

戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究終了報告書

研究課題

「マウス大脳神経幹細胞の
時期依存的シグナル応答機構の解析」

研究期間：平成16年12月 1日～
平成19年 3月31日

後藤 由季子
(東京大学、教授)

1. 研究実施の概要、2 研究構想

哺乳類動物の中樞神経系は、非常に多様なニューロンと、それを機能的に支持するグリア細胞（アストロサイト、オリゴデンドロサイト）から構成される。これらの細胞は共通の前駆細胞である神経系前駆細胞が分化して産生される。神経系前駆細胞は発生過程において、その運命を大きく変化させる。発生初期には中樞神経系は一層のシート状の上皮構造として外胚葉から形成され（神経上皮）、その後背側でシートの両端が閉じることで管構造を作る（神経管）。神経上皮を構成する神経系前駆細胞は、はじめ未分化性と多分化能を保ちながら増殖を繰り返し数を増やす（マウスなら胎生8～10日）。発生後期（マウスなら胎生11日から17日）になると神経系前駆細胞は増殖するとともに一部がニューロンへと分化する（「ニューロン分化期」とここでは呼ぶ）。さらに出産前後にはニューロン分化は終了し、分化せずに残った神経系前駆細胞はグリアを産生するようになる（「グリア分化期」または「アストロサイト分化期」と呼ぶ）。この、ニューロン分化が先でグリア分化が後、という順序は哺乳類の中樞神経系発生では共通に見られる現象である。どのくらいの期間ニューロン分化期が続くかによって、最終的なニューロンの数が大きく左右されることになる。従ってこのニューロン分化期からグリア分化期への移行のタイミングを決めるメカニズムは、最終的なニューロンの数（ならびに脳組織構築）を決める上で重要であるが、その分子基盤はほとんど明らかになっていなかった。

哺乳類大脳の神経系前駆細胞がニューロン系譜へと運命を決定する際には、basic helix-loop-helix (bHLH) ドメインを有する転写因子群（proneural bHLH 転写因子群）が重要な役割を果たす事が知られている。大脳新皮質（背側）においては neurogenin1 (Ngn1) と neurogenin2 (Ngn2) がニューロン分化に必須の役割を果たしている。Proneural bHLH 転写因子はニューロン分化を促進するだけでなく、アストロサイト分化を抑制する事も知られていた。例えばこれまでに Proneural bHLH 遺伝子 Ngn2, Mash1 のダブルノックアウトマウスの大脳において、ニューロン分化が抑制されるだけでなく、アストロサイト分化の早期誘導が観察されている。すなわち、proneural bHLH 遺伝子の発現がある限りはニューロン分化期が継続しアストロサイト分化が抑制され、proneural bHLH 遺伝子の発現が無くなればニューロン分化が低下してアストロサイト分化出来るようになる、というように、proneural bHLH 遺伝子の発現制御でニューロン分化期からアストロサイト分化期への移行を説明出来る可能性を示唆している。従っ

て proneural bHLH 転写因子の発現制御が神経系前駆細胞の時期依存的な運命転換にとって非常に重要であると考えられるが、そのメカニズムは大部分が不明であった。我々はこれまでに、「大脳発生中期」（マウス胎生 11～15 日目頃）に由来する神経系前駆細胞において Wnt- β -catenin 経路が Neurogenin 1 (Ngn1) の発現誘導を介しニューロンへの分化を誘導的に促進することを報告している (Hirabayashi et al. 2004)。興味深い事に、ニューロン分化期である「大脳発生中期」だけでなく、グリア分化期である「大脳発生後期」（出生前後頃）においても Wnt リガンドが大脳皮質において発現を続けている事が知られている。それではなぜ、大脳発生後期においては Wnt リガンドが存在しているにも関わらず、ニューロンが産生しないのであろうか。まず、Wnt 受容体等の発現が低下し、Wnt リガンドが存在していてもシグナルが伝達されていない可能性がある。しかし、Wnt の下流でシグナルを伝達する β -catenin の活性型（安定型）を神経系前駆細胞に発現させた場合にも、発生中期由来の神経系前駆細胞であればニューロン分化が誘導されるが、発生後期由来の神経系前駆細胞ではニューロン分化は誘導されないことが明らかになった（このとき、活性型 β -catenin を発現すれば後期であっても転写因子 TCF と活性のある転写複合体を形成する事は、TCF レポーターアッセイで確認している）。また、活性型 β -catenin を発現しても中期神経系前駆細胞では Ngn1, Ngn2 の発現が誘導されるが、後期神経系前駆細胞においては Ngn1, Ngn2 の発現が見られなかった。一方で Ngn1 を発現した場合には発生中期・後期いずれの神経系前駆細胞もニューロンに分化した。以上の結果から、後期神経系前駆細胞においては、Wnt- β -catenin 経路が活性化しても、何らかのメカニズムによってそのターゲット遺伝子である Ngn1, Ngn2 の発現が誘導されなくなることによって、ニューロン分化が抑制され、グリア分化（アストロサイト分化）が保証されることが示唆された。

