顕微鏡によって観察した。

2.3 免疫染色

2.3.1 培養細胞の免疫染色

細胞は4%PFA(Paraformaldehyde)で20分固定し、PBSでwash後、blocking液(5% Donkey serum/0.1% TritonX100/PBS)で20分間室温でブロッキングを行った。次に一次抗体を1% Donkey serum/PBSに1:1000の割合で希釈し、wellにアプライして4°Cで一晩反応させた。PBS wash後、1% Donkey serum/PBSに二次抗体(1:1000)とDAPI(100ng/ml)を希釈した溶液をwellにアプライし、室温で1時間反応させた。PBS wash後、サンプルをLSM510, LSM780 (Zeiss)の共焦点顕微鏡またはBZ-X700(Keyence)を用いて撮影した。

2.3.2 成体脳凍結切片の作製と免疫染色

成体マウスは麻酔後4%PFAで灌流固定し、脳を摘出後さらに4%PFAで一晩4°Cで固定した。PBSでwash後に20% Sucrose/PBSで一晩脱水し、さらに30% Sucrose/PBSで一晩脱水した。サンプルはOCT compound(SAKURA)で包埋し、-80°Cで凍結させてからクライオスタットにより16μm厚の凍結切片(冠状断)を作製し、スライドガラスに接着させ乾燥後-80°Cで保存した。Ai14マウス脳は神経細胞の突起を観察するために40μm厚の凍結切片(冠状断)を作製し-80°Cに保存した。免疫染色は16μm厚の場合、スライドガラスをPBSで洗浄した後にblocking液(5% Donkey serum /0.1% TritonX100/PBS)で30分間室温でブロッキングを行った。次に一次抗体を1% Donkey serum /0.1% TritonX100/PBSに希釈し、スライドにアプライして4°Cで一晩反応させた。PBS wash後、二次抗体とDAPIを1% Donkey serum /0.1% TritonX100/PBSに希釈し、スライドにアプライして室温で1時間反応させた。PBS wash後、封入剤を滴下しカバーガラスを被せてプレパラートを作製した。40μm厚の場合、Free-floating法でシェーカーを用いて穏やかに攪拌しながら染色を行った。凍結切片1枚ずつを48-well plateの各wellにうつし、PBSをwell中に加えて切片をwashしたあと、blocking液(5% Donkey serum /0.3% TritonX100/PBS)で1時間室温でブロッキングを行った。次に一次抗体を1% Donkey serum /0.3% TritonX100/PBSに希釈し、wellにアプライして4°Cで36時間反応させた。PBS wash後、二次抗体とDAPIを1% Donkey serum /0.3% TritonX100/PBSに希釈し、wellにアプライして4°Cで20時間反応させた。PBS wash後、脳切片を細筆を用いてスライドガラス上へのせ、切片が乾燥しスライドガラスに接着するまで室温・暗所で静置した。その後封入剤を滴下しカバーガラスを被せてプレパラートを作製した。サンプルの撮影はLSM510, LSM780 (Zeiss)の共焦点顕微鏡を使用した。

2.3.3 使用した抗体一覧

一次抗体 (免疫組織化学染色)

抗原	ホスト	メーカー	カタログ No	濃度
Hes1	Rabbit	カスタムポリクローナル抗体(Kobayashi et al., 2009)		1:500
Ascl1	Mouse	BD Biosciences	556604	1:100
Ki67	Mouse	BD Biosciences	550609	1:200
Ki67	Rabbit	Thermo Fisher Scientific	RM-9106-S1	1:200
GFAP	Mouse	Sigma-Aldrich	G3893	1:200
GFAP	Rabbit	Sigma-Aldrich	G9269	1:200
DCX	Goat	Santa Cruz Biotechnology	sc-8066	1:200
DCX	Rabbit	Cell Signaling Technology	4604S	1:200
BrdU	Rat	Oxford Biotechnology	OBT0030	1:50
MCM2	Rabbit	Abcam	ab4461	1:500
Sox2	Goat	R&D Systems	AF2018	1:500
Sox2	Rabbit	Millipore	AB5603	1:500
mCherry	Goat	SICGEN	AB0040-200	1:500
mCherry	Rat	Invitrogen	M11217	1:500
GFP	Rat	Nacalai Tesque Inc	GF090R	1:300
GFP	Rabbit	Invitrogen	A11122	1:500
GFP	Chicken	Abcam	ab13970	1:500

二次抗体は Alexa Fluor 405, 488, 568, 647 で標識されたもの (Invitrogen, abcam) を 1:200 の濃度で用いた。DAPI は 100ng/ml の濃度に希釈して使用した。Free-floating 法では、一次抗体、二次抗体ともに 1:500 の濃度で用いた。

2.4 Tamoxifen と BrdU の投与

Tamoxifen は corn oil に溶解し、10mg を 1 日 1 回、4 日間経口投与された。

BrdU は 3.3 節の SVZ、3.4 節の SVZ の解析において固定の 2 時間前に体重 1g あたり 0.2mg を腹腔内投与された。3.3 節の SGZ の解析においては固定の 1 週間前から飲み水を 1 mg/ml 濃度の BrdU 溶液に置換し投与された。

2.5 レンチウイルスベクターの作製

レンチウイルスベクタープラスミドは、CSII-EF-MCS のプラスミドに目的の遺伝子のコーディング領域を挿入し、その後 EF プロモーターを目的のプロモーターに入れ替えて作製した。レンチウイルスベクターの調製は、HEK 細胞にレンチウイルスベクタープラスミド、gag-pol プラスミド (psPAX2), VSV-G プラスミド (pMD2.G) を Polyethylenimine-MAX (Polysciences) でトランスフェクションし、48 時間後に培養上清を回収して遠心を 8,000G で一晩、13,000G で 4 時間行い溶液中のレンチウイルスをペレット状にした。100ml の上清から得られたペレットを 100 μ l の PBS で懸濁し、分注して -80°C で保存した。

本実験で使用したレンチウイルスベクタープラスミド

- CSII-EF-hGAVPO-mCherry-IRES2-Bsd
- CSII-UAS-Ascl1
- CSII-UAS-Ascl1-E47-Venus
- CSII-EF-Venus
- CSII-EF-Hes1-Venus
- CSII-Hes5-Venus
- CSII-Hes5-Ascl1-E47-Venus
- CSII-GFAP-Venus
- CSII-GFAP-Ascl1-E47-Venus
- CSII-Hes5-iCre
- CSII-Hes5-Ascl1-E47-iCre

2.6 光遺伝学的手法による Ascl1 の誘導

<*in vitro*> 神経幹細胞に CSII-EF-hGAVPO-mCherry-IRES2-Bsd のウイルスを添加したあと、blasticidin S (Invitrogen) により薬剤耐性をもつウイルス感染細胞のみを選別し、その後 CSII-UAS-Ascl1-E47-Venus のウイルスを感染させた。3.5.1 節では、細胞を静止化誘導培地で 3 日間培養し、その後青色光トランスイルミネーター LEDB-SBOXHP (OptoCode) を設置した 37°C、5%CO₂ インキュベーターに細胞を静置した。mRNA 定量の実験では青

色光を $15\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, $60\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ のいずれかの強度で 3 時間周期で 2 回当てた。発現マーカーを調べる実験では青色光を $60\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の強さで用い、振動は 3 時間周期 1 分照射、持続は 30 分周期 1 分照射によって *Ascl1* を誘導した。

<*in vivo*> マウス海馬領域にレンチウイルスを注入したのち、LED カニューラ (Bio Research Center Co., Ltd) の光ファイバー部分 ($\phi 250\ \mu\text{m}$) を海馬領域に差し込み、デンタルセメントで LED カニューラを頭蓋骨に接着させた。3 日以上経ってから、光照射プログラムとバッテリーを搭載した Optoflash (Bio Research Center Co., Ltd) をマウス頭部に装着し (図 6)、470nm の青色光を [(2 分照射 5 分休止) \times 10 サイクル + 80 分休止] する 2.5 時間周期で照射し *Ascl1* を誘導した。



図 6 : Optoflash を装着した様子 (*写真のマウスは麻酔から覚醒直後)

2.7 成体脳海馬領域へのウイルスインジェクション

マウスを麻酔後に脳定位固定装置で頭部を固定し、皮膚を切開後、左右の海馬領域にあたる位置 (bregma より $x=\pm 1.3\text{mm}$, $y=1.9\text{mm}$) の頭蓋骨にドリルで穴を開けた。ガラス針に $2\mu\text{l}$ のウイルス液を満し、bregma より $x=1.3\text{mm}$, $y=1.9\text{mm}$ の場所から z 軸方向に 1.9mm 針を差し込み、シリンジポンプにより $0.1\mu\text{l}/\text{min}$ の速度でウイルス液を $1\mu\text{l}$ 海馬に注入した。反対側の脳、 $x=-1.3\text{mm}$, $y=1.9\text{mm}$, $z=1.9\text{mm}$ には対照条件のウイルスを注入した。光照射を行わない実験では、ガラス針を抜いたのちに頭部の皮膚を縫合した。

マウスは 3.4 節の *Hes1* の強制発現では 2 か月齢の野生型 (C57BL/6J) オスマウスを、3.5.2 節の光照射実験では 6 か月齢の WT (C57BL/6J) オスマウスを、3.6.4 節の *Hes5* プロモーターと Cre を使った実験では 5-8 か月齢の Ai14 マウスのメス・オスマウスを使用した。

2.8 画像処理と定量

(3.1 節) *Hes1* および *Ki67* のシグナルの輝度測定は ImageJ を用いた。定量する細胞を選択するために、DAPI チャンネルを二値化してから細胞核の輪郭を抽出し、Binary の Watershed より重なった部分に境界をいれた。Analyze Particles より個々の細胞の ROI 情

報を取得し、Hes1, Ki67 のチャンネルと照合して、Hes1 または Ki67 陽性細胞の核の境界が正しく認識されている細胞を選択した。境界の誤った ROI 情報は Polygon Selection により手動で修正して細胞核を選択した。これらの細胞について、Hes1, Ki67 の輝度(核内輝度値の総計を面積で割ったもの)を測定し、Ki67 の輝度が一定基準を超えるものを Ki67 陽性細胞、一定値を下回るものを Ki67 陰性細胞とした。各 Hes1 の輝度を各 DAPI の輝度で割ったものを y 値として散布図を作成した。

(3.4 節) 脳切片は前後軸に沿って 10 枚ごとに採取し染色を行い、インジェクション時の針の挿入によるダメージを受けている切片を除外して LSM510 で撮影、ImageJ で解析した。各切片で SGZ にある Venus 陽性細胞と、Venus と MCM2 二重陽性細胞の数をカウントし、各切片から得られた数値を合計したのちに、Venus 陽性細胞中の MCM2 陽性細胞の割合を算出し、その個体の解析結果とした。これらの結果を用いて、それぞれの条件の平均値と標準偏差、標準誤差を算出した。

(3.5.2 節) 脳切片は前後軸に沿って 10 枚ごとに採取し染色を行い、インジェクション時の針の挿入によるダメージを受けている切片を除外して LSM510 で撮影、ImageJ で解析した。各切片で SGZ にある mCherry 陽性細胞、Venus 陽性細胞をカウントし、さらにウイルス感染している細胞のうち、DCX 陽性細胞、Ki67 陽性細胞、Ascl1 陽性細胞をカウントし、各切片から得られた数値を合計した。mCherry 陽性かつ Venus 陰性の細胞数を分母、mCherry 陽性かつ Venus 陰性の細胞のうち、DCX, Ki67, Ascl1 それぞれ陽性である細胞数を分子として百分率を計算した(single)。さらに mCherry と Venus の二重陽性細胞数を分母、mCherry, Venus 二重陽性細胞のうち DCX, Ki67, Ascl1 それぞれ陽性である細胞数を分子として百分率を計算し(double)、その個体の解析結果とした。これらの結果を用いて、それぞれの条件の平均値と標準偏差、標準誤差を算出した。

(3.6.4 節) 脳切片は前後軸に沿って 6 枚ごとに採取し染色を行い、インジェクション時の針の挿入によるダメージを受けている切片を除外して LSM780 で撮影した。細胞の形態を観察するために 22 μ m の stack (Z 方向に 2 μ m インターバル、計 12 枚)と 1x2 のタイリングを行い撮像し、Stitching および Maximum intensity projection 処理を行った画像を ZEN ソフトウェアで解析した。各切片で SGZ にある tdTomato 陽性細胞数をカウントし、そのなかの DCX, MCM2 陽性細胞数をカウントした。各切片から得られた数値を合計したのちに、tdTomato 陽性細胞中の MCM2 もしくは DCX 陽性細胞の割合を算出し、その個体の解析結果とした。3.6.5 節では tdTomato 陽性細胞の形態より細胞を分類し、Radial glial cell の形態をもち、GFAP, Sox2 の両方を発現するものを Radial glial cell にカウントし、GFAP, Sox2 をどちらも発現していないものを Undetermined に分類した。さらに、突起を持たない Non-radial glial cell は、GFAP, Sox2 どちらかを発現していれば GS(+)に分類し、どちらも発現していないものを GS(-)に分類して、各細胞種の割合を算出し、その個体の解析結果とした。これらの結果を用いて、それぞれの条件の平均値と標準偏差、標準誤差を算出した。

第3章 結果

3.1 Hes1 は活性化神経幹細胞に比べ静止神経幹細胞で発現レベルが高い

Ascl1 は、成体神経幹細胞の静止状態で発現していないが活性化状態において発現していることが報告されている (Pastrana et al., 2009) (Kim et al., 2011) (Andersen et al., 2014)。一方で Hes1 については調べられていなかったことから、静止状態と活性化状態の神経幹細胞における Hes1 の発現を免疫染色により調べた。最初に Hes1 が神経幹細胞特異的に発現しているかを確認するため、神経幹細胞のマーカーである *Nestin* プロモーター下流で mCherry を発現する Nestin-mCherry-NLS マウスを用いて、同じく神経幹細胞のマーカーである GFAP と Hes1 を免疫染色した。その結果、SVZ, SGZ 両領域において、Nestin-mCherry および GFAP 陽性細胞特異的に Hes1 の発現がみられた (図 7.A,F)。次に、活性化状態および静止状態にある神経幹細胞の Hes1 の発現レベルを調べるために、GFP のバリエーションである Venus の融合タンパク質、Venus-Hes1 を発現するノックインマウスを使用した。このマウスは内在性の Hes1 の発現パターンを忠実に再現しており、GFP 抗体を用いて Hes1 の発現を検出できる (Imayoshi et al., 2013)。2 か月齢の SVZ, SGZ において、Hes1 とともに増殖細胞のマーカーである Ki67 の発現を抗 Ki67 抗体によって検出し (図 7.B-D,G-I)、Ki67 陽性の活性化状態にある細胞、および Ki67 陰性の静止状態における Hes1 の輝度をプロットした。その結果、両領域において、活性化状態における Hes1 の発現に比べて静止状態では Hes1 の発現が高いことが示唆された (図 7.E,J)。

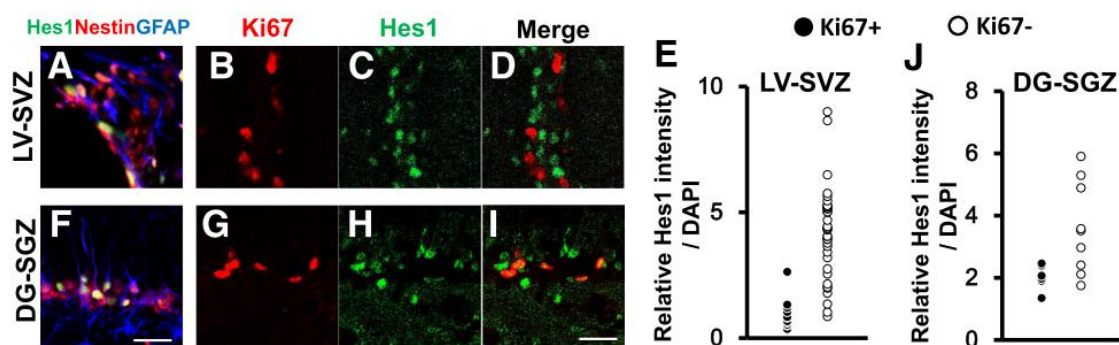


図 7：成体脳神経幹細胞の活性化状態/静止状態における Hes1 の発現レベル

(A,F) 2 か月齢の Nestin-mCherry マウスを用いて、Hes1, GFAP の発現を抗 Hes1 抗体、抗 GFAP 抗体により検出したところ、Nestin+GFAP+ の二重陽性細胞特異的に Hes1 の発現が観察された。(B-D,G-I) 2 か月齢の Venus-Hes1 マウスを用いて GFP 抗体により Hes1 の発現レベルを検出し、Ki67 によって活性化神経幹細胞をラベルした。(E,J) 活性化状態 (Ki67+) および静止状態 (Ki67-) の神経幹細胞における Hes1 発現レベルのプロット。グラフは代表的な 1 匹の結果。他 2 匹も同じ傾向を示した。測定した細胞数 SVZ [Ki67 陽性 : Ki67 陰性 = 12 : 36], SGZ [Ki67 陽性 : Ki67 陰性 = 6 : 9] (図 G-I は播磨有希子博士が取得したもの。) スケールバー : 25 μ m。

この活性化/静止状態における Hes1 発現レベルの変化は、培養神経幹細胞においても確認された。EGF,bFGF 存在下で培養した活性化神経幹細胞および BMP,bFGF 存在下で維持した静止神経幹細胞における Hes1 の発現レベルを western blot により定量し比較したところ、静止状態では約 2.7 倍の Hes1 の発現量の増加が認められた(図 8.A,C)。一方で Ascl1 は 1/7 倍に減少していた(図 8.A,B)。この western blot 実験と解析は播磨有希子博士により行われた。

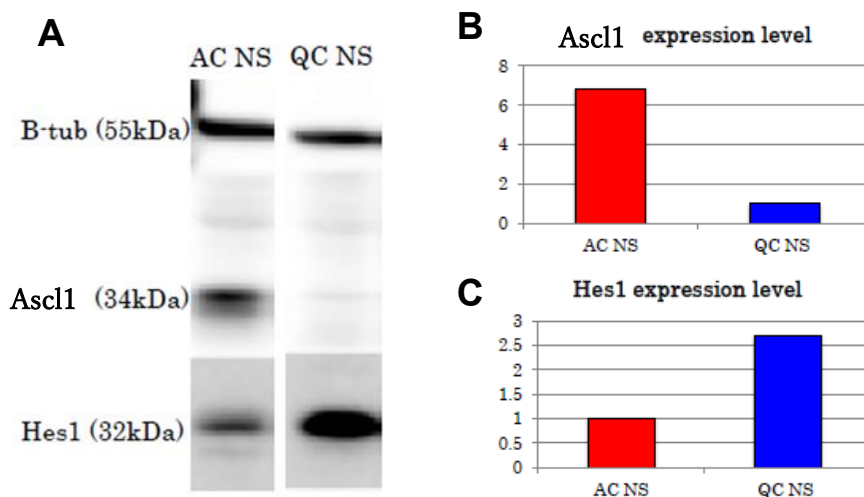


図 8：培養神経幹細胞の活性化状態/静止状態における Hes1, Ascl1 の発現レベル (A)活性化状態(AC)と静止状態(QC)において Ascl1 と Hes1 の発現量を western blotting により解析した。(B)Ascl1 のバンドの定量結果。Ascl1 の発現量は静止状態で 1/7 倍に減少した。(C)Hes1 のバンドの定量結果。Hes1 の発現量は静止状態で 2.7 倍に増加した。(データは播磨有希子博士が取得したもの。)

3.2 Hes1 および Ascl1 は振動発現を成体神経幹細胞で行う

3.2.1 Hes1 および Ascl1 は静止状態および活性化状態の移行期に発現レベルを変化させる

3.1 節において、Venus-Hes1 ノックインマウスにおける Hes1 の発現を GFP 抗体で検出したところ Hes1 の発現レベルに大きなバラつきがみられたことから、静止状態において Hes1 は発現振動を行うのではないかと仮説を立てた。発現動態を調べるために、内在性の Hes1 の発現パターンを忠実に再現する、Luciferase2(Luc2)と Hes1 の融合タンパク質を発現する Luc2-Hes1 BAC Tg マウスより樹立された培養神経幹細胞を用いて、発光のタイムラプスイメージングにより Hes1 の発現を可視化した。EGF,bFGF の存在下で活性化状態にある神経幹細胞では、Hes1 の 2-3 時間周期での発現がこれまでの報告どおり観察された。一方で、BMP, bFGF を含む培養液に置換してから 1 日後にタイムラプス撮影を開始し、活性化状態から静止状態への移行期の Hes1 の発現パターンを調べたところ、Hes1 の発現レベルは徐々に上昇し、かつ振動の周期が長くなる傾向にあった(図 9)。さらに、静止状態で Hes1 の発現が低くなる時点(谷)において、活性化状態の平均の Hes1 発現レベルよりも高い傾向がみられた。この Luc2-Hes1 のイメージング実験と解析は播磨有希子博士により行われた。