そこで次に発生後期になると β -catenin による Ngn1, Ngn2 の発現が誘導されなくなるメカニズムについて調べた。Ngn1 および Ngn2 プロモーター領域のクロマチン状態について検討したところ、この領域を含むクロマチンのヒストン H3 のアセチル化レベルが発生後期になるにつれて低下していたことが明らかになった。またヒストン deacetylase (HDAC) 阻害剤である Valproic acid を神経系前駆細胞に処理したところ、Ngn1, Ngn2 発現量の増加が見られ、またこの発現量の増加 (derepression) は中期に比べ後期の神経系前駆細胞の方が顕著に見られた。このことは Ngn1 および Ngn2 のプロモーター領域が発生後期になると HDAC 依存的なメカニズムにより早期よりも転写されにくい状態になっており、その結果 Ngn1, Ngn2 が発現誘導されにくくなっていることを示唆している。さらに、ヒストンの抑制性修飾についても検討した。Polycomb 複合体によって修飾され転写

抑制的に働く事の知られているH3K27トリメチル化についてクロマチン免疫沈降によってNgn1, Ngn2プロモーター上の量を調べた所、発生の後期に向かって徐々にH3K27トリメチル化量が上昇する事が明らかになった。そこでPolycomb複合体の必須の構成因子Eedのノックダウンを行った所、発生後期になっても神経系前駆細胞のニューロン分化がWntシグナルによって誘導され易くなる事が示された。

以上の結果は、神経系前駆細胞が発生過程においてニューロン分化期からグリア分化期（アストロサイト分化期）に運命転換する際の細胞内因性の分子メカニズムの一つとして、Ngn1, Ngn2プロモーターのepigeneticな制御が存在することを示唆している。すなわち、時間経過とともに徐々にNgn1, Ngn2プロモーター上のヒストンアセチル化量が（HDAC依存的に）減少し、ヒストンH3K27トリメチル化量が（Polycomb依存的に）上昇し、これによって後期においてはNgn1, Ngn2プロモーターのクロマチン状態が閉じた状態になるために、例えばWnt- β -catenin経路が活性化してもNgn1, Ngn2が転写されず、ニューロン分化が停止してアストロサイト分化が起こるようになる、ということが示唆された。

現在更に、Ngn1, Ngn2プロモーター上にいかなる分子基盤でPolycomb依存的な修飾が遺伝子座特異的、時期特異的に誘導されるのかを検討中である。また、ニューロン分化期中でも異なる種類のニューロンが時期依存的に産生される際のメカニズムについても調べつつある。

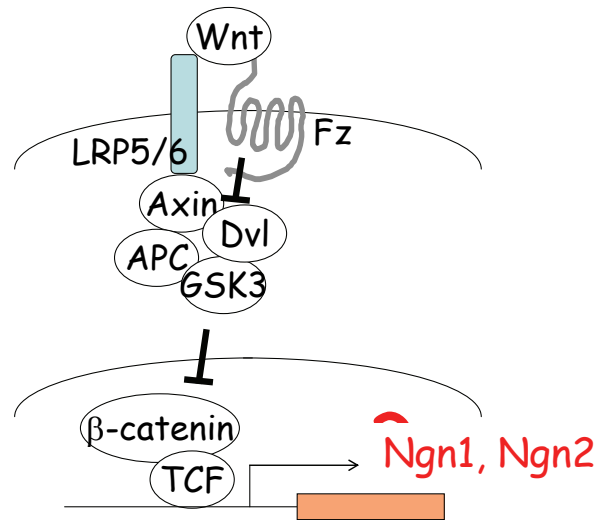
3. 研究内容

(1) 実施の内容

Wntシグナルは発生後期においては脳新皮質由来神経系前駆細胞のニューロン分化を促進しない

当グループは以前に、胎生11日目マウスから採取した脳皮質由来神経系前駆細胞において、Wntカノニカル経路（ β -cateninを介する）が”Instructive”にニューロン分化を誘導する事、またその際のターゲットがproneural bHLH転写因子であるNeurogenin (Ngn) 1およびNgn2であることを報告した（図1）。

WntシグナルはNgn1, Ngn2発現を介して ニューロン分化を誘導する Hirabayashi et al. 2004

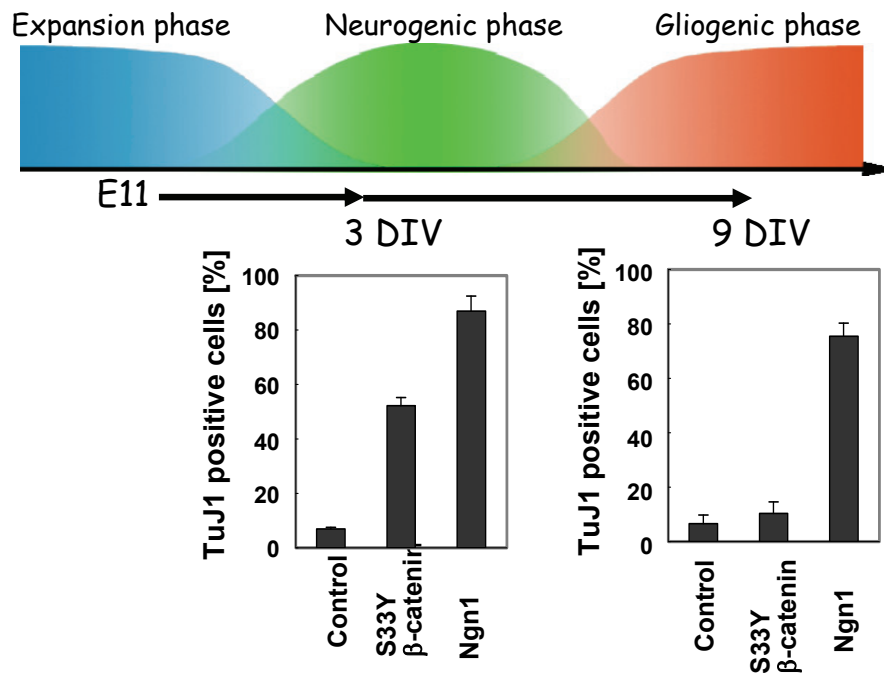


一方、大脳発生の後期（出生前後）には神経系前駆細胞はほとんどニューロンへと分化しなくなり、アストロサイトへと分化するようになる。大脳発生の後期においてWnt7aは発現しなくなるが、Wnt7b, Wnt5b, Wnt8bは大脳新皮質に発現し続けており、またレセプターのFrizzled5, 8も発現し続ける。このことから、大脳発生後期の神経系前駆細胞においてもWntシグナルが作用し続けている可能性が十分に考えられる。それでは、なぜ発生後期の神経系前駆細胞ではニューロン分化が起こっていないのであろうか。そこで、後期の神経系前駆細胞におけるWntシグナルに対する応答を調べた。

in vivo においてみられる、発生中期にはニューロン分化、発生後期にはアストロサイト分化という運命変化は神経系前駆細胞の in vitro培養系でも再現される(Qian et al., 2000)。例えば胎生11.5日目胚由来の神経系前駆細胞を3日間in vitroで培養しFGF2、EGFを除去した分化条件にするとこれらの細胞は胎生14.5日目付近の神経系前駆細胞の性質を示し多くの細胞がニューロンに分化する。一方で、同じ細胞を9日間培養し分化条件にした場合には、出生後の神経系前駆細胞の性質を示し多くの細胞がアストロサイトへと分化する。このことを利用し、発生後期の神経系前駆細胞におけるWntシグナルの役割を検討した。胎生11.5日目由来の神経系前駆細胞を3日間 in vitroで培養した後に活性化型β-cateninを導入したところ、これまで我々が報告してきた通りにニューロン分化が誘導された。しかし、胎生11.5日目由来の神経系前駆細胞を6日間in vitro