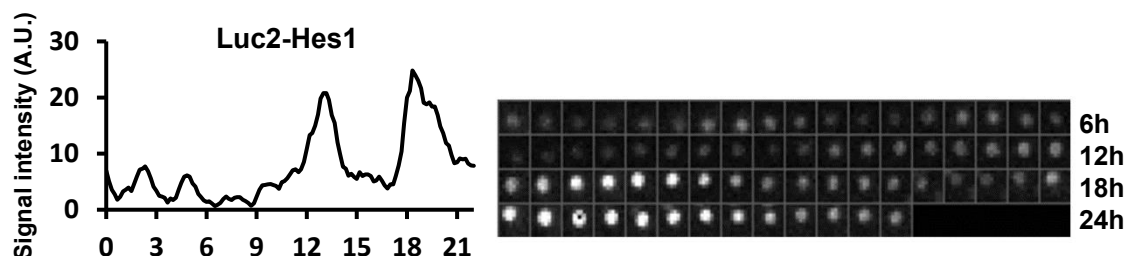


図 9: Hes1 は静止状態への移行期に徐々に発現レベルを増加させる

Luc2-Hes1 培養神経幹細胞を活性化状態から静止状態を誘導する培地に置換して、1 日後にタイムラプス撮影を開始した。代表的な 1 細胞の発現動態 (左) とそのモニタージュ画像 (右)。(データは播磨有希子博士が取得したもの。)

次に、内在性の Ascl1 の発現パターンを忠実に再現する、Luciferase2(Luc2)と Ascl1 の融合タンパク質を発現する Luc2-Ascl1 BAC Tg マウス(Imayoshi et al., 2013)より樹立された培養神経幹細胞を用いて、発光タイムラプスイメージングにより Ascl1 の発現動態を調べた。静止神経幹細胞が活性化される際の発現動態に着目するため、まず神経幹細胞を静止状

態に誘導し、その後活性化条件の培地に置換してからタイムラプス撮影を開始した。また、培地を置換する際、細胞核をラベルするために核プローブである SiR-DNA を添加した。その結果、静止状態では *Ascl1* の発現がみられないが、培地の置換から約 1 日後に振動しながら発現レベルを上昇させた(図 10.グラフ、モンタージュ画像黒)。また、細胞核の蛍光強度は変化しない(図 10.モンタージュ画像赤)ことから *Luc2-Ascl1* の発現変動は細胞のフォーカスのずれ等に起因するものではなく、核内で振動発現していることが示された。

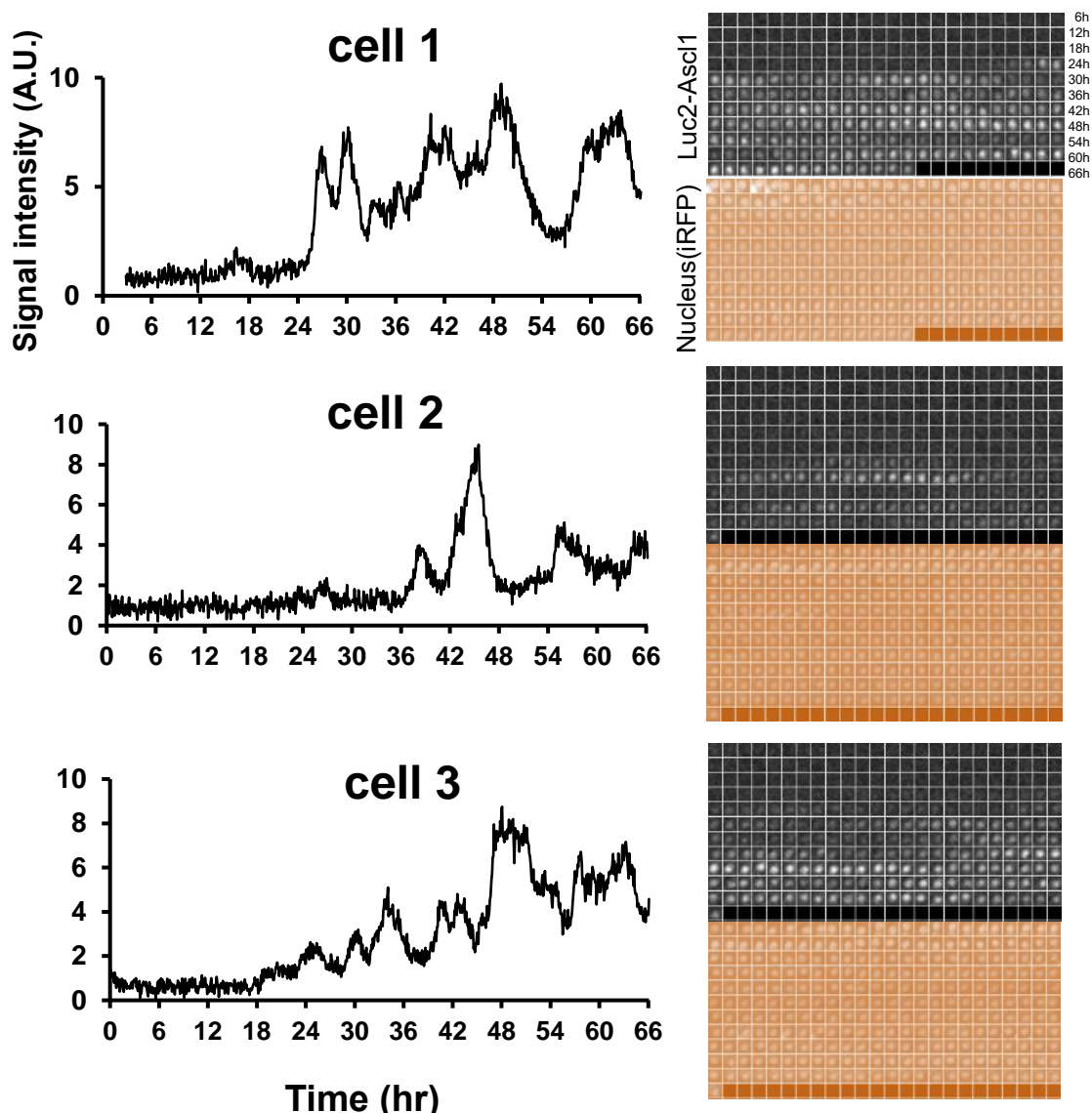


図 10： *Ascl1* は活性化状態への移行期に徐々に発現レベルを増加させる

Luc2-Ascl1 培養神経幹細胞を静止状態から活性化状態に誘導する培地に置換してすぐにタイムラプス撮影を開始した。代表的な 3 細胞の発現動態(左)とそのモンタージュ画像(右、黒)。核プローブ (SiR-DNA) を用いて細胞核をラベルした (右、赤)。

3.2.2 成体脳スライス中の神経幹細胞において Hes1 および Ascl1 は振動発現を行う

次に、より生体に近い条件における Hes1 や Ascl1 の発現を観察するために、前述の Luc2-Hes1, Luc2-Ascl1 マウスの2か月齢の脳スライスを用いて発光タイムラプス観察をおこなった。神経幹細胞の核をラベルするために、Nestin-mCherry-NLS マウスとかけあわせ、SVZ,SGZ の両領域で、Hes1 と Ascl1 の発現をそれぞれ調べた。その結果、SVZ,SGZ ともに、Nestin-mCherry を発現する神経幹細胞のうちの一部で Luc2-Hes1 の発現が観察され、さらにそれらは振動発現することが明らかになった (図 11.A,B)。

さらに Luc2-Ascl1 についても、SVZ,SGZ ともに、Nestin-mCherry を発現する神経幹細胞のうちの一部で振動発現が観察された (図 11.C,D)。Ascl1 の発現は神経前駆細胞において高くなる報告があることから(Kim et al., 2011)、本データにおける Nestin-mCherry の発現レベルが低く Ascl1 の発現が高いものは神経前駆細胞であると推測される (図 11.C,D cell 6, cell 8)。以上より、Hes1 や Ascl1 は、胎仔期だけでなく成体神経幹細胞においても、その発現をダイナミックに変化させていることが明らかになった。

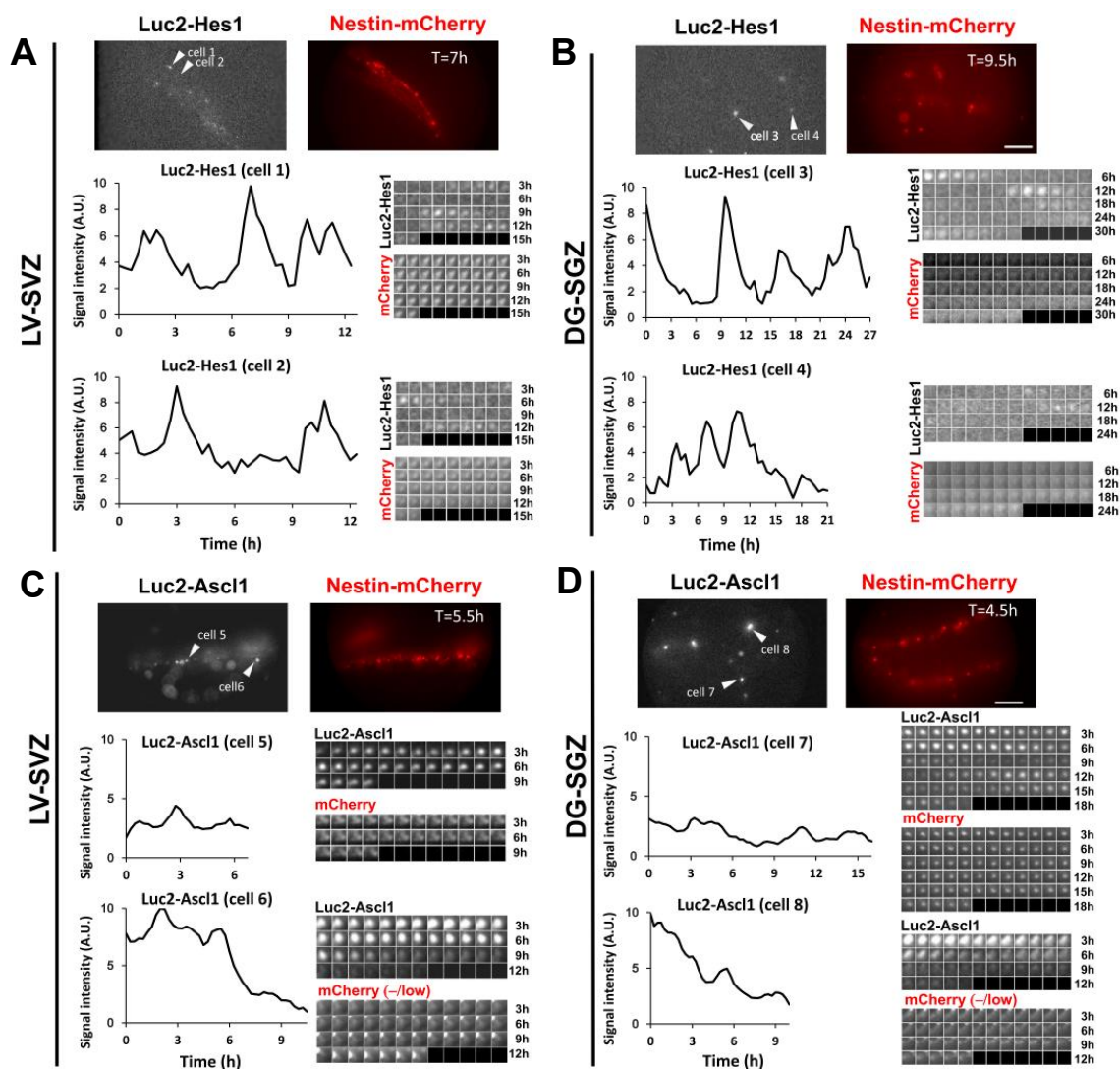


図 11 : SVZ、SGZ における Hes1 と Ascl1 の発現動態

(A,B) 2 か月齢の Luc2-Hes1 マウスより調製した脳スライス SVZ(A),SGZ(B)における Luc2-Hes1 の発現動態。(C,D) 2 か月齢の Luc2-Ascl11 マウスより調製した脳スライス SVZ(C),SGZ(D)における Luc2-Ascl1 の発現動態。Nestin-mCherry を発現する細胞を神経幹細胞とした。スケールバー : 100 μ m。

3.3 *Hes1* のノックアウトは *Ascl1* の発現を一過性に亢進させる

前述の結果より、静止状態の神経幹細胞で *Hes1* の発現が高いことが確認された。*Hes1* の発現が成体神経幹細胞の維持に必要であるか調べるために、*Hes1* ノックアウトマウスの解析を行った。この実験と解析は今吉格博士により行われた。神経幹細胞特異的に *Hes1* をノックアウトするため、神経幹細胞特異的プロモーター下流で DNA 組み換え酵素を発現する Nestin-CreERt2 マウスと、Cre 依存的に *Hes1* 遺伝子が切り出される *Hes1* floxed マウスをかけあわせ、2 か月齢でタモキシフェンを投与して *Hes1* のノックアウトを行った。しかしながら、静止神経幹細胞の維持に変化は見られず（データ省略）、他の *Hes* ファミリー遺伝子が *Hes1* の機能を補償した可能性が考えられた。そのため、*Hes3*, *Hes5*, *Hey1* 遺伝子のノックアウトマウスをさらかけあわせた。この *Hes3*, *Hes5*, *Hey1* 遺伝子トリプルノックアウトマウスは、おそらく *Hes1* が機能を補償するために、通常のマウスと同様の発生や成体神経幹細胞の維持を行う。Nestin-CreERt2, *Hes1* floxed, *Hes3*^{-/-}, *Hes5*^{-/-}, *Hey1*^{-/-} マウスに対して2 か月齢でタモキシフェンを与え、*Hes1* を欠損したときの SVZ, SGZ の神経幹細胞が発現するマーカーを調べた。一方、タモキシフェンを投与しない *Hes1* floxed, *Hes3*^{-/-}, *Hes5*^{-/-}, *Hey1*^{-/-} マウスをコントロールとして用いた。脳の固定はタモキシフェン投与から10日後、3週間後、3か月後のタイムポイントで行った。

SVZ において、*Hes1* 欠損から10日後には、*Ascl1* を発現する細胞数、BrdU の取り込みを行う増殖細胞数、および細胞周期のマーカーである Cyclin D1 陽性細胞数が、コントロールに比べて顕著に増加した（図 12. A-H, Y, Z）。*Hes1* 欠損から3週間後には、*Ascl1* を発現する神経幹細胞数、BrdU の取り込みを行う増殖細胞数、さらにニューロン分化マーカーである DCX を発現する細胞数が、コントロールに比べ顕著に増加した（図 12. I-P, Y, Z）。一方で *Hes1* 欠損から3か月後には、*Ascl1* を発現する神経幹細胞がほとんど見られず、BrdU 陽性細胞および DCX 陽性細胞の数も有意に減少した（図 12. Q-X, Y, Z）。

SGZ でも同様に、*Hes1* 欠損から3週間後には、DCX を発現する細胞数はコントロールに比べ増加しており、*Ascl1* や、活性化神経幹細胞のマーカーである GFAP, MCM2 を共発現する細胞数も増加傾向にあった（図 12. AA-AC, AD-AF, AO）。一方 *Hes1* 欠損から3か月後には、DCX や、GFAP, MCM2 を共発現する細胞、および BrdU 取り込みを行う細胞数はコントロールに比べ減少した。*Ascl1* を発現する細胞数も減少傾向にあった（図 12. AG-AJ, AK-AN, AO）。

Hes1, *Hes3*, *Hes5*, *Hey1* ノックアウトマウスでは、成体神経幹細胞は *Ascl1* 依存的にニューロン新生を引き起こすが一過性であり、神経幹細胞が枯渇するためにニューロン新生が止まると考えられた。以上から、*Hes1* と *Hes* 関連遺伝子は協調して *Ascl1* によるニューロン新生を抑制しており、成体神経幹細胞の維持にはたらくことが示唆された。

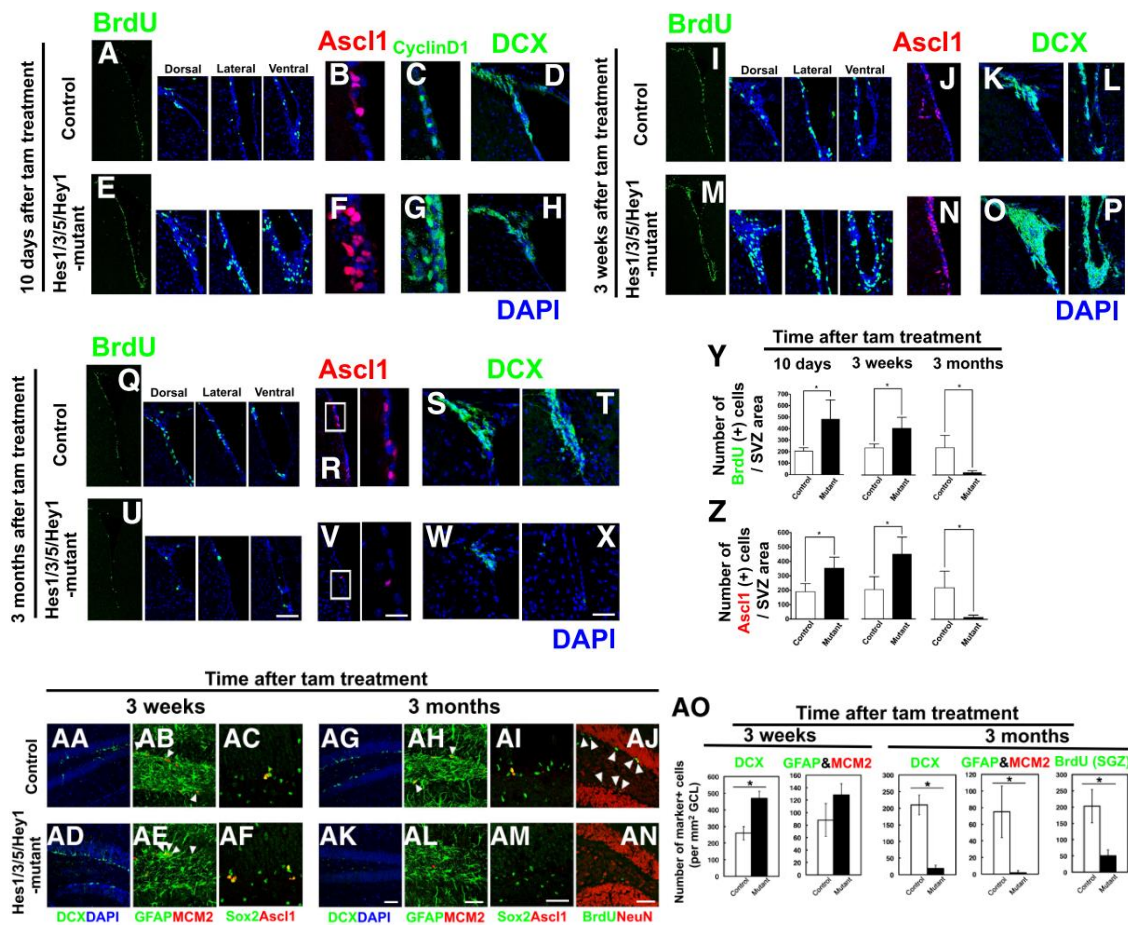


図 12: *Hes1* と *Hes* 関連遺伝子のノックアウトにより *Ascl1* の発現が上昇する

コントロールの *Hes1*^{floxed/floxed}; *Hes3*^{-/-}; *Hes5*^{-/-}; *Hey1*^{-/-} マウスと *Hes1/3/5/Hey1* ノックアウトマウスの SVZ(A-Z)と SGZ(AA-AO)の免疫染色結果。(A-H)オイルを投与したコントロール(A-D)、タモキシフェンを投与した *Hes1* と関連遺伝子ノックアウトマウス(E-H)の10日後の解析。(I-P)オイルを投与したコントロール(I-L)、タモキシフェンを投与した *Hes1* と関連遺伝子ノックアウトマウス(M-P)の3週間後の解析。(Q-X)オイルを投与したコントロール(Q-T)、タモキシフェンを投与した *Hes1* と関連遺伝子ノックアウトマウス(U-X)の3か月後の解析。(R,V)画像中の四角で囲った部分を拡大したものが右の画像。(Y,Z)10日後(左)、3週間後(中央)、3か月後(右)のBrdU(Y)およびAscl1(Z)陽性細胞数。BrdUは脳固定の2時間前に投与された。