で培養した後(6 days in vitro, DIV)に活性型 β -cateninを導入したところ、ニューロンへ分化誘導された細胞の割合は部分的に減少した。そして、9日間in vitroで培養した(9 DIV)後期にあたる神経系前駆細胞においては活性型 β -cateninを導入してもニューロン分化はほとんど誘導されなかった(図2)。

Stage-specific fate regulation of NPCs by Wnt signaling



このことから、発生後期の神経系前駆細胞においてはWntシグナルによるニューロン分化の誘導が起こらないことが示唆された。

発生後期の神経系前駆細胞においてもNgn1の発現はニューロン分化を誘導しうる

次に後期の神経系前駆細胞において、Wntシグナルの活性化によりニューロン分化が誘導されなくなるメカニズムについて検討を行った。メカニズムとして、(1)後期神経系前駆細胞においては活性型 β -cateninを発現させても(Wntシグナルが活性化しても)Ngn1の発現が誘導されない、あるいは(2)Ngn1の発現が誘導されてもニューロン分化が誘導されないという少なくとも二つの可能性が考えられる。まず β -catenin/TCF転写複合体によってNgn1が誘導されても、後期神経系前駆細胞においてはNgn1がニューロン分化を促進しない可能性について検討した。9日間 in vitroで培養した後期にあたる細胞にNgn1を発現したところ、発生中期の細胞の場合と同様にニューロン分化が誘導された(図2)。従って、(2)の可能性は否定された。次に、後期の細胞ではWntシグナルによってNgn1の発現が誘導されない可能性について検討した。この可能性を調べるために、

後期にあたる神経系前駆細胞にGSK3阻害剤処理を行いWntシグナルを活性化させた後RNAを採取し、RT-PCRによってNgnの発現量を調べた。発生中期の神経系前駆細胞ではGSK3阻害剤処理によってNgn1, Ngn2のmRNA発現量が上昇したのに対し、後期の神経系前駆細胞においてはNgn1, Ngn2のmRNAはほとんど検出されず、GSK3阻害剤による上昇もみられなかった。従って(1)の可能性が支持された。