(AA-AN)オイルを投与したコントロール(AA-AC,AG-AJ)、タモキシフェンを投与した *Hes1* と関連遺伝子ノックアウトマウス(AD-AF,AK-AN)の3週間後および3か月後の解析。(AO)コントロールおよび *Hes1* と関連遺伝子ノックアウトマウスの3週間後、3か月後におけるDCX,GFAP,MCM2,BrdU陽性細胞数のカウント結果。BrdUは脳固定の7日前より毎日投与された。(データは今吉格博士が取得したもの。)

(*) P < 0.05, t検定。スケールバー: 50 μm。

3.4 Hes1 強制発現は Ascl1 の発現と細胞増殖を抑制する

さらに Hes1 の機能を調べるため、Hes1 の強制発現を誘導して Ascl1 の発現やニューロン新生の割合を評価した。SVZ における Hes1 強制発現の実験と解析は今吉格博士により行われ、SGZ における Hes1 強制発現の実験と解析は筆者が行った。

SVZ では、Hes1 の強制発現を神経幹細胞特異的に誘導するために、Nestin-CreERt2 マウスと Rosa26-lox-stop-lox-Hes1-iresGFP マウスをかけあわせ、さらに 2 か月齢でタモキシフェンを投与することで、Cre 依存的に stop カセットを切り出し、恒常的な Hes1 の発現を誘導した。コントロールは、タモキシフェン依存的に CFP のみが誘導される、Nestin-CreERt2, Rosa26-lox-stop-lox-CFP マウスを使用した(図 13. A)。Hes1 の強制発現誘導から 1 週間後の脳をとりだし、GFP でラベルされた細胞を解析した結果、CFP を発現するコントロールに比べて、Ascl1 を発現する細胞数や BrdU 取り込みを行う細胞数が顕著に減少していた(図 13. B,C,F,G,J,K)。Hes1 の強制発現では GFAP を発現する細胞が多く、DCX を発現する細胞は稀であった(図 13. D,E,H,I)。

SGZ では、上記のマウスを用いた場合ラベルされる細胞数が少なく定量できなかった。そこで、EF プロモーター下流で Hes1 を発現するレンチウイルスを SGZ に導入して Hes1 の強制発現を誘導した(図 13. L)。その結果、Venus のみを発現するコントロールの条件に比べて、Hes1 強制発現の条件では、GFAP の発現は観察されたが(図 13. O,S)、MCM2, Ascl1, DCX を発現する細胞は少ない傾向にあった(図 13. M,N,P,Q,R,T,U)。

これらの結果から、Hes1 の持続発現は Ascl1 の発現を抑制してニューロン新生を抑制するだけでなく、細胞増殖を抑制して静止状態の神経幹細胞を維持していることが示唆された。

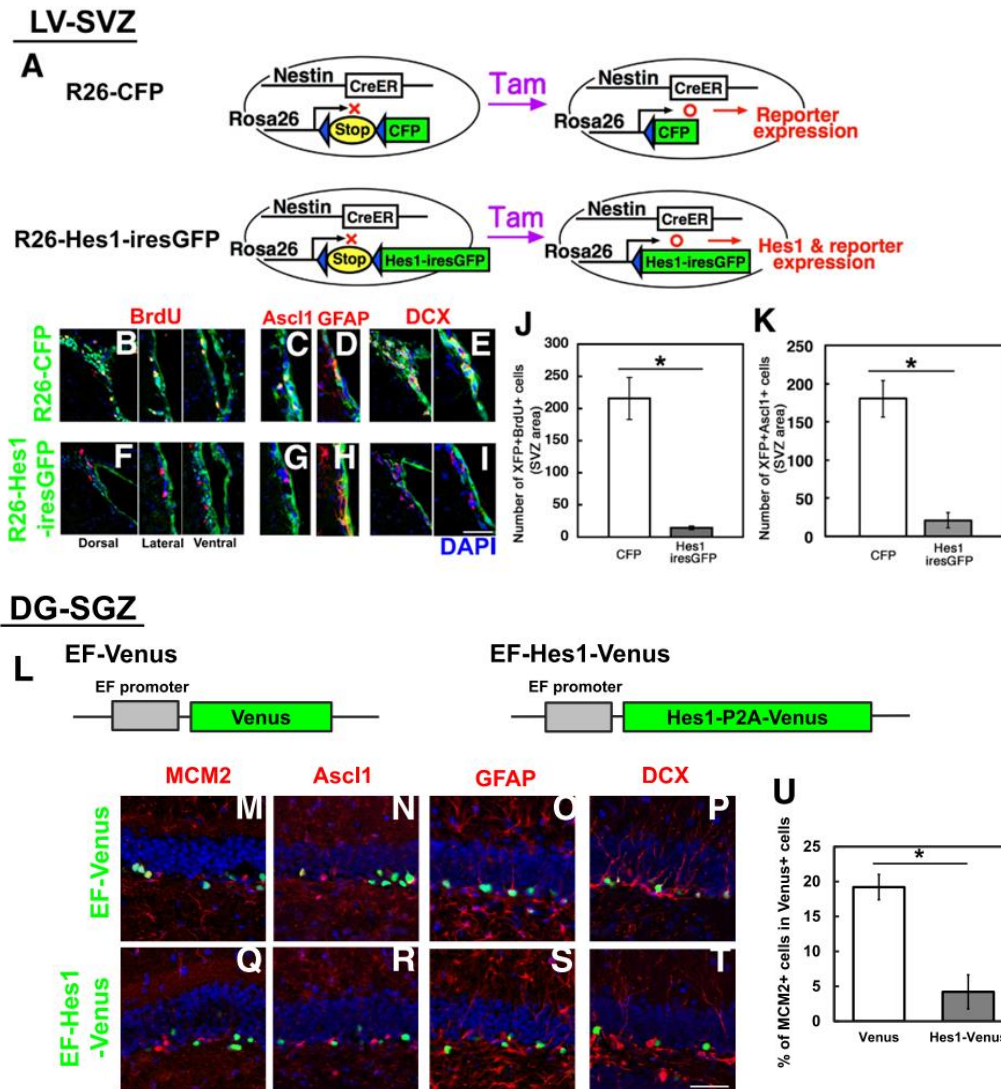


図 13 : Hes1 の強制発現により Ascl1 は発現抑制され静止状態を維持する
 (A)タモキシフェン投与により起こる神経幹細胞内での遺伝子発現誘導。(B-I)コントロール(B-E)および Hes1 強制発現マウス(F-I)にタモキシフェンを投与してから1週間後のSVZの免疫染色結果。BrdUは脳固定の2時間前に投与された。(J,K) CFP陽性(コントロール)および Hes1-iresGFP陽性(Hes1強制発現マウス)細胞におけるBrdU取り込み細胞(J)とAscl1陽性細胞(K)の定量結果。(B-Kのデータは今吉格博士が取得したもの。)
 (L)SGZ領域に導入したレンチウイルスベクターのコンストラクト。(M-T)コントロール(M-P)および Hes1 強制発現(Q-T)を誘導してから1週間後のSGZの免疫染色結果。
 (U)Venus陽性細胞および Hes1-Venus陽性細胞におけるMCM2陽性細胞の定量結果。3匹のマウスについて解析した。計 Venus=99, Hes1-Venus=81細胞を計測した。
 (*) $P < 0.05$, t検定。スケールバー: 50 μm (B-I); 30 μm (M-T)。

3.5 Ascl1 を光遺伝学的手法で誘導することで静止状態の神経幹細胞は活性化される

上記の結果から、Hes1 の高発現による Ascl1 の発現抑制が静止状態を維持していること、成体神経幹細胞でも活性化状態では Ascl1 の発現が振動していることが明らかになった。次に、静止状態の神経幹細胞に Ascl1 の振動発現を誘導することによって活性化が可能かどうか、レンチウイルスベクターを用いて Ascl1 の遺伝子発現誘導を行い調べた。

3.5.1 Ascl1 を E47 と共に誘導することで静止状態の培養神経幹細胞を活性化できる

本実験は、播磨有希子博士により行われた。まず、静止状態の神経幹細胞に、EF プロモーターを利用した Ascl1 の誘導を行った。しかしながら、静止状態の活性化およびニューロン分化を誘導することはできず、静止状態で誘導される Ascl1 は不安定ですぐに分解されると考えられた。Ascl1 を安定的に発現させるためには、Ascl1 と二量体を形成する E47 を共発現させ、さらに Tethering 配列を用いて両者を繋ぐ誘導法が効果的であると報告されている (Geoffroy et al., 2009)。そこで、EF プロモーター下流で Ascl1-E47 の発現を誘導したところ、静止神経幹細胞の多くは Ki67 を発現する活性化状態になった (データ省略)。

次に、Ascl1-E47 の振動発現を誘導するために、光遺伝学的手法を用いた。これは、EF プロモーター下流で GAVPO (光応答性の転写因子) を発現するウイルスと、UAS プロモーター下流で Ascl1-E47 を発現するウイルスの 2 種類を神経幹細胞に感染させ、光照射依存的に Ascl1-E47 の転写をコントロールする技術である (Imayoshi et al., 2013)。静止神経幹細胞に 3 時間周期の光照射で Ascl1-E47 を誘導し、mRNA の量を Real-time qPCR により計測したところ、Ascl1 だけでなく下流の Dll1 も Ascl1 が誘導されたあとに転写活性を上げた (図 14)。つまり Ascl1 の活性は 3 時間周期で誘導されていることが示唆された。

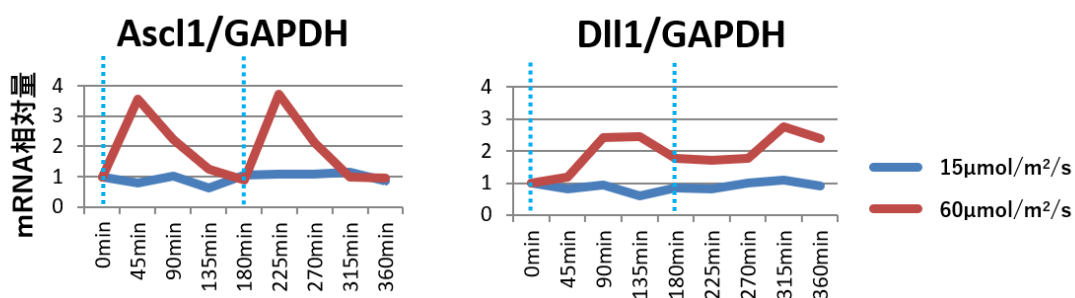


図 14 : Ascl1 の下流で Dll1 が振動発現を引き起こす

2 種の光強度, 15 μmol/m²/s, 60 μmol/m²/s における Ascl1 および Dll1 の mRNA レベルを qPCR により定量した。培養神経幹細胞を静止状態に誘導してから 3 日後に 3 時間周期で 1 分間の光照射 (水色点線) を行い、45 分ごとに細胞を回収した。RNA 精製後に逆転写反応を行い、qPCR を行った。60 μmol/m²/s で Ascl1 の転写および下流の Dll1 の転写も誘導されたため、以降の実験もこの光強度を用いた。(データは播磨有希子博士が取得したもの。)

さらに、静止状態の神経幹細胞に3時間周期の光照射で Ascl1-E47 の振動発現(図 15. A)を、30分周期の光照射で Ascl1-E47 の持続発現(図 15. B)を誘導し、4日後、7日後に細胞を固定し解析した結果、振動発現の条件では Ki67 を単独で発現する細胞の割合が高かった(図 15. C,E)。さらに持続発現の条件では DCX を発現するニューロン分化した細胞の割合が高かった(図 15. D,F)。このことから、Ascl1-E47 の振動発現は、持続発現より効率的に神経幹細胞の増殖状態を維持できることが示唆された。

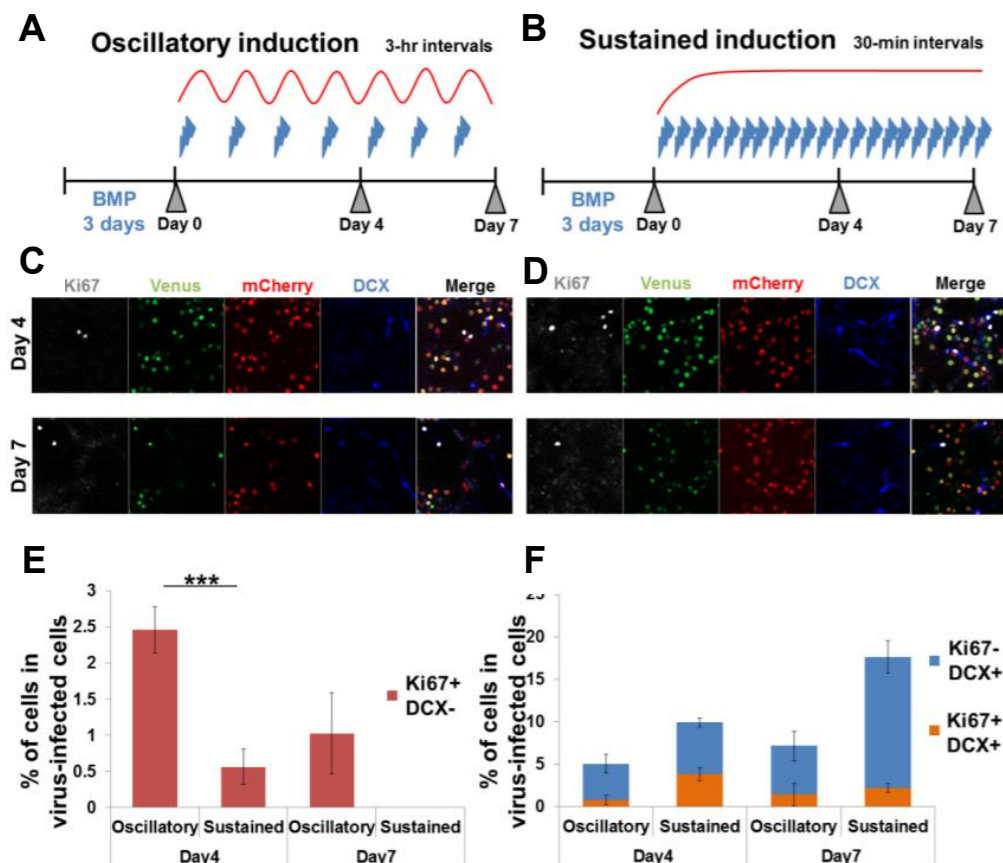


図 15：静止状態の培養神経幹細胞は Ascl1 の振動発現の誘導により活性化される (A,B)青色光照射による Ascl1-E47 の振動発現(A)、持続発現(B)誘導の実験スケジュール。(C,D)Ascl1-E47 の振動発現(C)、持続発現(D)の誘導から4日後、7日後の免疫染色結果。(E)Ki67 陽性かつ DCX 陰性の細胞の割合。(F) Ki67 陽性かつ DCX 陽性、および Ki67 陰性かつ DCX 陽性の割合。(データは播磨有希子博士が取得したもの。)

3.5.2 光遺伝学的手法を用いた Ascl1-E47 の振動発現によって成体脳内の神経幹細胞を活性化できる

本実験は、実験系の立ち上げと初期のデータ取得を播磨有希子博士が、後期のデータ取得を筆者が行った。3.5.1 節の結果から、Ascl1-E47 の持続発現の誘導は、神経幹細胞を早期にニューロン分化させて枯渇させる恐れがある。一方で振動発現の誘導は、効果的に増殖を亢進し、神経幹細胞を維持しつつ細胞数を増やすことができると期待される。成体マウス脳内の神経幹細胞にこのシステムを誘導し活性化するため、脳の SGZ 領域にウイルスインジェクションを行い、さらに光ファイバーを埋め込み 2.5 時間周期の青色光照射を行った(図 16. A,B)。2 か月齢のマウスは活性化神経幹細胞が多数存在し Ascl1 の効果を評価しづらいため、より多くの神経幹細胞が静止状態となっている 6 か月齢のマウスを用いた。光照射による Ascl1-E47 の誘導を 1 週間行った後に脳を固定し解析したところ、GAVPO(mCherry)および Ascl1-E47(Venus)の両ウイルスに感染した細胞では、39%が Ki67 陽性となり、33%が Ascl1 陽性となった(図 16. D-G,H-K,D'-G',H'-K',M,N[double])。さらに 16%が DCX 陽性であった(図 16. C,C',L[double])。一方で、GAVPO(mCherry)のみを発現する細胞では、これらのマーカーをほとんど発現していなかった(図 16. L,M,N [single])。これらの結果から、Ascl1 の光遺伝学的手法による振動発現の誘導は、静止神経幹細胞を効率的に活性化させ、ニューロン分化を誘導することが示唆された。

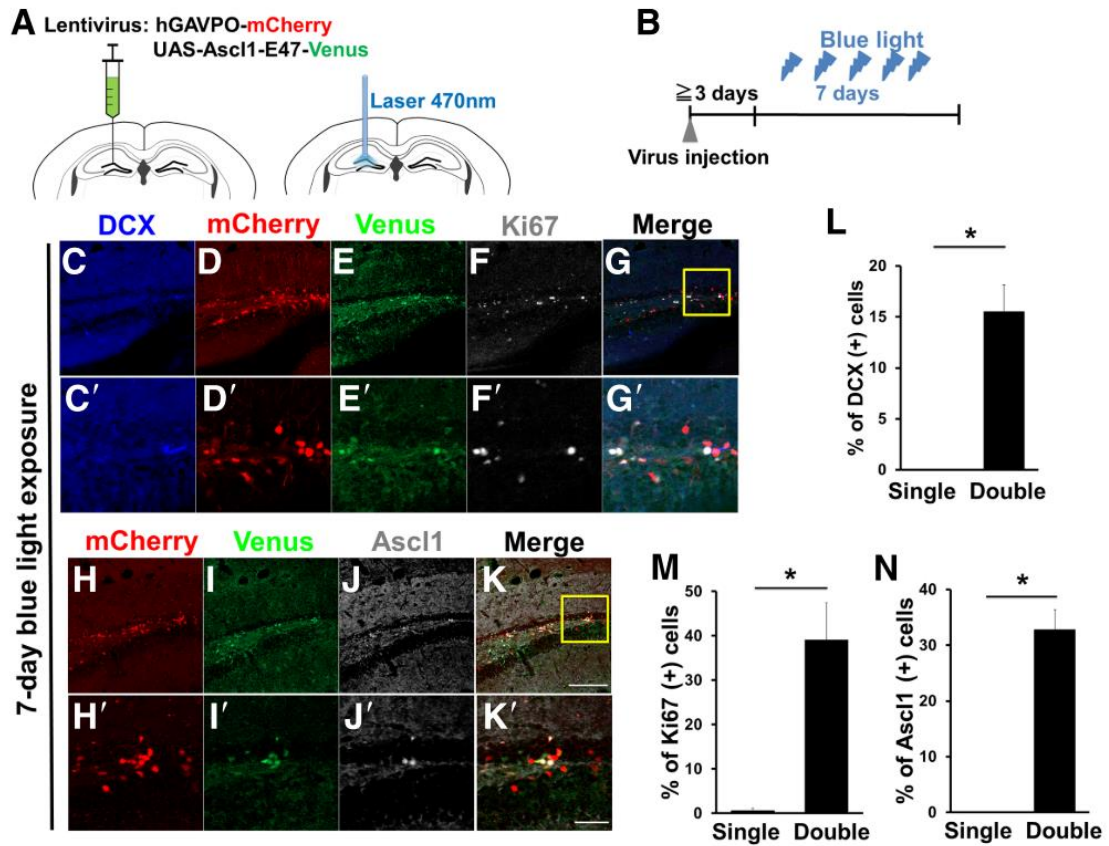


図 16：光遺伝学的手法を用いた *Ascl1* の誘導は神経幹細胞の活性化を効率的に引き起こす (A) SGZ にレンチウイルスベクターを注入したのち、光ファイバーを挿入して青色光を照射した。(B) 光照射はウイルス注入後 3 日以上経ってから開始し、2.5 時間周期で 1 週間照射した。光照射終了の時点で脳を固定した。(C-K') SGZ の免疫染色。G と K の画像中の四角で囲った部分を拡大したものが C'-G' と H'-K'。(L-N) ウイルス感染細胞のマーカー発現解析の定量結果。EF-GAVPO-mCherry のウイルスのみ感染したものを single とし、EF-GAVPO-mCherry と UAS-*Ascl1*-E47-Venus の両方のウイルスが感染したものを double とした。N=1 匹は播磨有希子博士がデータ取得、N=2 匹は筆者がデータ取得し、計 *Ascl1*[single:double=66:18], *Ki67*[single:double=119:28], *DCX*[single:double=121:34] 細胞を計測した。(*) $P < 0.05$, t 検定。スケールバー: 100 μm (C-K); 30 μm (C'-K')。