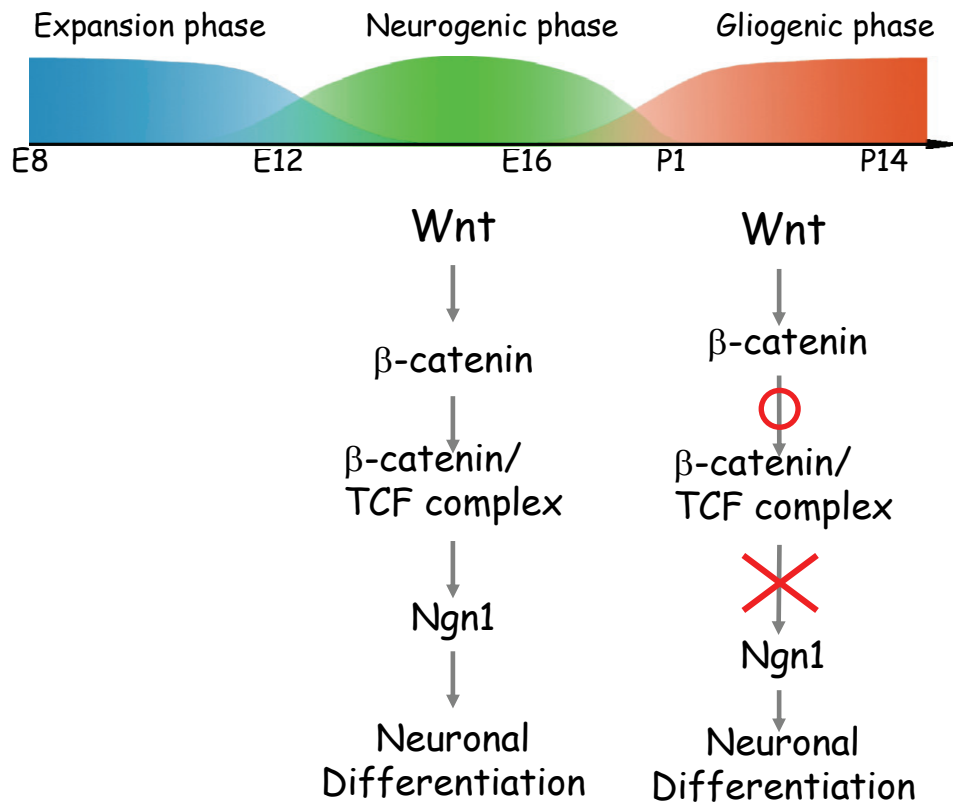
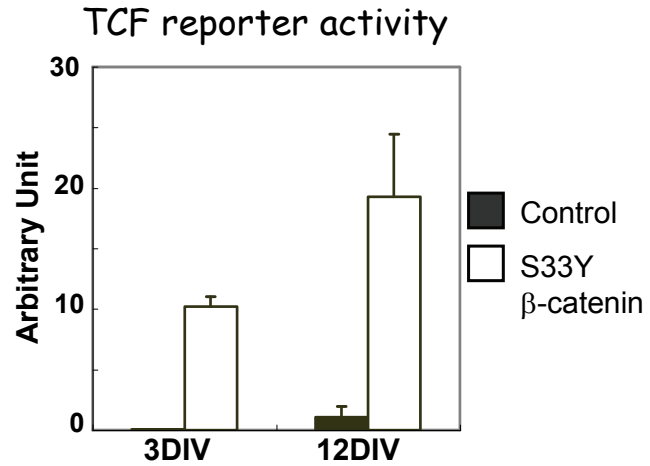
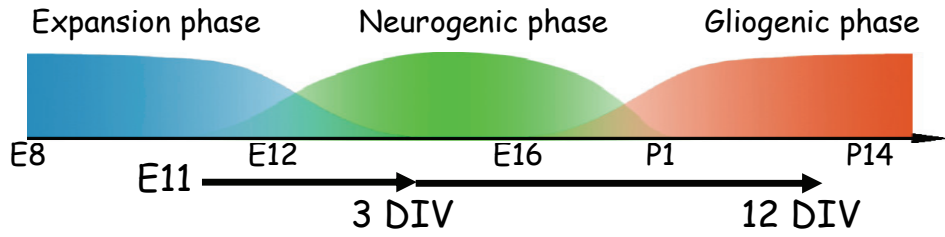
発生後期の神経系前駆細胞においても活性のある β -catenin/TCF転写複合体が形成される

以上のように、中期の神経系前駆細胞ではWntシグナルによりNgn1の発現が誘導されるのに対し、後期になるとこの発現誘導はみられなくなる。後期になると活性型 β -cateninを導入してもNgn1が発現しなくなるメカニズムとして少なくとも二つの可能性が考えられる。一つは、TCFやp300といった β -cateninによる転写活性化に必須の因子が後期では発現しなくなり、

活性型 β -cateninを導入しても活性のある β -catenin/TCF転写複合体が形成されない可能性であり、もう一つは活性のある β -catenin/TCF転写複合体が形成されてもNgn1の発現が誘導されない可能性である。まず前者の可能性について検討した。

もし、転写活性化に必須の因子の発現がなくなっているのであれば、活性型 β -cateninを導入したときにTCF応答性レポーター、superTOP-FLASHの活性は上昇しないはずである{Veeman, 2003 #137}。そこで、中期と後期それぞれの細胞において、superTOP-FLASHを用いたレポーターアッセイを行い β -catenin/TCF複合体による転写活性を測った。その結果、後期の神経系前駆細胞においても活性型 β -cateninを導入することによってTOP-FLASHの活性は大きく上昇した (図3)。

このことから後期の神経系前駆細胞においても活性型 β -cateninの導入によって活性のある β -catenin/TCF転写複合体が形成されることが示された。以上の結果から後期神経系前駆細胞においては活性のある β -catenin/TCF転写複合体が形成されてもNgn1, Ngn2の発現が誘導されないことが示唆された (図4)。