しかしながら、光誘導を 2 週間行った場合は *Ascl1* を発現する細胞数が少なくなり、*Ascl1* の長期誘導による効果を見ることができなかった。これは青色光に対する応答性が何らかの原因で下がったためと考えられる。

3.6 Ascl1 を *Hes5* プロモーターで誘導することで静止状態の神経幹細胞は長期的に活性化される

3.6.1 *Hes5* プロモーターを用いた Ascl1 の誘導は下流の Dll1 の振動発現を誘導する

光遺伝学的手法を用いた方法では 2.5 時間周期での振動発現を正確に誘導でき、静止神経幹細胞を活性化できたものの、

- ・光による遺伝子発現が 2 週間以降誘導されにくい
- ・二重感染細胞を必要とするために高濃度のウイルスを注入しなければならないが、その影響で DCX 陽性細胞数が減少する
- ・EF プロモーターを用いているため、ニューロンにも GAVPO と Ascl1 の発現が誘導される

という点も問題として残っていた。そこで筆者は光遺伝学的手法を使わず振動発現を誘導する代替法を考案し試した。

Hes のプロモーターは、自身の negative autoregulation により振動発現を誘導するため、まず *Hes1* や *Hes5* プロモーターについて検討した。しかし一般的に *Hes1* は *Hes5* に比べ発現量が低い。実際に蛍光タンパク質 Venus を、*Hes1* プロモーターおよび *Hes5* プロモーター下流で発現するレンチウイルスを培養静止神経幹細胞に感染させた結果、Venus の発現量は *Hes1* プロモーターでは *Hes5* プロモーターに比べて弱かった（データ省略）。よって Ascl1 の十分な発現量を誘導するために、*Hes5* プロモーターを用いた。

さらに、*Hes5* プロモーター活性を Luciferase レポーターでイメージングしたところ、BMP を加えた静止状態においても、2-3 時間周期の振動発現を示した（図 17）。また、*Hes5* プロモーターは神経幹細胞やグリア細胞特異的にはたらき、ニューロンではプロモーター活性がオフとなるために神経幹細胞特異的に遺伝子が誘導可能である。

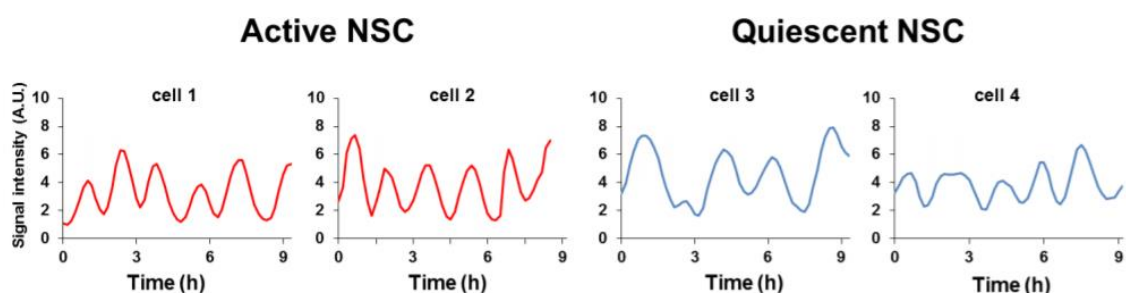


図 17：*Hes5* プロモーターの活性化状態および静止状態における活性 *Hes5* プロモーターにより誘導される Luciferase2 の発現動態。活性化状態および静止状態の神経幹細胞で *Hes5* プロモーターは振動発現を誘導する。

光遺伝学的手法で *Ascl1*-E47 の振動発現を誘導すると下流の *Dll1* の発現が振動することを確認していたため、同様に *pHes5-Ascl1*-E47 でも下流の *Dll1* が振動発現するか調べた。光誘導でプレート上の均一な細胞に振動発現を誘導する場合と異なり、*Hes5* プロモーターを使用する場合はそれぞれの細胞が異なる位相で振動発現していると予想されたため、*Dll1* プロモーター下流で *Luciferase* を発現する培養神経幹細胞を用いて、イメージングにより *Dll1* プロモーターの活性を可視化した。静止状態に誘導し、ウイルスを感染させてから約 30 時間後にタイムラプス撮影を開始したところ、最初は *Dll1* プロモーター活性は OFF でありシグナルが検出されなかったが、徐々に活性が上がり、振動発現を起こした(図 18. A,B)。

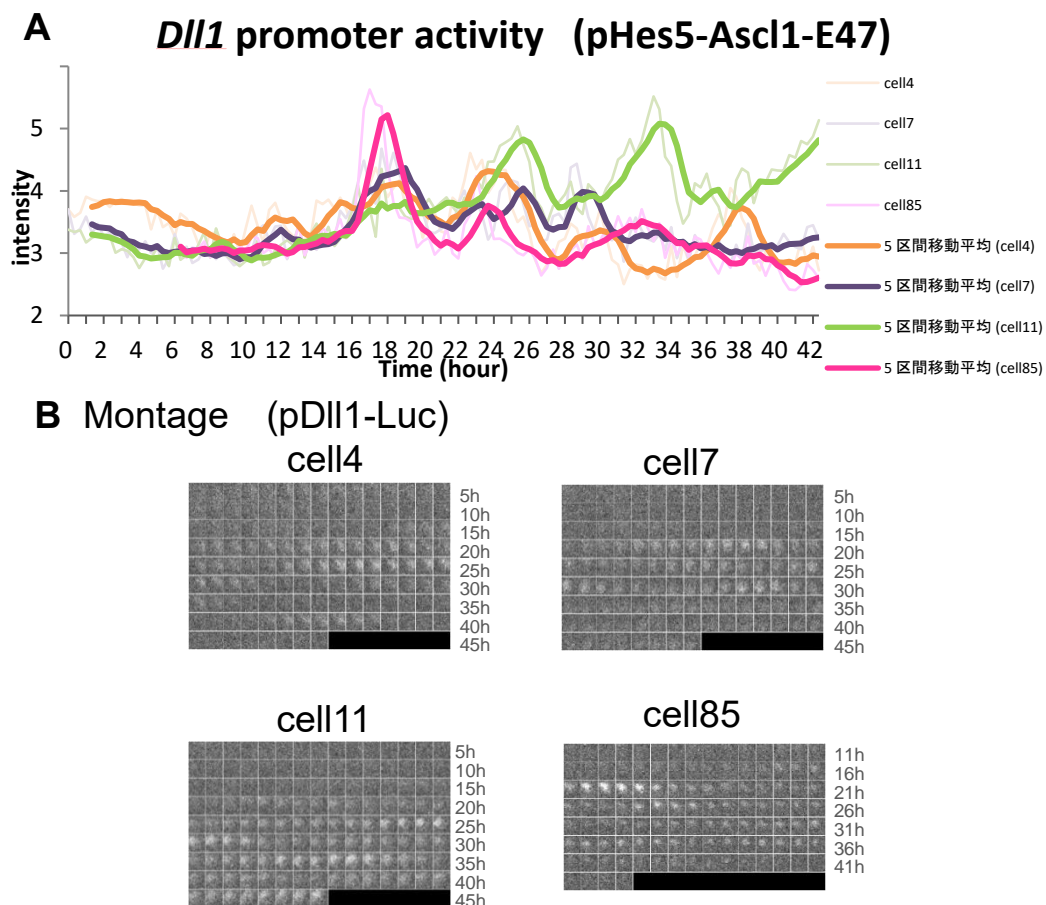


図 18 : *Hes5-Ascl1*-E47 を誘導して引き起こされた *Dll1* プロモーター活性

(A) 静止状態に誘導した *pDll1*-Luc の培養神経幹細胞に *pHes5-Ascl1*-E47-Venus のウイルスを感染させて、Venus 陽性の感染細胞における *Dll1* レポーターの発現を single cell level で定量した。(B) 定量した single cell のモンタージュ画像。

3.6.2 *Hes5* プロモーターによる *Ascl1* の誘導は静止状態の培養神経幹細胞を効率的に活性化する

さらに、*Ascl1* の振動発現と持続発現の効果を比較するために、神経幹細胞特異的に持続発現を誘導する *GFAP* (中間径フィラメントタンパク質 Glial fibrillary acidic protein) プロモーターを対照として用いて、*Ascl1*-E47 の誘導を行った。p*Hes5*-*Ascl1*-E47-Venus および p*GFAP*-*Ascl1*-E47-Venus のレンチウイルスを培養静止神経幹細胞に感染させて4日後、7日後に固定し免疫染色した (図 19. A,B の中央と右)。ウイルス感染し Venus を発現した細胞のうち、Ki67 を単独で発現する活性化神経幹細胞の割合を定量したところ、4日後では *GFAP* よりも *Hes5* プロモーターで割合が高く、*Hes5* プロモーターを使うほうが増殖効率が高いことが示唆された (図 19. C の左)。しかし7日後にはマーカーの発現に大きな差は見られなかった (図 19. D)。また、*Ascl1*-E47 を誘導しない条件では、Venus 陽性細胞のうち DCX, Ki67 を発現するものはほとんどなく、静止状態のままであった (図 19. A, B 左)。

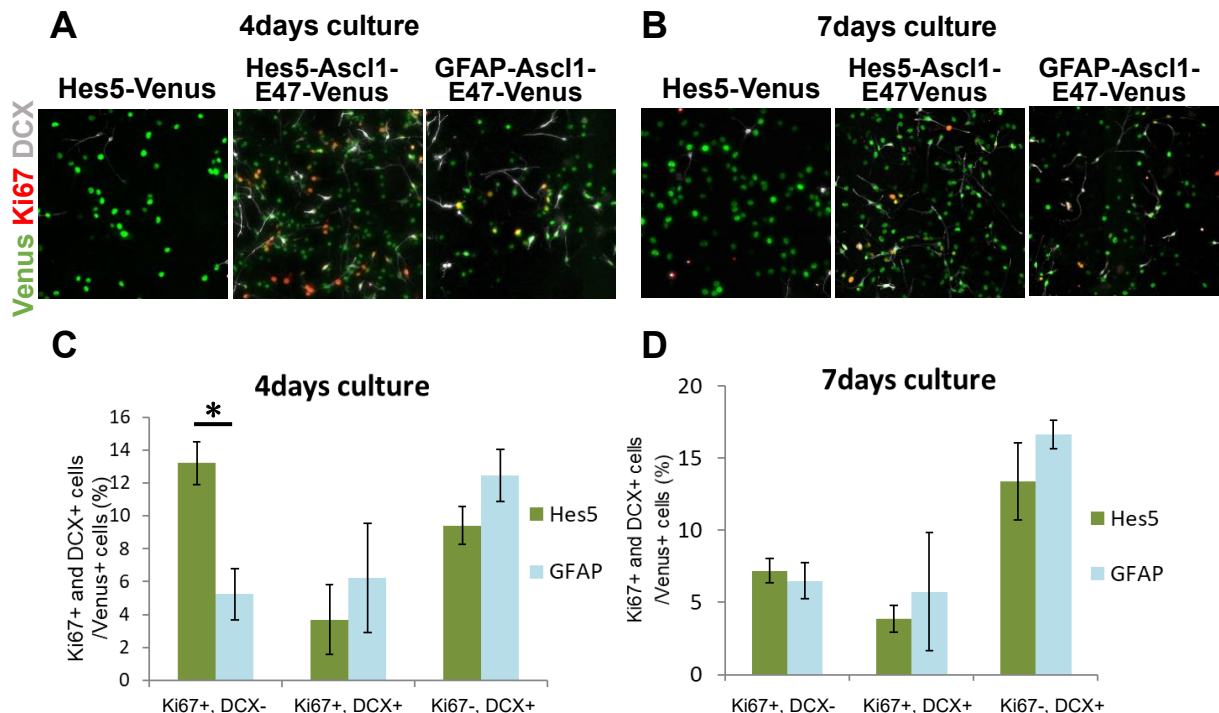


図 19 : *Hes5* および *GFAP* プロモーターにより誘導される *Ascl1* は静止神経幹細胞の活性化とニューロン分化を誘導する

(A,B)コントロールの *Hes5*-Venus および *Hes5*-*Ascl1*-E47-Venus, *GFAP*-*Ascl1*-E47-Venus のウイルスを感染させてから4日後(A)および7日後(B)の免疫染色結果。(C,D)4日後(C)および7日後(D)において Ki67 および DCX を発現する細胞を定量した。サンプル数 N=3。総計 4 日後 [Hes5:GFAP=665 : 357] 7 日後 [Hes5:GFAP=533 : 358] 細胞を計測した。(*) P<0.05, t 検定。

3.6.3 *Hes5* プロモーターは成体脳内で神経幹細胞特異的に発現誘導をおこなう

レンチウイルスに使用している 1.5kbp の *Hes5* プロモーターが、神経幹細胞特異的にはたらくかを調べるために、*Hes5* プロモーター下流で Venus を発現するレンチウイルスを SGZ に注入し、Venus でラベルされた感染細胞が神経幹細胞のマーカーを発現するか確認した。神経幹細胞およびグリア細胞のマーカーである GFAP および Sox2 の発現を免疫染色により調べたところ(図 20. A)、Venus 陽性細胞のうち 77.5%が GFAP を、76.7%が Sox2 を発現していた(図 20. B)。よって *Hes5* プロモーターはニューロンではなく主に神経幹細胞やグリア細胞ではたらくことが示唆された。

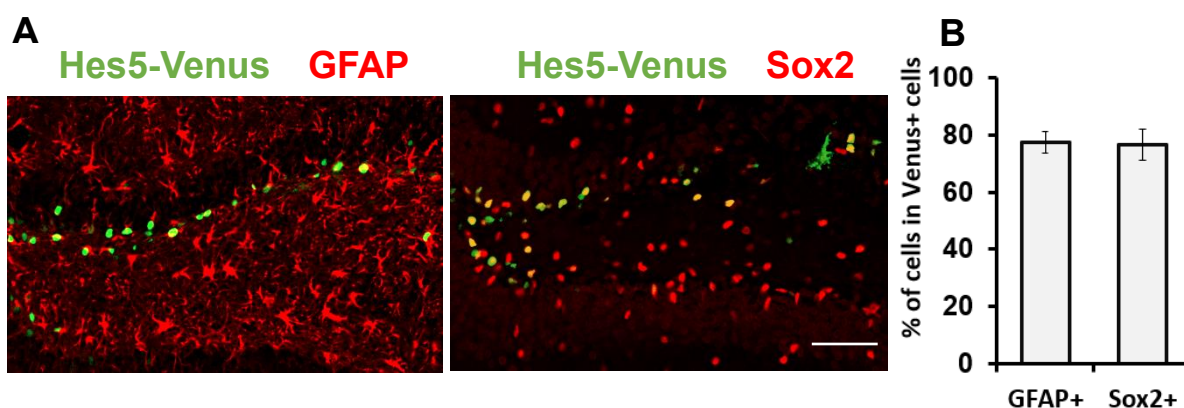


図 20 : pHes5-Venus の発現は神経幹細胞/グリア細胞特異的にみられる

(A)pHes5-Venus のレンチウイルスを SGZ に注入し 4 日後に固定した脳の免疫染色。

(B)Venus 陽性細胞のうちの、Sox2 または GFAP 陽性であった割合。サンプル数 N=3。総計 GFAP:75 , Sox2: 103 細胞を計測した。スケールバー : 50 μ m

3.6.4 *Hes5* プロモーターを用いた *Ascl1* の誘導により、海馬歯状回に存在する静止神経幹細胞を活性化できる

次に、SGZ の神経幹細胞を *Hes5* プロモーターによる *Ascl1*-E47 の発現誘導で活性化できるか調べた。しかし神経幹細胞が活性化したあとに分化した場合は、*Hes5* プロモーターのはたらきが弱くなるため、P2A を利用した蛍光タンパク質ではウイルス感染細胞をニューロン分化後にラベルできないというデメリットが挙げられた。そこで、ウイルスに DNA 組み換え酵素 Cre を導入し、さらに Ai14 マウス (LSL-tdTomato) を利用することで、ウイルス感染した細胞およびその子孫細胞に恒常的な tdTomato の発現が起こり、長期的な感染細胞のラベルが可能となった(図 21. A)。ウイルスは pHes5-*Ascl1*-E47-Cre と、コントロールとして pHes5-Cre の 2 種類を作製し、5-8 か月齢のマウスを使用した。ウイルスインジェクションから 1 週間後および 1 か月後に脳を固定し、免疫染色により増殖率およびニューロン分化率を調べた。その結果、誘導から 1 週間後にはコントロールに比べて *Ascl1* を誘導した個体の SGZ で、MCM2 および DCX を発現する細胞の割合が有意に増加した(図 21. B-H)。さらに、*Ascl1* 誘導から 1 か月後には、コントロールに比べ DCX を発現する細胞の割合が多く(図 21. I-O)、ニューロン新生能を長く保持していることが示唆された。

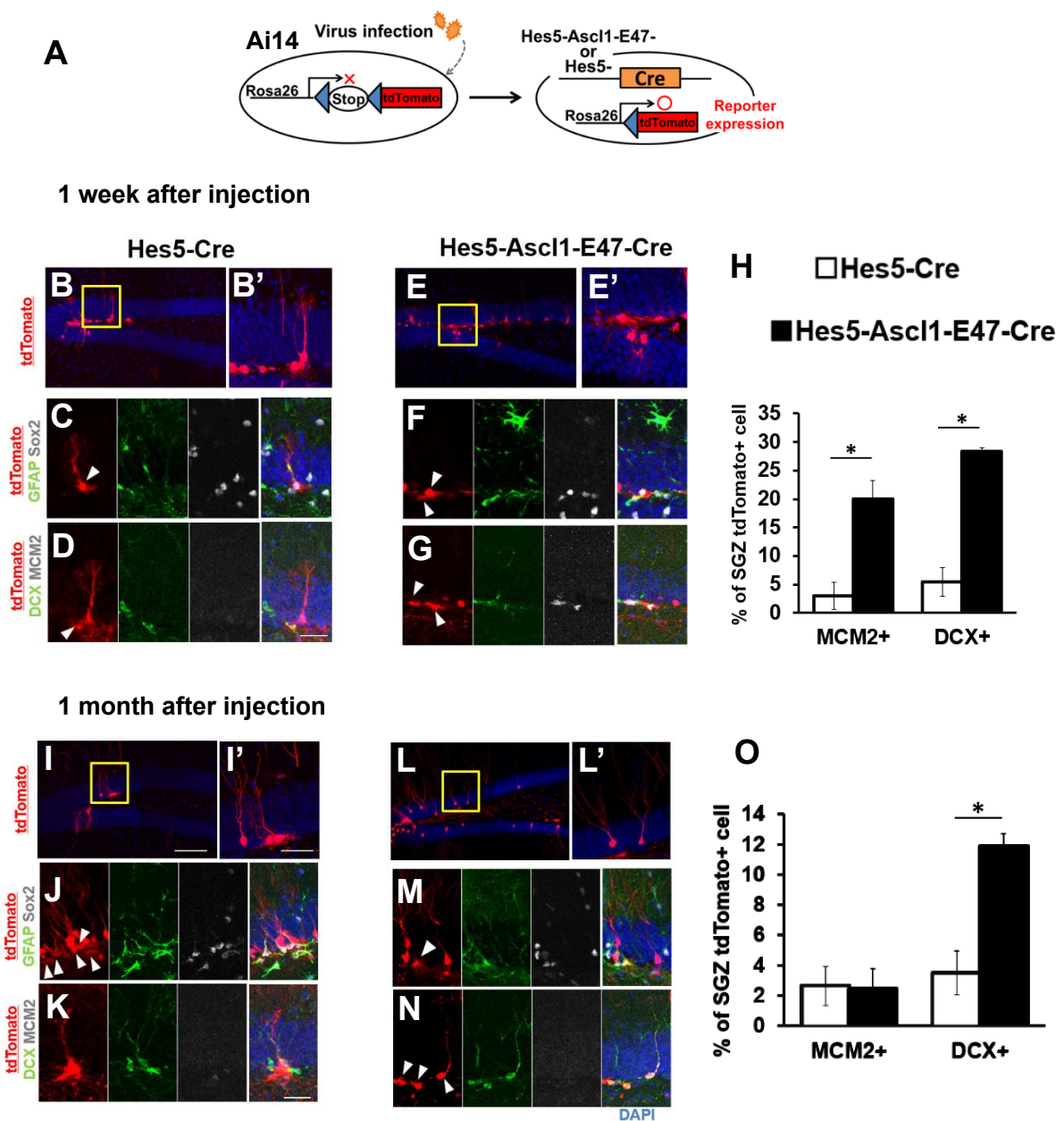


図 21 : pHes5-Ascl1-E47 を成体脳神経幹細胞に導入すると、活性化とニューロン分化の亢進がみられる

(A) Ai14 マウスに Cre を発現するレンチウイルスベクターを注入すると、*Hes5* プロモーターが ON で Cre を発現する細胞で tdTomato が恒常的に発現する。(B–G) コントロールの pHes5-Cre ウイルス (B–D) と pHes5-Ascl1-E47-Cre ウイルス (E–G) を Ai14 マウスの SGZ に注入してから 1 週間後の免疫染色結果。B と E の画像中の四角で囲った部分を拡大したものが B' と E'。(H) pHes5-Cre および pHes5-Ascl1-E47-Cre のウイルスが感染して tdTomato を発現する細胞のうち、MCM2 または DCX を発現する細胞の割合。pHes5-Ascl1-E47-Cre では MCM2 および DCX 陽性細胞の割合がコントロールに比べ有意に上昇した。

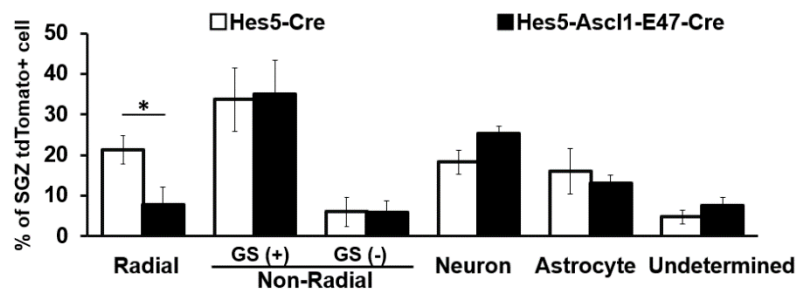
(I-N)コントロールの pHes5-Cre ウイルス(I-K)と pHes5-Ascl1-E47-Cre ウイルス(L-N)を Ai14 マウスの SGZ に注入してから 1 か月後の免疫染色結果。I と L の画像中の四角で囲った部分を拡大したものが I' と L'。 (O)pHes5-Cre および pHes5-Ascl1-E47-Cre のウイルスが感染して tdTomato を発現する細胞のうち、MCM2 または DCX を発現する細胞の割合。 pHes5-Ascl1-E47-Cre では DCX 陽性細胞の割合がコントロールに比べ有意に上昇した。 3 匹のマウスについて解析した。 (*) $P < 0.05$: t 検定。スケールバー: 50 μm (B,E,I,L); 20 μm (B',C,D,E',F,G,I',J,K,L',M,N) tdTomato 陽性細胞 : 計 1 週間後 [コントロール:Ascl1-E47=90:130], 1 か月後 [コントロール:Ascl1-E47=91:119] 細胞を計測した。 arrow head: 各マーカー陽性である tdTomato 陽性細胞。

3.6.5 Ascl1 の誘導により Radial glial cell 数の減少とニューロン数の増加が起こる

Ai14 マウスを使用したことで、ウイルス感染細胞は細胞質に tdTomato を恒常的に発現し、その結果、細胞の形態がわかるようになった。SGZ における神経幹細胞の系譜は、その性質から Type1, Type2, Type3 等に分類されるが、形態からは突起をもった Radial glial cell (Type1 cell), 突起を失った Non-Radial glial cell (Type1,2 含む), Neuron, Astrocyte などに分類可能である。よって形態から細胞種を推定し、さらに GFAP, Sox2 と共染色することで Non-Radial cell の分化傾向を確認した。ウイルス注入から 1 週間後の脳を免疫染色した結果、SGZ において、コントロールでは突起を伸ばした Radial glial cell が多数観察されたが、Ascl1 を導入すると Radial glial cell の割合が有意に減少した(図 22. A)。また 1 か月後も、コントロールでは Radial glial cell が維持されているのに対し、Ascl1 を誘導するとほとんど維持されなくなった(図 22. B)。さらに GFAP や Sox2 を発現する Non-Radial glial cell [GS(+)] も Ascl1 の誘導では少なく、一方で Neuron へ分化中の Non-Radial glial cell [GS(-)]、もしくは Neuron 分化後の細胞の割合はコントロールに比べて増加した。コントロールと Ascl1-E47 誘導の両条件において、アストロサイトやオリゴデンドロサイトに分化した細胞の割合は少なかった(図 22. B)。

以上の結果から、*Hes5* プロモーターを用いた Ascl1 の誘導によって、成体脳の神経幹細胞を活性化させ、さらに長期にわたりニューロン新生を誘導することが可能になった。

A 1 week after injection



B 1 month after injection

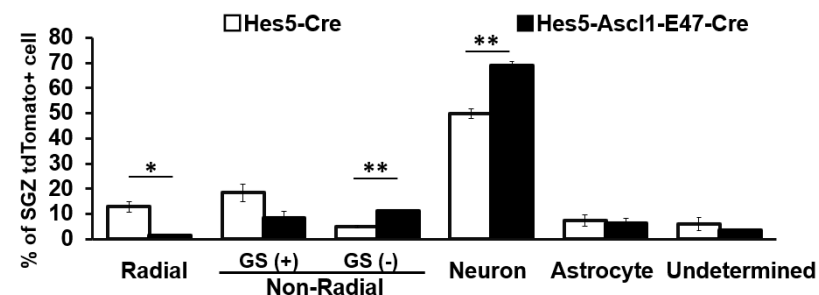


図 22：細胞の形態による分類

(A,B) pHes5-Cre ウイルスと pHes5-Ascl1-E47-Cre ウイルスを注入してから 1 週間後(A)および 1 か月後(B)に固定し、SGZ において tdTomato を発現する細胞を形態および GFAP, Sox2 の発現をもとに細胞種に分類したもの。GS(+):GFAP(+)もしくは Sox2(+), GS(-):GFAP, Sox2 とともに(-)。3 匹のマウスについて解析した。tdTomato 陽性：計 1 週間後 [コントロール:Ascl1-E47=94:130], 1 か月後 [コントロール:Ascl1-E47=145:154] 細胞を計測した。(*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, t 検定。

第4章 考察

4.1 Hes1 の高発現と Ascl1 の発現抑制について

本研究の結果から、神経幹細胞の静止状態は、Hes1 の高発現とそれにとまなう Ascl1 の発現抑制により維持されることが見出された。何が Hes1 の高発現を静止状態で引き起こすかは明らかになっていないが、可能性のひとつとして Id タンパク質 (the Inhibitor of DNA-binding proteins) の関与が考えられる。Hes1 遺伝子が自身の発現を抑制する negative feedback は、Hes1 タンパク質が自身のプロモーターの N-box に結合することで引き起こされるが、Id タンパク質は DNA への結合能を欠いた bHLH 因子であり、Hes1 タンパク質と二量体を形成して Hes1 の DNA 結合を阻害する機能をもつ (Jögi et al., 2001)。これまでの報告より、Id を過剰発現させると、Hes1 と Id2 が二量体を形成し、N-box に結合できずに Hes1 の発現レベルを増加させることが知られている。一方、Hes1-Id2 は Class C site への結合は可能であるために、Hes1 の proneural 因子の抑制効果はそのまま保持する (Bai et al., 2007) (Boareto et al., 2017)。静止状態の神経幹細胞には、BMP シグナルの入力があるが、Id の発現は BMP により上昇することから (Miyazono & Miyazawa, 2002)、BMP-Id-Hes1 の経路が、Ascl1 を抑制し静止状態を維持するために重要である可能性がある。

実際に、3.2.1 節の Luc2-Hes1, Luc2-Ascl1 培養神経幹細胞のライブイメージングの結果では、BMP を加えた静止状態で Hes1 が高発現し振動の周期が長くなる傾向にあること、BMP を除去した活性化状態で Ascl1 が発現を開始することを確認している。さらに Ascl1 はこのとき振動発現しながら徐々に発現レベルを上げることが見出された。この振動は、上流の Hes1 の発現レベルが下がり Ascl1 の発現抑制が周期的に行われるようになり誘導されると推測される。また、3.2.2 節の成体脳スライスを用いた Luc2-Hes1, Luc2-Ascl1 の発現観察では、様々な細胞種が混在しており、細胞の活性化状態や細胞種については明確な判別ができていないものの、Hes1 および Ascl1 が成体脳における神経幹細胞においても振動発現するという知見が得られた。

3.4 節では、Hes1 の強制発現を誘導し、Ascl1 の発現が抑制されることが示唆された。これまでの報告でも、脳の発生過程において形成される境界細胞 (中脳後脳峡部:isthmus、蓋板:roof plate、底板:floor plate) では Hes1 が高発現しており Ascl1 が発現抑制されるために細胞の増殖や分化が起こらないことが確認されている (Baek et al., 2006)。成体脳神経幹細胞でも今回これと同様の結果が得られた。しかし SVZ の神経幹細胞では Ascl1 を発現する細胞数が有意に減少したものの、SGZ の神経幹細胞では減少傾向があるにとどまった。これは、SVZ では Tg マウスを用いてほとんど全ての神経幹細胞を CFP もしくは GFP でラベルできている一方、SGZ ではウイルスインジェクションにより少数の神経幹細胞しか Venus でラベルできなかったことに起因すると考えられる。加えて、免疫染色でマーカーの発現を検出する際に、MCM2 のように発現する期間が長いタンパク質は検出可能だが、

Ascl1 のように振動発現を行うタンパク質は、発現量が低いタイミングでは検出できない。実際に、SGZ の神経幹細胞を免疫染色すると、MCM2 を発現する細胞のうち Ascl1 の発現は 35%ほどの割合しか見られないが、これは Ascl1 の振動状の発現パターンに起因すると考察されている (Andersen et al., 2014)。これらの理由でコントロールの pEF-Venus 感染細胞で Ascl1 を発現する細胞数が少ないことから、Hes1 を強制発現した条件と比較しても減少傾向程度にとどまり、有意差が検出できなかったと考えられる。3.3 節の Hes のノックアウトにおいても同様の事情により、SGZ の神経幹細胞では *Hes1* 欠損から 3 か月後において MCM2 陽性細胞数の減少には有意差があるものの、Ascl1 陽性細胞については減少傾向がみられるにとどまった。

4.2 神経幹細胞の維持機構や活性化手法、および pHes5-Ascl1 を用いた場合の利点

神経幹細胞が成体脳で維持されるメカニズムは、主に外的要因と内的要因に分類される (Urbán et al., 2019)。外的要因としては例えば抑制性ニューロンの放出する GABA が神経幹細胞の増殖を抑制する報告や (Giachino et al., 2014) (Song et al., 2012)、BMP が神経幹細胞の増殖を抑制するが、BMP の antagonist である Noggin は、増殖を促進するという報告である (Mira et al., 2010)。一方、内的要因としては、CDK4 や Cyclin D1 など細胞周期を亢進させる遺伝子発現が挙げられる (Artegiani et al., 2011)。

本研究では、内的要因であり、神経幹細胞の活性化・ニューロン分化の両方を制御する転写因子 Ascl1 を対象とし、特にその発現動態に着目して振動発現を誘導した。さらに将来的にヒトの治療に応用することを視野に入れ、遺伝子改変マウス等を用いず、レンチウイルスによって内在性の神経幹細胞を活性化する手法を探索した。3.5.1 節では、光遺伝学的手法を用いた Ascl1 の誘導を行い、振動発現は持続発現より効率的に Ki67 のみ陽性となる細胞を誘導することを示した。これまで Ascl1 の振動発現は胎生神経幹細胞の増殖に寄与することが確認されていたが、静止状態の神経幹細胞の増殖にも寄与することが示唆された。しかしながら、持続発現より割合は少ないものの、振動発現においても DCX 陽性となる細胞が観察された。これは Ascl1 の分解を防ぐために E47 を共発現させているため、Ascl1 タンパク質が比較的安定化している可能性が挙げられる。一方、3.5.1 節の結果で Ascl1 の下流の因子である Dll1 は振動を示したことから、誘導の初期は Ascl1 の活性は振動発現していると考えられる。しかし長期的に誘導がつづく、Ascl1 が徐々に蓄積し、ニューロン分化を引き起こす状態となり DCX が発現したと推測される。

3.5.2 節の脳内の神経幹細胞に対して光遺伝学的手法を用いた実験では、1 週間の光照射によって活性化する結果が得られたものの、2 週間の光照射ではウイルス感染した神経幹細胞が Ascl1 を発現しなくなった。考えられる原因として、Gal4 因子の細胞に対する毒性や UAS 配列がサイレンシングを受けた可能性がある。Gal4/UAS システムは酵母を用いて開発されてきたため、マウスなどの哺乳類の細胞で使用するには更なる最適化が必要だっ

たと思われる。近年は転写因子の発現誘導に関して多くのツールが考案され、Gal4/UAS を用いない光遺伝学的手法 (Cry2-CIB1 と Tet システム) や、光毒性の低い近赤外光を用いた誘導法の開発が進んでいる (Yamada et al., 2018)。これらを適用することで、今後脳内の神経幹細胞を光遺伝学的手法で活性化することが可能になると期待される。

さらに振動発現を誘導するもう一つの方法として、*Hes5* プロモーターを使うことを考案した。*Hes5* プロモーターも negative feedback loop によって、プロモーター下流の遺伝子の振動発現を誘導する。3.6.1 節では、*Hes5* プロモーターを用いて *Ascl1*-E47 を誘導することで、下流の *Dll1* プロモーター活性が振動することが確認された。これまでに遺伝子発現を誘導して神経幹細胞を活性化する手法では EF プロモーターや CAG プロモーターなどが使われてきたが、たとえば Cyclin などの増殖を引き起こす遺伝子をこれらのプロモーターにより恒常的に発現させた場合は細胞ががん化する可能性がある。一方で *Hes5* プロモーターは、神経幹細胞において活性が高く、ニューロン分化前に活性が弱くなるという性質から、細胞分化後の *Ascl1* の過剰発現を防ぐことができる。

3.6.4 節、3.6.5 節では、光の代わりに *Hes5* プロモーターを用いたことで、脳内の神経幹細胞に対する *Ascl1*-E47 の効果を 1 か月の長期にわたり観察することができ、さらに Ai14 マウスとかけあわせることで神経幹細胞のリネージを追跡することを可能にした。ウイルス注入から 1 週間後では、*Ascl1* を誘導した神経幹細胞はコントロールに比べ活性化することが確認され、1 か月後では、*Ascl1* を誘導した神経幹細胞はコントロールに比べ新生ニューロンのマーカーを発現する割合が高く、ニューロン新生能を長期間維持することが示唆された。しかし MCM2 を発現する活性化状態の神経幹細胞の割合はコントロールを上回らなかった。これは E47 によって *Ascl1* が安定化し、増殖よりもニューロン分化に傾いたと推測される。もうひとつの可能性として、*Ascl1* は二量体を形成し DNA 結合を行うが、*Ascl1*-E47 の heterodimer がニューロン分化を誘導しやすい組み合わせである可能性が挙げられる。*Ascl1* は、*Ascl1* の homodimer をつくる以外に、*Hes1* と heterodimer をつくり不安定化すること、*Neurogenin2* と heterodimer をつくることなどが知られている。しかしながらどの組み合わせがどの下流遺伝子を制御し細胞の運命決定に関与するかは明らかになっておらず、より詳細な解析が今後必要である。

4.3 他の幹細胞における静止化・活性化の制御機構および今後の応用

静止/活性化状態は神経幹細胞だけでなく造血幹細胞や骨格筋幹細胞にもみられ、幹細胞に共通した性質である。たとえば、筋肉の幹細胞は胎生期には活発に増殖・分化するが、成体ではサテライト細胞として静止状態で維持されており、筋肉に障害がおこると活性化されて新しい細胞をつくる性質をもつ。これまでの報告から、bHLH 型転写因子である MyoD は骨格筋幹細胞から骨格筋細胞への分化に関わるだけでなく、骨格筋幹細胞の増殖にも重要であるとされており、神経幹細胞における *Ascl1* と同様の性質をもつ。さらに最近の研究

により、MyoD はサテライト細胞では Hes1 の高発現により発現抑制されていること、活性化の際は Hes1 の振動発現により MyoD の振動発現が誘導され、分化時には Hes1 の発現が下がり MyoD の発現が上昇することが明らかになった(Lahmann et al., 2019)。幹細胞には、「静止化は Hes1 の高発現により分化運命決定因子 Ascl1/MyoD の発現を抑制することで保たれており、Ascl1/MyoD が振動発現することで幹細胞が活性化する」という共通機構があると推測される (図 23)。

これらの分化運命決定因子の振動発現の誘導は、自身の持つ幹細胞を活性化し、組織再生するために有効である可能性が高い。本研究では、成体の内在性神経幹細胞に Ascl1 の発現を誘導して、活性化とニューロン新生を誘導できた。これを医療に応用できれば、アルツハイマー病などの神経疾患を緩和する治療法のひとつとなりうるかもしれない。しかし 4.2 で述べたように、現行の手法では活性化状態の神経幹細胞を長期間維持できずニューロン分化が進行する。Ascl1 の発現のコントロールや、下流因子への影響を今後さらに調べることで、再生医療へ応用できると期待される。

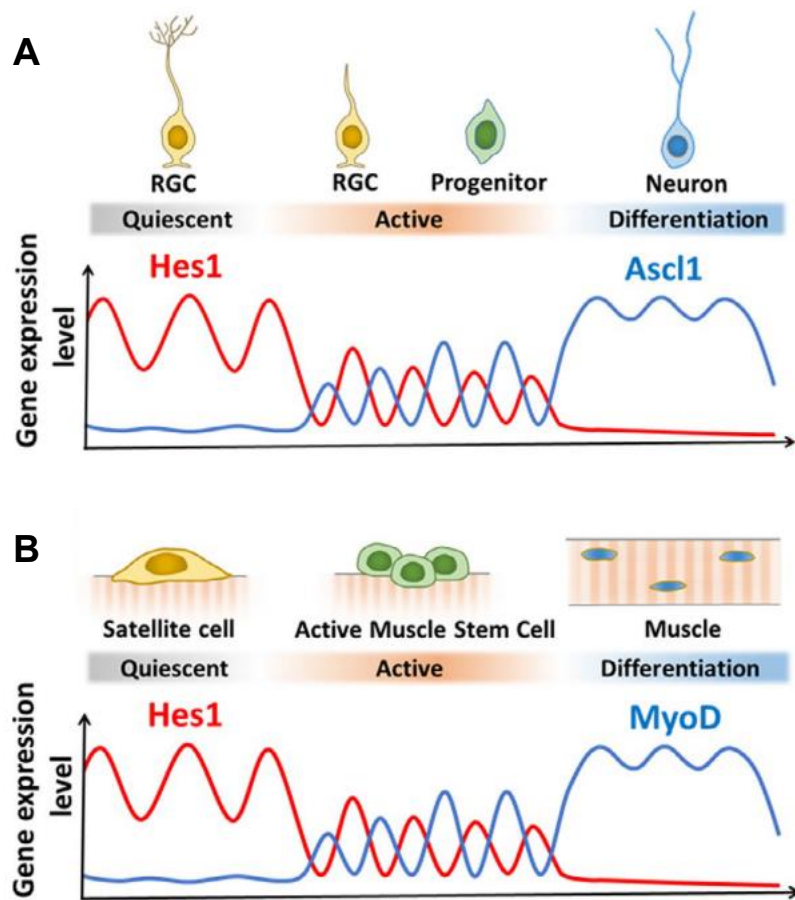


図 23: 幹細胞の静止状態と活性化状態における bHLH 因子の発現

- (A) 成体の静止神経幹細胞がニューロン分化するまでの Ascl1, Hes1 の発現動態変化。
 (B) 成体のサテライト細胞が筋分化を引き起こすまでの MyoD, Hes1 の発現動態変化。
 (Sueda & Kageyama, 2019 より図を引用した。)

第2部

オリゴデンドロサイト分化における Ascl1 の 振動発現とその役割

第1章 序論

1.1 オリゴデンドロサイトの発生について

神経幹細胞は、胎生中期にニューロンを産生し、胎生後期にはオリゴデンドロサイトの前駆細胞を産生する。内側基底核原基、外側基底核原基、背側脳室下帯で生まれたオリゴデンドロサイト前駆細胞は移動性を持ち、脳全体にその分布を広げる。多くのオリゴデンドロサイト前駆細胞は、生後から生後 2 週間頃にかけて分化しニューロンの軸索に髄鞘を形成する。一部は前駆細胞の状態のままとどまり、増殖・分化を一生涯に渡り行い続け、脱髄を行うニューロンが再ミエリン化するリソースとなる。成体脳において神経幹細胞や神経前駆細胞は SVG と SGZ に限局して分布しているが、オリゴデンドロサイト前駆細胞は脳全体に分布しかつ一定の距離を保ち散らばって配置されている (Bergles & Richardson, 2016)(Kirby et al., 2006) (図 1)。これらのオリゴデンドロサイト前駆細胞がオリゴデンドロサイトを主に産生しており、海馬の SGZ に存在する成体神経幹細胞から直接オリゴデンドロサイト系譜の細胞が産生される例は長期タイムラプスイメージングにおいて観察されていない(Pilz et al., 2018)。