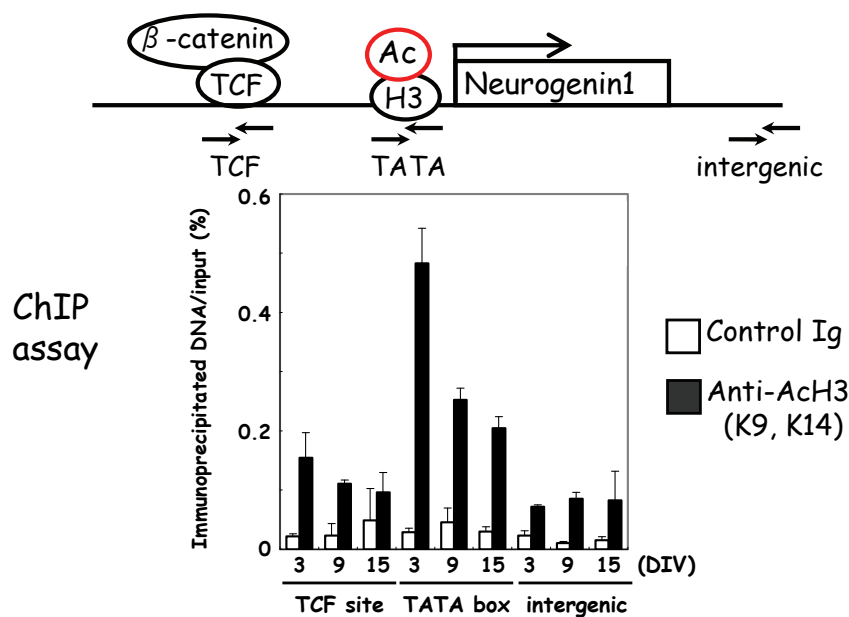


後期神経系前駆細胞においてはNgn1プロモーター領域のhistone H3のアセチル化が低下している

後期の神経系前駆細胞において、活性型 β -cateninは細胞外から導入したTCF応答性プロモーターによる遺伝子発現を誘導しても、Ngn1, Ngn2の発現を誘導しなかった。このことから、後期の神経系前駆細胞においてはNgn1, Ngn2のプロモーター領域のゲノムを含むクロマチンにおいて、時期依存的な何らかの制御がなされているのではないかと考え、次にこの領域のクロマチンの状態を検討した。

様々な転写促進に関わる因子がクロマチンにリクルートされるために、histone H3 リジン(K)9, K14のアセチル化が重要であることが分かっている。そこで発生中期および、発生後期の神経系前駆細胞におけるNgn1プロモーター領域のクロマチンにおける histone H3 K9, K14のアセチル化状態をクロマチン免疫沈降法により調べた。histone H3 K9, K14のアセチル化を認識する抗体の沈降物中に含まれているゲノム量を、Ngn1プロモーター、及びNgn1コーディング領域から2kbp分3'側の部位について定量化した。その結果、Ngn1コーディング領域の3'側の部位はあまりアセチル化されておらず、アセチル化の程度も神経系前駆細胞のステージによらなかった。一方でNgn1プロモーターのTATA box付近のクロマチンについて調べたところ、ニューロン分化期である中期の神経系前駆細胞においてはアセチル化のレベルが高かった。また、このアセチル化のレベルは後期になるにつれて低下していた (図5)。

The levels of HistoneH3K9,14 acetylation are decreased in the late NPCs



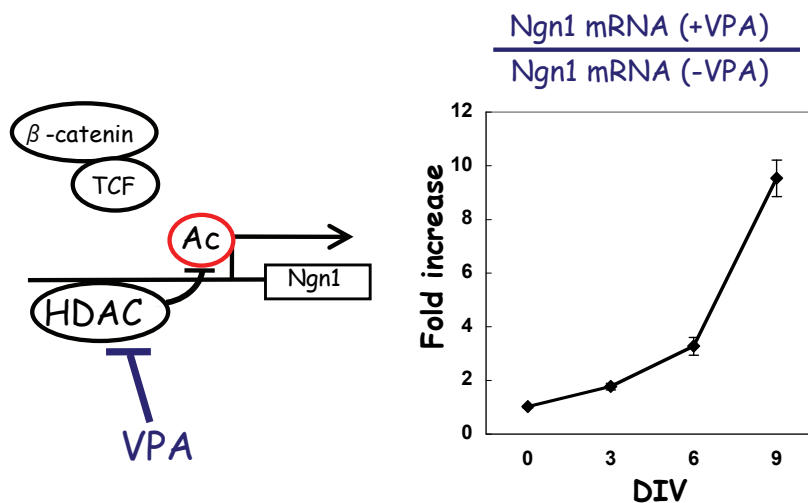
同時にNgn1プロモーターのTCF結合コンセンサス配列付近のアセチル化状態について調