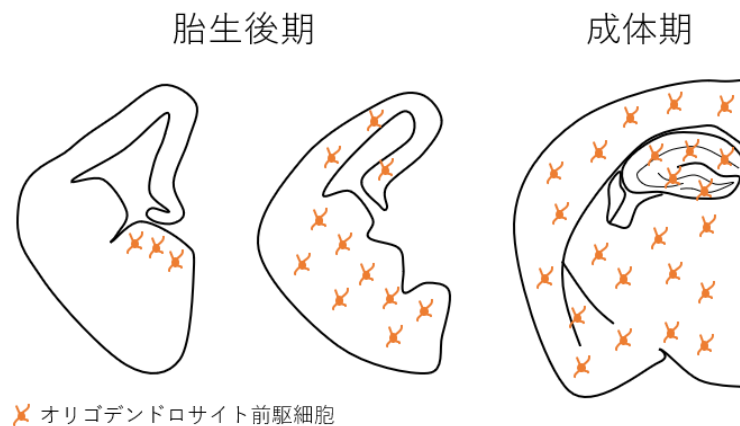


図 1 : オリゴデンドロサイト前駆細胞の発生と分布

胎生期に神経幹細胞からオリゴデンドロサイト前駆細胞がつくられ、その後脳全体にオリゴデンドロサイト前駆細胞が配置される。図は(Huang et al., 2019)を参考に改変した。

1.2 オリゴデンドロサイト系譜の細胞のマーカによる分類

オリゴデンドロサイト前駆細胞やオリゴデンドロサイトは、それぞれ NG2, CNPase といった特異的分子マーカーを発現する。さらに *Ascl1* はオリゴデンドロサイト前駆細胞で発現することが報告されている (Nakatani et al., 2013)(Kelenis et al., 2018) (図 2)。

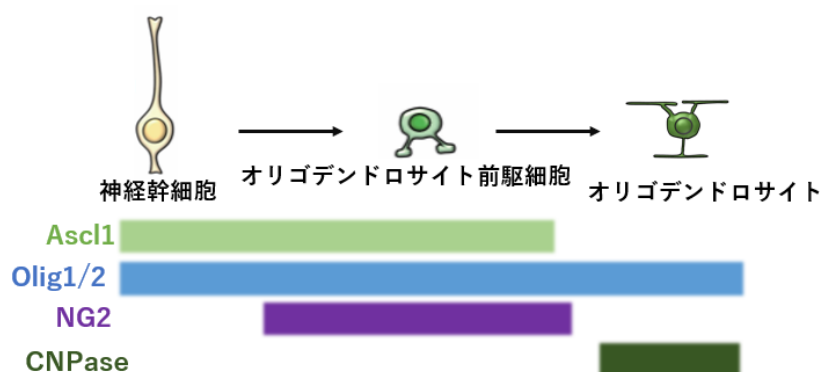


図 2 : オリゴデンドロサイト系譜細胞におけるマーカー分子の発現

神経幹細胞は NG2 陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞に分化した後、*CNPase* 陽性のオリゴデンドロサイトに分化する。図は (Kelenis et al., 2018) を参考に改変した。

1.3 *Ascl1* の発現はニューロン分化だけでなくオリゴデンドロサイト分化にも重要である

Ascl1 が神経幹細胞の増殖やニューロン分化に重要であることは第一章で述べたが、オリゴデンドロサイト系譜細胞への分化にも *Ascl1* の発現が関与する。例えば胎生 12.5 日の *Ascl1* ノックアウトマウスでは、オリゴデンドロサイト前駆細胞数が野生型に比べ約 16 分の 1 に減少することが報告されている (Parras et al., 2007)。また、オリゴデンドロサイト分化において *Ascl1* は、bHLH 因子でありオリゴデンドロサイト運命決定因子である *Olig2* と共役してはたらくことが報告されている (Parras et al., 2004) (Parras et al., 2007) (Battiste et al., 2007) (Sugimori et al., 2008) (Kondo & Raff, 2000)。

オリゴデンドロサイト前駆細胞やオリゴデンドロサイト分化における *Ascl1* の Loss-of-function や Gain-of-function の解析は進められている一方、*Ascl1* の発現動態に関する報告はほとんどない。また、ニューロンやオリゴデンドロサイトへの分化制御に、*Ascl1* の発現レベルや発現動態がどのように関与しているかは明らかになっていない。

1.4 本研究の目的

本稿では、神経前駆細胞とオリゴデンドロサイト前駆細胞の両方が存在する成体海馬領域をタイムラプスイメージングすることで、特にオリゴデンドロサイト前駆細胞における *Ascl1* の発現動態を明らかにすることを目的とした。さらに、培養神経幹細胞からオリゴデンドロサイト前駆細胞を分化誘導し、神経前駆細胞分化と比較することで、オリゴデンドロサイト前駆細胞における *Ascl1* 発現の意義を明らかにすることを目的とした。

第2章 実験方法

2.1 使用したトランスジェニックマウス

2 か月齢のマウスを使用した。

- ・ Luc2-Ascl1 fusion BAC Tg mouse (ICR) (#RBRC06019) 詳細は同論文第一部に記載
 - ・ Venus-Ascl1 fusion BAC Tg mouse (ICR) (#RBRC06020) (Imayoshi et al., 2013)
- Ascl1 コーディング領域の N 末に Venus を挿入した BAC Tg マウス (図 3)。

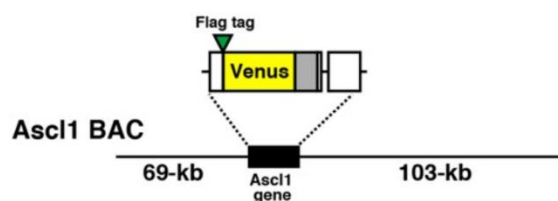


図 3 : Ascl1 タンパク質の発現を可視化するためのレポーターマウス Venus-Ascl1 fusion BAC Tg マウス。

図は http://imayoshi.web.fc2.com/Itaru_Imayoshi_Ph.D./Mouse_strains.html より引用。

2.2 成体脳スライスを用いたタイムラプスイメージング

詳細は同論文第一部に記載。

2.3 オリゴデンドロサイトに分化誘導した培養神経幹細胞のタイムラプスイメージング

Luc2-Ascl1 fusion BAC Tg mouse (E14.5) より樹立された培養神経幹細胞は、核をラベルし細胞の追跡を容易にするために pEF-Venus のレンチウイルスを感染させ、感染から 5 回以上継代してから使用した。神経幹細胞は移動性をもつことから、視野中のすべての細胞が Luc2-Ascl1 である場合は single cell でのシグナルの追跡が困難となるため、pEF-Venus のウイルスに感染した Luc2-Ascl1 神経幹細胞と WT (ICR 由来) の神経幹細胞を 1:3 の割合で混合してから、ラミニンでコーティングした 35mm のガラスボトムディッシュ (底面ガラス部直径 12mm, IWAKI) に 8×10^4 個細胞をまいた。24 時間後、通常培地である [DMEM/F-12 (Gibco), N-2 MAX media supplement (R&D Systems), 20 ng/ml EGF (Gibco), 20 ng/ml bFGF (Wako), ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク)] を除き、PBS wash を 2 回したのちにオリゴデンドロサイト分化誘導培地 [DMEM/F-12 (Gibco), N-2 MAX media supplement (R&D Systems), 30 ng/ml 3,3',5-triiodo(-L-)thyronine (T3; Sigma), 10 ng/ml PDGF (R&D Systems), ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク)] に置換した。さらに Luciferin 1mM を添加して、培地交換後すぐに顕微鏡にセットし、40 倍の対物レンズを使用しタイムラプス撮影を開始した。露光時間は Luminescence フィルター: 4min、Bright-field フィルター: 100msec、GFP フィルター: 100msec に設定し、

5分のインターバルで画像取得した。撮影は36~48時間後に終了し、すぐに細胞を固定した。免疫染色後(詳細は同論文第一部に記載)、NG2陽性またはDCX陽性であった細胞のLuc2-Ascl1の輝度をタイムラプス動画より測定した。解析にはImageJを用い、LuminescenceチャンネルにはSpike Noise Filter 0.05の処理を行い、宇宙線のノイズを除去した。細胞核のトラッキングはGFPチャンネルで行い、その後Luminescenceチャンネルの輝度のグラフとMontage画像を作製した。Montage画像はLuminescenceチャンネルにGaussian Blur 1.0の処理を行い、ノイズを除去した。

2.4 免疫染色

染色方法は同論文第一部に記載。

一次抗体 (免疫組織化学染色)

抗原	ホスト	メーカー	カタログ No	濃度
NG2	Rabbit	Millipore	AB5320	1:500
Ki67	Rabbit	Thermo Fisher Scientific	RM-9106-S1	1:200
CNPase	Rabbit	Cell Signaling Technology	5664S	1:200
Iba1	Rabbit	Wako	019-19741	1:200
GFP	Rat	Nacalai Tesque Inc	GF090R	1:300

二次抗体はAlexa Fluor 405, 488, 568, 647で標識されたもの(Invitrogen, abcam)を1:200の濃度で用いた。DAPIは100ng/mlの濃度に希釈して使用した。

一次抗体 (免疫細胞化学染色)

抗原	ホスト	メーカー	カタログ No	濃度
NG2	Rabbit	Millipore	AB5320	1:1000
Ki67	Rabbit	Thermo Fisher Scientific	RM-9106-S1	1:1000
DCX	Goat	Santa Cruz Biotechnology	sc-8066	1:1000
Tuj1	Mouse	BioLegend	801201	1:2000
GFP	Rat	Nacalai Tesque Inc	GF090R	1:1000

二次抗体はAlexa Fluor 405, 488, 568, 647で標識されたもの(Invitrogen, abcam)を1:1000の濃度で用いた。DAPIは100ng/mlの濃度に希釈して使用した。

2.5 オリゴデンドロサイト前駆細胞分化誘導時におけるAscl1の発現誘導

ラミネンコートした8-wellチャンバースライド(Lab-Tek #154534)に培養神経幹細胞を 4.0×10^4 個細胞を撒いた。24時間後に通常培地を除きPBS washしたのちに、レンチウイルス

ス (1 μ l の pEF-Venus または 2 μ l の pEF-Ascl1-Venus) を添加したオリゴデンドロサイト前駆細胞分化誘導培地に置換した。なお、2.3 節に記載したオリゴデンドロサイト分化誘導培地は細胞増殖を保つことができなかつたため、オリゴデンドロサイト前駆細胞分化培地 [DMEM/F-12 (Gibco), N-2 MAX media supplement (R&D Systems), B-27 supplement (Gibco), 20 ng/ml PDGF (R&D Systems), 20 ng/ml bFGF(Wako), ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク)] (Zhang et al., 2019) を用いた。ウイルス液を含む培地を 24 時間後に除き、再度オリゴデンドロサイト前駆細胞分化培地を添加した。分化誘導を 3 日間行った後に細胞を固定し免疫染色した。

2.6 画像処理と定量

(3.1 節) 画像は molecular layer と SGZ を含むように、z に関しては 2 μ m 間隔で 6 枚取得し、計 10 μ m の厚みの z-stack を Maximum intensity projection したものを解析した。Venus-Ascl1 シグナルの輝度測定は ImageJ を用いた。まず GFP チャンネルを二値化してから細胞核の輪郭を抽出し、Binary の Watershed より重なった部分に境界をいれた。Analyze Particles より個々の細胞の ROI 情報を取得した。Molecular layer で Venus-Ascl1 を発現する細胞は NG2 陽性であることを確認し、SGZ では神経幹細胞と区別するためにシグナルの強い細胞を選択した。核が重なり合いひとつの ROI として認識されたものについては Polygon Selection により手動で修正して細胞核を選択した。これらの細胞について、Venus-Ascl1 の輝度(核内輝度値の総計を面積で割ったもの)を測定し、さらにバックグラウンドの値を引いたものを y 値として散布図を作成した。

(3.2 節) シグナル定量の詳細は同論文第一部に記載した。オリゴデンドロサイト前駆細胞、活性化神経幹細胞における Ascl1 の振動発現の平均周期は、グラフ中の波形のピーク値とピーク値の間の時間を計測し算出した。また平均値からの標準偏差を算出した。オリゴデンドロサイト前駆細胞、活性化神経幹細胞、神経前駆細胞における Luc2-Ascl1 の発現の振幅は、グラフ中の波形のピーク値とボトム値の差を計測し、オリゴデンドロサイト前駆細胞で算出された平均値で割ることで Luc2-Ascl1 輝度差の相対値を得た。3 匹のマウスについて解析し、表中の N 数は解析した細胞の総計である。

(3.3 節) Luc2-Ascl1 の NG2 陽性細胞、DCX 陽性細胞における平均の輝度は、タイムラプス終了時からさかのぼって約 15 時間のデータを使用し算出した。これは、細胞が顕微鏡の視野外に移動することがあり長時間のトレースが難しく、視野内で経時的に観察できる細胞数を考慮した時間である。サンプル数 N = 2, それぞれの実験における NG2 陽性細胞の Luc2-Ascl1 の平均輝度を 1 として、個々の NG2 陽性細胞、DCX 陽性細胞における相対値を算出しプロットした。

(3.4 節) Venus 陽性細胞における NG2, Tuj1 の発現は細胞膜・細胞質に認められるため、マニュアルで検出した。NG2 においては突起をもつものを陽性細胞としてカウントし、測

定した Venus 陽性細胞数における割合を算出した。Venus 陽性細胞における Ki67 の発現細胞数は、ImageJ を用いて定量した。まず GFP チャンネルを二値化してから細胞核の輪郭を抽出し、Binary の Watershed より重なった部分に境界をいれ、Analyze Particles より個々の細胞核の ROI 情報を取得した。この各 ROI における RFP チャンネルの輝度を測定し、Ki67 の輝度情報を得た。一定の閾値を超えたものを Ki67 陽性細胞としてカウントし、測定した Venus 陽性細胞数における割合を算出した。

第3章 結果

3.1 Ascl1 はオリゴデンドロサイト前駆細胞において発現し、神経前駆細胞よりも発現レベルが低い

オリゴデンドロサイト前駆細胞は白質に多く存在し、脳梁や脊髄を対象とした研究は多いものの、海馬領域における報告は少ない。まず、Ascl1 の発現が海馬領域のどのオリゴデンドロサイト系譜細胞で起こるかを調べるため、内在性の Ascl1 の発現パターンを忠実に再現し Venus と Ascl1 の融合タンパク質を発現する Venus-Ascl1 BAC Tg マウス(Imayoshi et al., 2013)の成体を用い、各オリゴデンドロサイト系譜細胞のマーカ―(NG2, CNPase)の発現を調べた。Venus-Ascl1 の発現は神経幹細胞がある SGZ だけでなく、hilus や molecular layer にも多数観察され、これらの Venus-Ascl1 陽性細胞はオリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカ―である NG2 陽性かつ増殖細胞のマーカ―である Ki67 陽性であった(図 4. A,B, Closed arrowheads)。一方で、成熟オリゴデンドロサイトのマーカ―である CNPase や、マクログリアのマーカ―である Iba1 は陰性であった(図 4. C,D)。このことから、Ascl1 は海馬領域の hilus や molecular layer において、増殖状態のオリゴデンドロサイト前駆細胞で発現することがわかった。

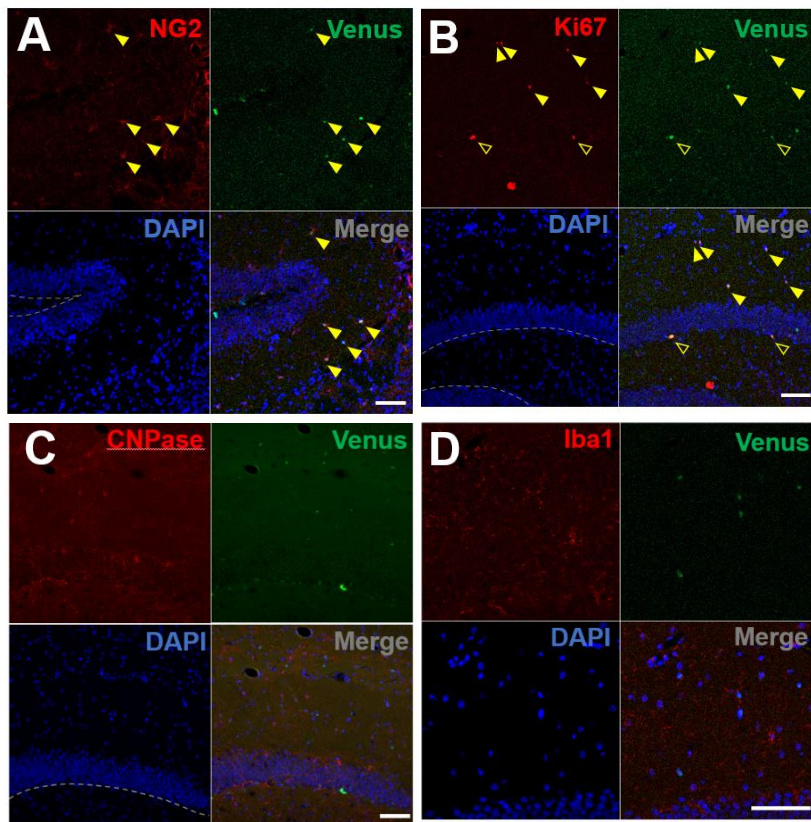


図4：成体脳海馬領域における Venus-Ascl1 の免疫染色

(A,B) Venus-Ascl1 と NG2(A),Ki67(B)の免疫染色。Ascl1 と NG2、Ki67 は共発現していた。(C)成熟オリゴデンドロサイトマーカーの CNPase 陽性細胞では Venus-Ascl1 は発現しない。(D) マイクログリアマーカーの Iba1 陽性細胞では Venus-Ascl1 は発現しない。Open arrowheads：SGZ に存在する神経幹細胞もしくは神経前駆細胞と推測される。Closed arrowheads：molecular layer に存在する増殖性のオリゴデンドロサイト前駆細胞と推測される。スケールバー：50 μ m。点線は SGZ を示している。

SGZ には Ascl1 を強く発現する神経前駆細胞が存在する。これらの SGZ にある Ascl1 を高レベルで発現する細胞、および molecular layer にある NG2 陽性細胞のそれぞれの Ascl1 の発現量を、Venus に対する抗体を用いて検出し定量した。その結果、Venus-Ascl1 の平均の輝度は NG2 陽性細胞、神経前駆細胞において、それぞれ 15.6, 40.9 となり、NG2 陽性細胞では神経前駆細胞に比べ約 2.6 倍 Ascl1 の発現が低いことが示された(図5)。

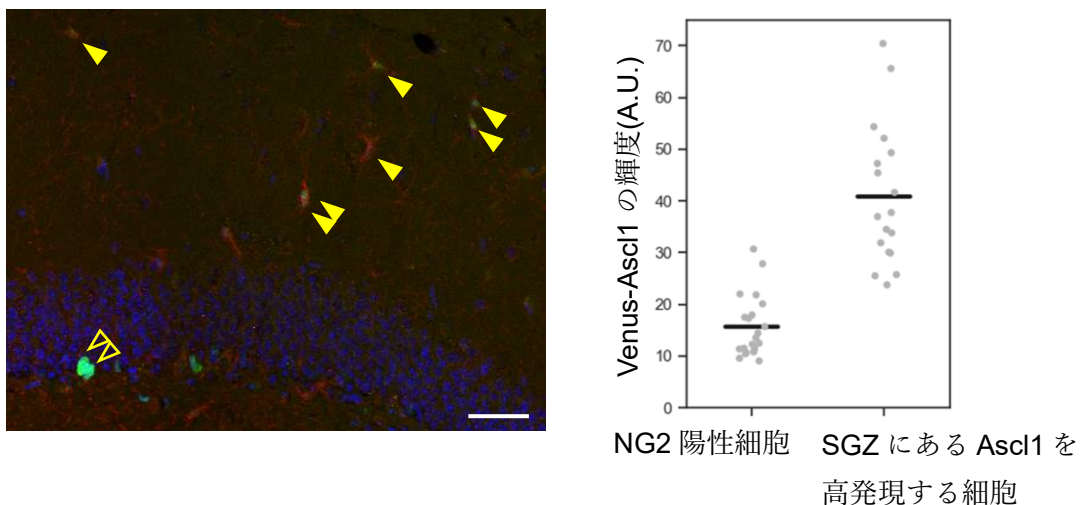


図5：Molecular layer および SGZ に存在する Ascl1 陽性細胞の Ascl1 発現レベル

Venus-Ascl1 の免疫染色結果(左)から、オリゴデンドロサイト前駆細胞である NG2 陽性細胞と、神経前駆細胞と推測される Ascl1 を高発現する細胞における Ascl1 の発現レベルをプロットした(右)。図は代表的な1匹の結果。他2匹も同じ傾向を示した。細胞数[NG2 陽性細胞:SGZ の細胞=21:18]。Open arrowheads：SGZ に存在する神経前駆細胞と推測される細胞。Closed arrowheads：molecular layer に存在する増殖性のオリゴデンドロサイト前駆細胞と推測される細胞。スケールバー：50 μ m。

3.2 Ascl1 は成体脳スライス中のオリゴデンドロサイト前駆細胞において振動発現する

次にオリゴデンドロサイト前駆細胞における Ascl1 がどのような発現動態を示すか、Luciferase 2 -Ascl1 の BAC Tg マウスから作製した海馬領域脳スライスをタイムラプス撮影して調べた (図 6.A,D) (実験方法は第 1 部の 2.2.2 節に記載)。olecular layer における Luc2-Ascl1 の発現を 1 細胞レベルで追跡したところ、Ascl1 は振動発現していることが明らかになった (図 6.D)。この Ascl1 の振動発現の周期は $3.5\text{h} \pm 1.1\text{h}$ と算出され、これは神経幹細胞にみられる Ascl1 の振動発現の周期 (成体神経幹細胞(脳スライス): $3.4\text{h} \pm 1.1\text{h}$, 胎仔神経幹細胞 (培養細胞): $2.9\text{h} \pm 0.5\text{h}$ (Imayoshi et al., 2013)) と同程度であった (図 6.E)。一方で SGZ においては、3.1 節と同様にオリゴデンドロサイト前駆細胞に比べ高レベルで Luc2-Ascl1 を発現する細胞が確認された (図 6.B,C)。この SGZ で Luc2-Ascl1 を高発現する細胞と molecular layer で Luc2-Ascl1 を高発現する細胞の発現パターンの振幅(グラフにおける波形の最大値と最小値の差)を比較したところ、約 5.1 倍 SGZ の細胞の方が高かった (図 6.E)。以上の結果より、オリゴデンドロサイト前駆細胞では、神経前駆細胞よりも低いレベルで Ascl1 の振動発現を起こすことが示唆された。

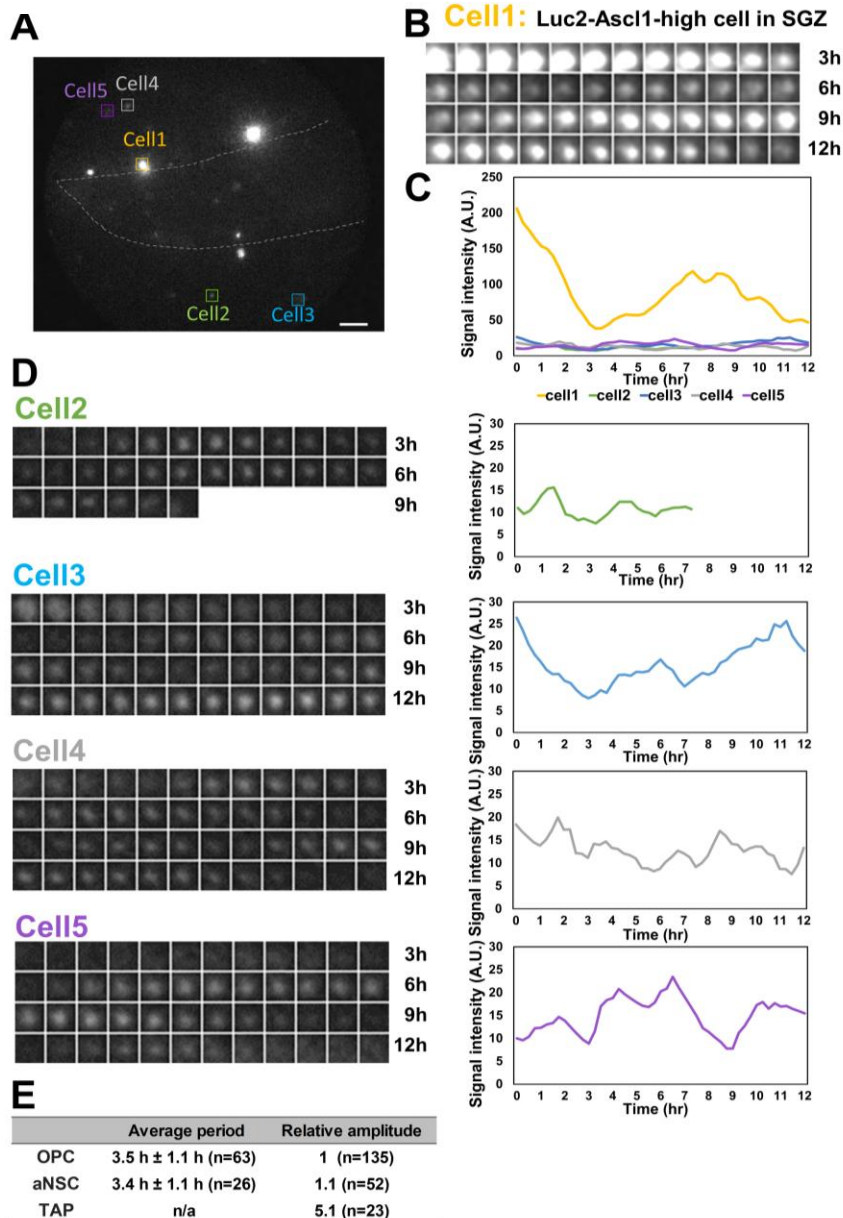


図 6：海馬スライス中のオリゴデンドロサイト前駆細胞および SGZ の神経前駆細胞における Luc2-Ascl1 発現のタイムラプスイメージング

(A) Luc2-Ascl1 の海馬領域の発光イメージング。Cell 1-5 の発現動態は(B-D)において示した。点線は SGZ と hilus の境界。(B) Cell1 が示した Luc2-Ascl1 発現動態のモニタージュ画像。SGZ で Ascl1 が高く発現しており、神経前駆細胞と推測される。(C) Cell1-5 の Luc2-Ascl1 発現動態のグラフ。(D) Cell 2-5 が示した発現動態のグラフとモニタージュ画像。Molecular layer に存在するオリゴデンドロサイト前駆細胞と推測される。(E) オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) と活性型神経幹細胞(aNSC)における Ascl1-Luc2 発現の平均の振動周期、および OPC, aNSC, 神経前駆細胞 (TAP: transit-amplifying precursor) における Ascl1-Luc2 の振幅の比較。スケールバー：50 μ m。

3.3 Ascl1 はニューロン分化よりもオリゴデンドロサイト分化過程において発現レベルが低い

次に、神経幹細胞がオリゴデンドロサイト前駆細胞に分化する際に Ascl1 がどのような発現を行うか、Luc2-Ascl1 マウスより樹立した培養神経幹細胞を用いてタイムラプスイメージングにより調べた。神経幹細胞は、PDGF,T3 を培地に添加することでオリゴデンドロサイト分化を誘導することができる (Baas et al., 1997) (Imayoshi et al., 2013)。しかし一部の神経幹細胞はこの培地中でもニューロンに分化する。イメージングを終えてから、NG2 および神経分化マーカーである DCX の免疫染色を行い、オリゴデンドロサイト前駆細胞および幼若ニューロンにおける Luc2-Ascl1 の発現動態を解析した。NG2 陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞では、脳スライスでみられたような Ascl1 の振動発現が観察された(図 7. A 下)。一方で、DCX 陽性の幼若ニューロンでは Ascl1 の発現がオリゴデンドロサイト前駆細胞に比べ高かった(図 7. A,B)。また、NG2 または DCX 陽性となった細胞の Luc2-Ascl1 の輝度の平均をプロットしたところ、NG2 陽性細胞に比べ DCX 陽性細胞において発現が高かった(図 7.C)。以上より、培養細胞においても、Ascl1 の発現はオリゴデンドロサイト前駆細胞において振動しており、かつ発現レベルは幼若ニューロンより低いことが示された。

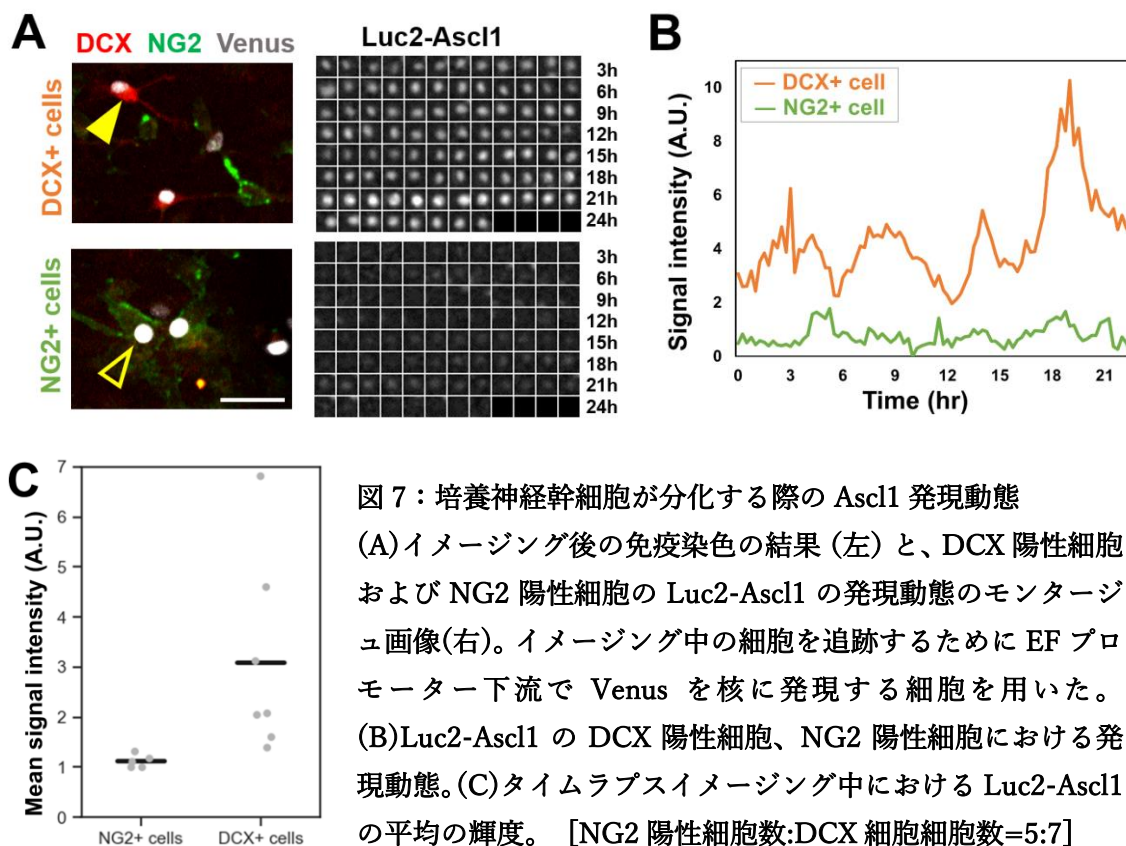


図 7：培養神経幹細胞が分化する際の Ascl1 発現動態
 (A)イメージング後の免疫染色の結果 (左) と、DCX 陽性細胞および NG2 陽性細胞の Luc2-Ascl1 の発現動態のモニタージュ画像(右)。イメージング中の細胞を追跡するために EF プロモーター下流で Venus を核に発現する細胞を用いた。
 (B)Luc2-Ascl1 の DCX 陽性細胞、NG2 陽性細胞における発現動態。(C)タイムラプスイメージング中における Luc2-Ascl1 の平均の輝度。 [NG2 陽性細胞数:DCX 細胞細胞数=5:7]

3.4 Ascl1 の持続発現はオリゴデンドロサイト前駆細胞への分化を抑制しニューロン分化を促進する

次に、Ascl1 の高発現がオリゴデンドロサイトの分化に影響するか調べた。Ascl1 の発現誘導には、EF プロモーター下流で Ascl1 を発現する pEF-Ascl1-P2A-Venus のウイルスを用い、コントロールとして Ascl1 を含まず EF プロモーター下流で Venus のみ発現する pEF-Venus を用いた(図 8. A)。ウイルス添加は、培養神経幹細胞を通常の培地からオリゴデンドロサイト前駆細胞分化誘導培地への交換時に行い、それから 3 日後に細胞を固定して免疫染色をおこなった。内在性の Ascl1 の発現のみが起こるコントロールの条件では、ニューロン分化マーカーである Tuj1 を発現する細胞の割合は 3.2%ほどだが、Ascl1 の持続発現を誘導した条件では Tuj1 を発現する細胞の割合が 35.3%と顕著に上昇した (図 8. B,C 右)。

一方、NG2 陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞に分化した細胞の割合は、コントロールでは 33.6%であるのに対し Ascl1 の持続発現の条件では 18.0%と、有意に減少した。(図 8. B,C 左)。Ascl1 の高発現によって神経幹細胞のニューロン分化が亢進し、それに伴ってオリゴデンドロサイト前駆細胞への分化の割合が減少したと考えられる。

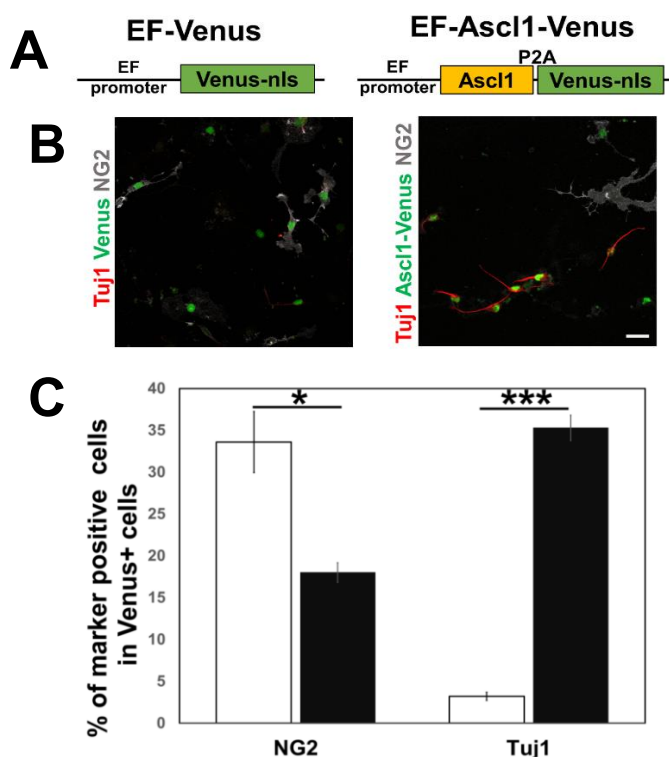


図 8： Ascl1 の持続発現によるオリゴデンドロサイト前駆細胞への分化の阻害
 (A)培養神経幹細胞に添加した2種のレンチウイルスベクターコンストラクト (B)コントロールおよび Ascl1 持続発現誘導から 3 日後の免疫染色結果。(C)NG2 陽性または Tuj1 陽性細胞の割合。サンプル数 N=3。総計 [Venus : Ascl1-Venus = 765 : 612]細胞を計測した。
 (*) P< 0.05, (***) P< 0.001, t 検定。

3.5 Ascl1 の持続発現は細胞の増殖能を低下させる

次に、3.4 節の実験における増殖率をそれぞれ調べた。ウイルス感染細胞において増殖マーカーである Ki67 の発現を調べたところ、内在性の Ascl1 の発現のみが起こる条件では陽性率が 11.6%であったのに対し、Ascl1 の持続発現を誘導した条件では 6.5%と減少していた(図 9. A,B)。

3.4 節の結果とこの結果から、Ascl1 が高発現するとニューロン分化が亢進し増殖性が維持できないのに対し、Ascl1 が低レベルで振動発現することでオリゴデンドロサイト系譜細胞への分化能や、増殖能が維持される可能性が示唆された。

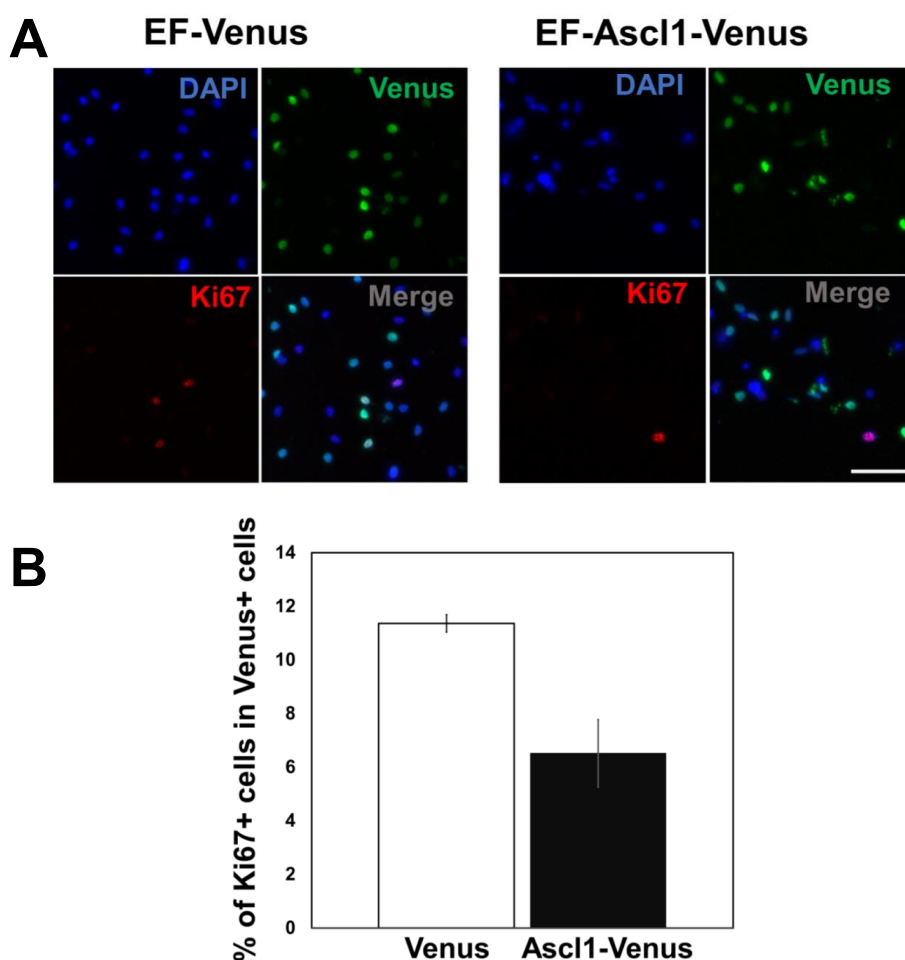


図 9 : Ascl1 の持続発現による増殖能の低下

(A)コントロールおよび Ascl1 持続発現誘導から 3 日後の Ki67 免疫染色結果。(B)Ki67 陽性細胞の割合。サンプル数 N=2。総計 [Venus : Ascl1-Venus = 613 : 612]細胞を計測した。P=0.060。

第4章 考察

これまでの報告から、*Ascl1* のコンベンショナルノックアウトマウス（生後致死のため postnatal Day0 を解析）ではニューロンとオリゴデンドロサイトの両方の産生が減少することがわかっており、*Ascl1* はニューロン分化にもオリゴデンドロサイト分化にも重要な因子であることが示されていた(Parras et al., 2004)。しかし、*Ascl1* がどのようにニューロン分化とオリゴデンドロサイト分化の両方を制御するかはわかっていなかった。

本研究では、海馬の脳スライス・培養オリゴデンドロサイト前駆細胞のリアルタイムイメージング解析より、オリゴデンドロサイト前駆細胞では *Ascl1* が低レベルで振動発現することを明らかにした。さらに、胎仔由来の神経幹細胞に対して、培地によるオリゴデンドロサイト前駆細胞分化誘導と並行し *Ascl1* の強制発現を行うと、オリゴデンドロサイト前駆細胞よりもニューロンに分化する割合が高くなった。ニューロン分化した細胞は細胞周期離脱を起こし増殖能がない一方、*Ascl1* の低レベルの振動発現が維持された細胞には増殖能がみられた。これらの結果から、神経幹細胞がオリゴデンドロサイト前駆細胞に分化するときには *Ascl1* の振動発現が引き続いており、一方で神経前駆細胞に分化するときには、*Ascl1* の発現上昇が重要であることが示唆された。この *Ascl1* の振動発現は、ニューロン様のフェノタイプを誘導せずにオリゴデンドロサイト前駆細胞の誘導および増殖に関与している可能性がある。