べたところ、この領域でのアセチル化レベルは高くなく、また時期による変化も観察されなかった。

Histone deacetylase (HDAC) 阻害剤処理によって、Ngn1の発現量は上昇する

Ngn1プロモーターのTATA box付近のクロマチンにおけるhistoneのアセチル化レベルは、発生の後期ほど低下していた。これは、この領域に存在するhistoneがHDACにより積極的に脱アセチル化されている結果である可能性が考えられる。そこで、class I HDACの阻害剤であるvalproic acid (VPA)を作用させ、Ngn1の発現量に対して及ぼす影響を調べた。胎生11.5日目由来神経系前駆細胞を浮遊培養せずにそのままプレート上で培養した細胞、胎生11.5日目由来神経系前駆細胞を3日間、あるいは6日間in vitroで浮遊培養した後にプレート上で培養した細胞のそれぞれにVPAを作用させ24時間後に細胞を回収しmRNAを採取した。その結果、in vitroでの培養期間によらずVPA処理によって、Ngn1 mRNAの発現量は増加した。また、in vitroでの培養期間が長い、即ちより後期の細胞ほどVPAによる発現量の増加率が大きかった (図6)。

HDAC contributes to the suppression of neurogenin1 expression in the late NPCs

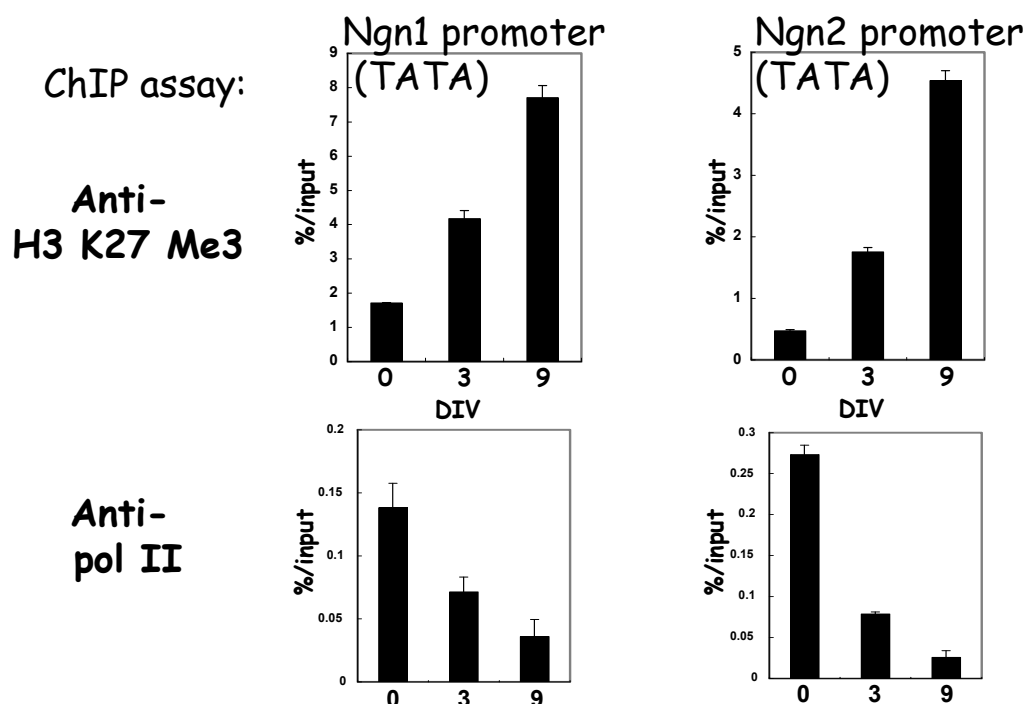


以上の結果は、神経系前駆細胞においてHDACがNgn1の発現制御に関与しており、より後期の神経系前駆細胞ほどHDACによるNgn1発現の抑制効果を強く受けていることを示唆している。Ngn1だけでなく、Ngn2の遺伝子座についても同様の結果を得ている。