また、成体期にオリゴデンドロサイト前駆細胞特異的に *Ascl1* をノックアウトするとオリゴデンドロサイト前駆細胞の数および増殖能が減少する報告もあり(Kelenis et al., 2018)、*Ascl1* の発現、特に今回観察された振動発現が、成体のオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖にも関与する可能性がある。振動発現の意義を明らかにするためには、*Ascl1* をノックアウトした細胞を用いて、異なる周期および異なるレベルの *Ascl1* 発現を人工的に誘導した際の増殖・分化能を評価する必要がある。

Ascl1 の振動発現がどのように細胞増殖を制御するか詳細なメカニズムはわかっていない。考えられる可能性として、細胞増殖に関与する遺伝子は *Ascl1* に対する感受性が高く *Ascl1* の発現振動に応答できる一方、ニューロン分化や細胞周期離脱に関与する遺伝子は *Ascl1* に対する応答の閾値が高いために *Ascl1* の振動発現に応答せず、高レベルの *Ascl1* の発現にのみ応答する仮説が挙げられる。この高レベルの *Ascl1* 発現下では、増殖と分化の両者が同時に亢進することを防ぐために、細胞増殖に関わる遺伝子の発現が抑制される機構(Vasconcelos et al., 2016)が関与すると推測される。しかしながら、比較的低レベルの *Ascl1* の持続発現誘導においても細胞は増殖を行わずニューロン分化する(Imayoshi et al., 2013)。 *Ascl1* の異なる発現パターンがどのように細胞の増殖や分化を制御しているかは、今後の更なる解析が必要である。

神経幹細胞における *Ascl1* の振動発現のレギュレーターは *Hes1* や *Hes5* が主であるが、オリゴデンドロサイト前駆細胞における *Ascl1* の振動発現のレギュレーターはまだ明らか

になっていない。これまでの研究ではオリゴデンドロサイト分化時に Hes5 が Ascl1 を抑制するという報告もあり (Kondo & Raff, 2000)、Hes5 が Ascl1 の振動発現の制御を主に担っている可能性がある。さらに、オリゴデンドロサイト前駆細胞では Ascl1 が Hes5 の発現量を増加させるという報告もある (Ueno et al., 2012)。これらのことから、Ascl1 と Hes5 の間でフィードバックがはたらいており、Ascl1 と Hes5 の振動発現や、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖を制御している可能性が考えられる。

参考文献

- Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J. M., & Tramontin, A. D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature Reviews Neuroscience*, *2*(4), 287–293. <https://doi.org/10.1038/35067582>
- Andersen, J., Urbán, N., Achimastou, A., Ito, A., Simic, M., Ullom, K., Martynoga, B., Lebel, M., Göritz, C., Frisén, J., Nakafuku, M., & Guillemot, F. (2014). A Transcriptional Mechanism Integrating Inputs from Extracellular Signals to Activate Hippocampal Stem Cells. *Neuron*, *83*(5), 1085–1097. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.004>
- Artegiani, B., Lindemann, D., & Calegari, F. (2011). Overexpression of cdk4 and cyclinD1 triggers greater expansion of neural stem cells in the adult mouse brain. *Journal of Experimental Medicine*, *208*(5), 937–948. <https://doi.org/10.1084/jem.20102167>
- Baas, D., Bourbeau, D., Sarlieve, L., Ittel, M. E., Dussault, J. P. J. (1997). *Oligodendrocyte Maturation and Progenitor Cell Proliferation Are Independently Regulated by Thyroid Hormone*. *19*(November 1996), 324–332.
- Baek, J. H., Hatakeyama, J., Sakamoto, S., Ohtsuka, T., & Kageyama, R. (2006). *Persistent and high levels of Hes1 expression regulate boundary formation in the developing central nervous system*. *2476*, 2467–2476. <https://doi.org/10.1242/dev.02403>
- Bai, G., Sheng, N., Xie, Z., Bian, W., Yokota, Y., Benezra, R., Kageyama, R., Guillemot, F., & Jing, N. (2007). Id Sustains Hes1 Expression to Inhibit Precocious Neurogenesis by Releasing Negative Autoregulation of Hes1. *Developmental Cell*, *13*(2), 283–297. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.05.014>
- Bansod, S., Kageyama, R., & Ohtsuka, T. (2017). Hes5 regulates the transition timing of neurogenesis and gliogenesis in mammalian neocortical development. *Development (Cambridge)*, *144*(17), 3156–3167. <https://doi.org/10.1242/dev.147256>
- Battiste, J., Helms, A. W., Kim, E. J., Savage, T. K., Lagace, D. C., Mandyam, C. D., Eisch, A. J., Miyoshi, G., & Johnson, J. E. (2007). Ascl 1 defines sequentially generated lineage-restricted neuronal and oligodendrocyte precursor cells in the spinal cord. *Development*, *134*(2), 285–293. <https://doi.org/10.1242/dev.02727>
- Bergles, D. E., & Richardson, W. D. (2016). Oligodendrocyte development and plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(2), 1–27. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020453>
- Boareto, M., Iber, D., & Taylor, V. (2017). *STEM CELLS AND REGENERATION Differential interactions between Notch and ID factors control neurogenesis by modulating Hes factor autoregulation*. <https://doi.org/10.1242/dev.152520>
- Bonaguidi, M. A., Wheeler, M. A., Shapiro, J. S., Stadel, R. P., Sun, G. J., Ming, G. L., & Song,

- H. (2011). In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*, *145*(7), 1142–1155. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.024>
- Breunig, J. J., Silbereis, J., Vaccarino, F. M., & Nenad, S. (2007). *Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus*. *104*(51).
- Doetsch, F. (2003). The glial identity of neural stem cells. In *Nature Neuroscience* (Vol. 6, Issue 11, pp. 1127–1134). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nn1144>
- Encinas, J. M., Michurina, T. V., Peunova, N., Park, J. H., Tordo, J., Peterson, D. A., Fishell, G., Koulakov, A., & Enikolopov, G. (2011). Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, *8*(5), 566–579. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.010>
- Furutachi, S., Miya, H., Watanabe, T., Kawai, H., Yamasaki, N., Harada, Y., Imayoshi, I., Nelson, M., Nakayama, K. I., Hirabayashi, Y., & Gotoh, Y. (2015). Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nature Neuroscience*, *18*(5), 657–665. <https://doi.org/10.1038/nn.3989>
- Gage, F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*, *53*(4 Suppl), 311–317.
- Geoffroy, C. G., Critchley, J. A., Castro, D. S., Ramelli, S., Barraclough, C., Descombes, P., Guillemot, F., & Raineteau, O. (2009). Engineering of dominant active basic helix-loop-helix proteins that are resistant to negative regulation by postnatal central nervous system antineurogenic cues. *Stem Cells*, *27*(4), 847–856. <https://doi.org/10.1002/stem.17>
- Giachino, C., Barz, M., Tchorz, J. S., Tome, M., Gassmann, M., Bischofberger, J., Bettler, B., & Taylor, V. (2014). GABA suppresses neurogenesis in the adult hippocampus through GABAB receptors. *Development (Cambridge)*, *141*(1), 83–90. <https://doi.org/10.1242/dev.102608>
- Götz, M., & Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 6, Issue 10, pp. 777–788). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm1739>
- Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F., & Kageyama, R. (2004). Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development*, *131*(22), 5539–5550. <https://doi.org/10.1242/dev.01436>
- HERBERT CHEN, ARUNTHATHI THIAGALINGAM, HEMI CHOPRA, MICHAEL W. BORGES, J. N. F., & BARRY D. NELKIN, STEPHEN B. BAYLIN, A. D. W. B. (1997). *Conservation of the Drosophila lateral inhibition pathway in human lung cancer : A hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression*. *94*(May), 5355–5360.
- Huang, W., Guo, Q., Bai, X., Scheller, A., & Kirchhoff, F. (2019). Early embryonic NG2 glia are

- exclusively gliogenic and do not generate neurons in the brain. *Glia*, 67(6), 1094–1103.
<https://doi.org/10.1002/glia.23590>
- Imayoshi, I., Ohtsuka, T., Metzger, D., Chambon, P., and Kageyama, R. (2006). Temporal Regulation of Cre Recombinase Activity in Neural Stem Cells. *Genesis*, 44(2), 233–238.
<https://doi.org/10.1002/dvg>
- Imayoshi, I., Isomura, A., Harima, Y., Kawaguchi, K., Kori, H., Miyachi, H., Fujiwara, T., Ishidate, F., & Kageyama, R. (2013). Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors. *Science*, 342(6163), 1203–1208.
<https://doi.org/10.1126/science.1242366>
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., & Kageyama, R. (2011). Genetic methods to identify and manipulate newly born neurons in the adult brain. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 5, Issue MAY, pp. 1–11). Frontiers. <https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00064>
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itohara, S., & Kageyama, R. (2008). Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature Neuroscience*, 11(10), 1153–1161. <https://doi.org/10.1038/nn.2185>
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K., & Kageyama, R. (2010). Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *Journal of Neuroscience*, 30(9), 3489–3498. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4987-09.2010>
- Imayoshi, I., Shimogori, T., Ohtsuka, T., & Kageyama, R. (2008). Hes genes and neurogenin regulate non-neural versus neural fate specification in the dorsal telencephalic midline. *Development*, 135(15), 2531–2541. <https://doi.org/10.1242/dev.021535>
- Ishibashi, M., Ang, S. L., Shiota, K., Nakanishi, S., Kageyama, R., & Guillemot, F. (1995). Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes and Development*, 9(24), 3136–3148.
<https://doi.org/10.1101/gad.9.24.3136>
- Jögi, A., Persson, P., Grynfeld, A., Pählman, S., & Axelson, H. (2001). *Modulation of Basic Helix-Loop-Helix Transcription Complex Formation by Id Proteins during Neuronal Differentiation*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107713200>
- KAGEYAMA, R., OCHI, S., SUEDA, R., & SHIMOJO, H. (2020). The significance of gene expression dynamics in neural stem cell regulation. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 96(8), 1–13.
<https://doi.org/10.2183/PJAB.96.026>
- Kim, E. J., Ables, J. L., Dickel, L. K., Eisch, A. J., & Johnson, J. E. (2011). Ascl1 (Mash1) Defines Cells with Long-Term Neurogenic Potential in Subgranular and Subventricular Zones in

- Adult Mouse Brain. *PLoS ONE*, 6(3), e18472.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018472>
- Kirby, B. B., Takada, N., Latimer, A. J., Shin, J., Carney, T. J., Kelsh, R. N., & Appel, B. (2006). In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nature Neuroscience*, 9(12), 1506–1511.
<https://doi.org/10.1038/nn1803>
- Kobayashi, T., Mizuno, H., Imayoshi, I., Furusawa, C., Shirahige, K., & Kageyama, R. (2009). The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. *Genes and Development*, 23(16), 1870–1875. <https://doi.org/10.1101/gad.1823109>
- Kokubo, H., Miyagawa-Tomita, S., Nakazawa, M., Saga, Y., & Johnson, R. L. (2005). Mouse hesr1 and hesr2 genes are redundantly required to mediate Notch signaling in the developing cardiovascular system. *Developmental Biology*, 278(2), 301–309.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.10.025>
- Kondo, T., & Raff, M. (2000). Basic helix-loop-helix proteins and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Development*, 127(14), 2989–2998.
- Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). *The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells*. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600>
- Lagace, D. C., Whitman, M. C., Noonan, M. A., Ables, J. L., DeCarolis, N. A., Arguello, A. A., Donovan, M. H., Fischer, S. J., Farnbauch, L. A., Beech, R. D., DiLeone, R. J., Greer, C. A., Mandyam, C. D., & Eisch, A. J. (2007). Dynamic contribution of nestin-expressing stem cells to adult neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, 27(46), 12623–12629.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3812-07.2007>
- Lahmann, I., Bröhl, D., Zyrianova, T., Isomura, A., Czajkowski, M. T., Kapoor, V., Griger, J., Ruffault, P. L., Mademtoglou, D., Zammit, P. S., Wunderlich, T., Spuler, S., Kühn, R., Preibisch, S., Wolf, J., Kageyama, R., & Birchmeier, C. (2019). Oscillations of MyoD and Hes1 proteins regulate the maintenance of activated muscle stem cells. *Genes and Development*, 33(9–10), 524–535. <https://doi.org/10.1101/gad.322818.118>
- Ming, G. li, & Song, H. (2011). Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron*, 70(4), 687–702.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001>
- Mira, H., Andreu, Z., Suh, H., Chichung Lie, D., Jessberger, S., Consiglio, A., Emeterio, J. S., Hortigüela, R., Marqués-Torrejón, M. Á., Nakashima, K., Colak, D., Götz, M., Fariñas, I., & Gage, F. H. (2010). Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 7(1), 78–89.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.016>
- Miyazono, K., & Miyazawa, K. (2002). Id: A Target of BMP Signaling. *Science Signaling*,

- 2002(151), pe40–pe40. <https://doi.org/10.1126/stke.2002.151.pe40>
- Nakatani, H., Martin, E., Hassani, H., Clavairoly, A., Maire, C. L., Viadieu, A., Kerninon, C., Delmasure, A., Frah, M., Weber, M., Nakafuku, M., Zalc, B., Thomas, J. L., Guillemot, F., Nait-Oumesmar, B., & Parras, C. (2013). *Ascl1/Mash1* promotes brain oligodendrogenesis during myelination and remyelination. *Journal of Neuroscience*, *33*(23), 9752–9768. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0805-13.2013>
- Ohtsuka, T., Ishibashi, M., & Gradwohl, G. (1999). *Hes1* and *Hes5* as Notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *The EMBO Journal*, *18*(8), 2196–2207. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.8.2196>
- Parras, C. M., Galli, R., Britz, O., Soares, S., Galichet, C., Battiste, J., Johnson, J. E., Nakafuku, M., Vescovi, A., & Guillemot, F. (2004). *Mash1* specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *The EMBO Journal*, *23*(22), 4495–4505. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600447>
- Parras, C. M., Hunt, C., Sugimori, M., Nakafuku, M., Rowitch, D., & Guillemot, F. (2007). The proneural gene *Mash1* specifies an early population of telencephalic oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience*, *27*(16), 4233–4242. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0126-07.2007>
- Pastrana, E., Cheng, L. C., & Doetsch, F. (2009). Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(15), 6387–6392. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810407106>
- Pilz, G.-A., Bottes, S., Betizeau, M., Jörg, D. J., Carta, S., Simons, B. D., Helmchen, F., & Jessberger, S. (2018). Live imaging of neurogenesis in the adult mouse hippocampus. *Science*, *359*(6376), 658–662. <https://doi.org/10.1126/science.aao5056>
- Seri, B., García-Verdugo, J. M., McEwen, B. S., & Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *21*(18), 7153–7160. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-18-07153.2001>
- Shimojo, H., Ohtsuka, T., & Kageyama, R. (2008). Oscillations in Notch Signaling Regulate Maintenance of Neural Progenitors. *Neuron*, *58*(1), 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.02.014>
- Song, J., Zhong, C., Bonaguidi, M. A., Sun, G. J., Hsu, D., Gu, Y., Meletis, K., Huang, Z. J., Ge, S., Enikolopov, G., Deisseroth, K., Luscher, B., Christian, K. M., Ming, G. L., & Song, H. (2012). Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature*, *489*(7414), 150–154. <https://doi.org/10.1038/nature11306>
- Sueda, R., & Kageyama, R. (2019). *Regulation of active and quiescent somatic stem cells by Notch signaling*. *2*(June), 1–8. <https://doi.org/10.1111/dgd.12626>

- Sugimori, M., Nagao, M., Parras, C. M., Nakatani, H., Lebel, M., Guillemot, F., & Nakafuku, M. (2008). *Ascl1* is required for oligodendrocyte development in the spinal cord. *Development*, *135*(7), 1271–1281. <https://doi.org/10.1242/dev.015370>
- Tomita, K., Ishibashi, M., Nakahara, K., Ang, S. L., Nakanishi, S., Guillemot, F., & Kageyama, R. (1996). Mammalian hairy and Enhancer of split homolog 1 regulates differentiation of retinal neurons and is essential for eye morphogenesis. *Neuron*, *16*(4), 723–734. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80093-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80093-8)
- Ueno, T., Ito, J., Hoshikawa, S., Ohori, Y., Fujiwara, S., Nakamura, K., & Ogata, T. (2012). *The Identification of Transcriptional Targets of Ascl1 in Oligodendrocyte Development*. *1505*(April), 1495–1505. <https://doi.org/10.1002/glia.22369>
- Urbán, N., Blomfield, I. M., & Guillemot, F. (2019). Quiescence of Adult Mammalian Neural Stem Cells: A Highly Regulated Rest. *Neuron*, *104*(5), 834–848. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.09.026>
- Vasconcelos, F. F., Sessa, A., Laranjeira, C., Raposo, A. A. S. F., Teixeira, V., Hagey, D. W., Tomaz, D. M., Muhr, J., Broccoli, V., & Castro, D. S. (2016). MyT1 Counteracts the Neural Progenitor Program to Promote Vertebrate Neurogenesis. *Cell Reports*, *17*(2), 469–483. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.024>
- Yamada, M., Suzuki, Y., Nagasaki, S. C., Okuno, H., & Imayoshi, I. (2018). Light Control of the Tet Gene Expression System in Mammalian Cells Resource Light Control of the Tet Gene Expression System in Mammalian Cells. *Cell Reports*, *25*(2), 487–500.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.026>
- Zhang, Y., Lu, X. Y., Casella, G., Tian, J., Ye, Z. Q., Yang, T., Han, J. J., Jia, L. Y., Rostami, A., & Li, X. (2019). Generation of oligodendrocyte progenitor cells from mouse bone marrow cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*(June), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00247>
- Zhao, C., Deng, W., & Gage, F. H. (2008). Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell*, *132*(4), 645–660. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.033>

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々にご指導・ご協力をいただきました。心より感謝申し上げます。主指導教員である影山龍一郎教授には、熱意あるご指導と多大なるご助言をいただきました。サイエンスの奥深さや考え方など重要なことを数多く学ばせていただきました。大変感謝しております。

本学位論文の作成と審査にあたり、ご助言をいただきました主査の今吉格教授、副査の見學美根子教授並びに豊島文子教授、専門委員の大塚俊之先生に厚く御礼を申し上げます。

また、影山研究室、今吉研究室の方々には大変お世話になりました。播磨有希子博士には、分子生物学実験やマウスの扱いなど技術を一から懇切丁寧に教えていただき、実験を行う上でのすべての基礎となりました。研究に対する真摯な姿勢を間近に見たことは、博士課程に進学し研究を突き進める大きな原動力となりました。今吉格先生には、共著者として一緒に論文を完成させていく中で、多くのアドバイスをいただきました。査読コメントに対する確かつ誠実に対応される姿からも多くの学びを得ました。大塚俊之先生、小林妙子先生には、修士課程から現在まで実験データだけでなく幅広い面で親身に相談に乗っていただき、大変お世話になりました。下條博美博士、磯村彰宏博士には、発光顕微鏡の取り扱いやデータ解析について細やかにご指導いただきました。神尾航平さんには、ライブイメージング用の脳スライスを作製についてご指導いただき、この技術により重要なデータを得ることができました。山田真弓博士にはオリゴデンドロサイトについての基礎知識や培養条件などを教えていただきました。前田勇樹さん、貝瀬峻さんには、実験条件や結果の解釈など日頃からディスカッションしていただき、多くのアドバイスを頂きました。

見學美根子教授、松田道行教授には、修士課程から副指導教員としてアドバイスいただき、大変お世話になりました。

最後に、これまで応援してくれた両親に深く感謝しております。

本学位論文は下記の学術論文の内容に基づいて書かれたものです。

1. Risa Sueda*, Itaru Imayoshi*, Yukiko Harima and Ryoichiro Kageyama
(* equal contribution)

High Hes1 expression and resultant Ascl1 suppression regulate quiescent vs. active neural stem cells in the adult mouse brain.

Genes and Development, 2019 May, 33: 511-523. DOI:10.1101/gad.323196.118

2. Risa Sueda and Ryoichiro Kageyama

Oscillatory expression of Ascl1 in oligodendrogenesis.

Gene Expression Patterns, 2021 Sep, DOI: 10.1016/j.gep.2021.119198