後期神経系前駆細胞においてはNgn1, 2プロモーター領域のヒストンH3のK27トリメチル化が増加している

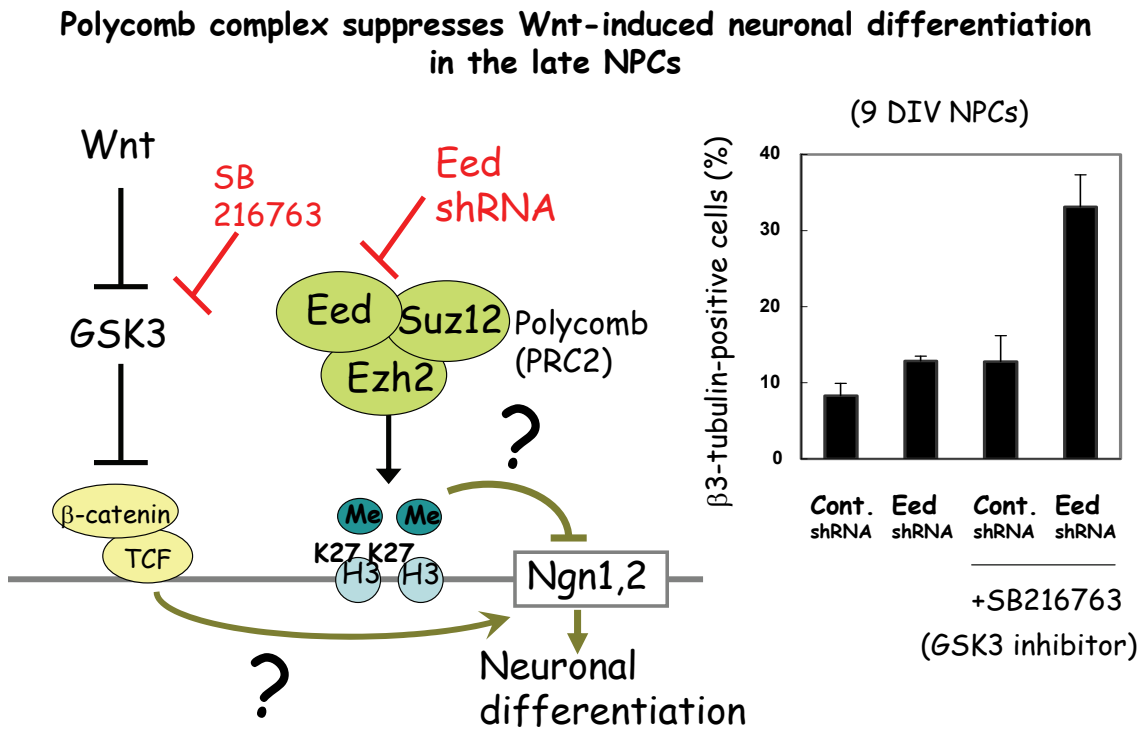
次に、ヒストンの抑制性修飾についても検討した。Polycomb複合体によって修飾され転写抑制的に働く事の知られているH3K27トリメチル化についてクロマチン免疫沈降によってNgn1, Ngn2プロモーター上の量を調べた所、発生の後期に向かって徐々にH3K27トリメチル化量が上昇する事が明らかになった (図7)。また、同時に転写を担うRNA polymerase IIについてもクロマチン免疫沈降を行った所、H3K27トリメチル化と逆相関し、発生の後期に向かって徐々に減少した (図7)。従って、ヒストンアセチル化だけでなくH3K27トリメチル化もNgnプロモーターの時期依存的な抑制に関与する可能性が示された。

Histone H3 K27 trimethylation is increased at Ngn1 and Ngn2 promoters in late NPCs

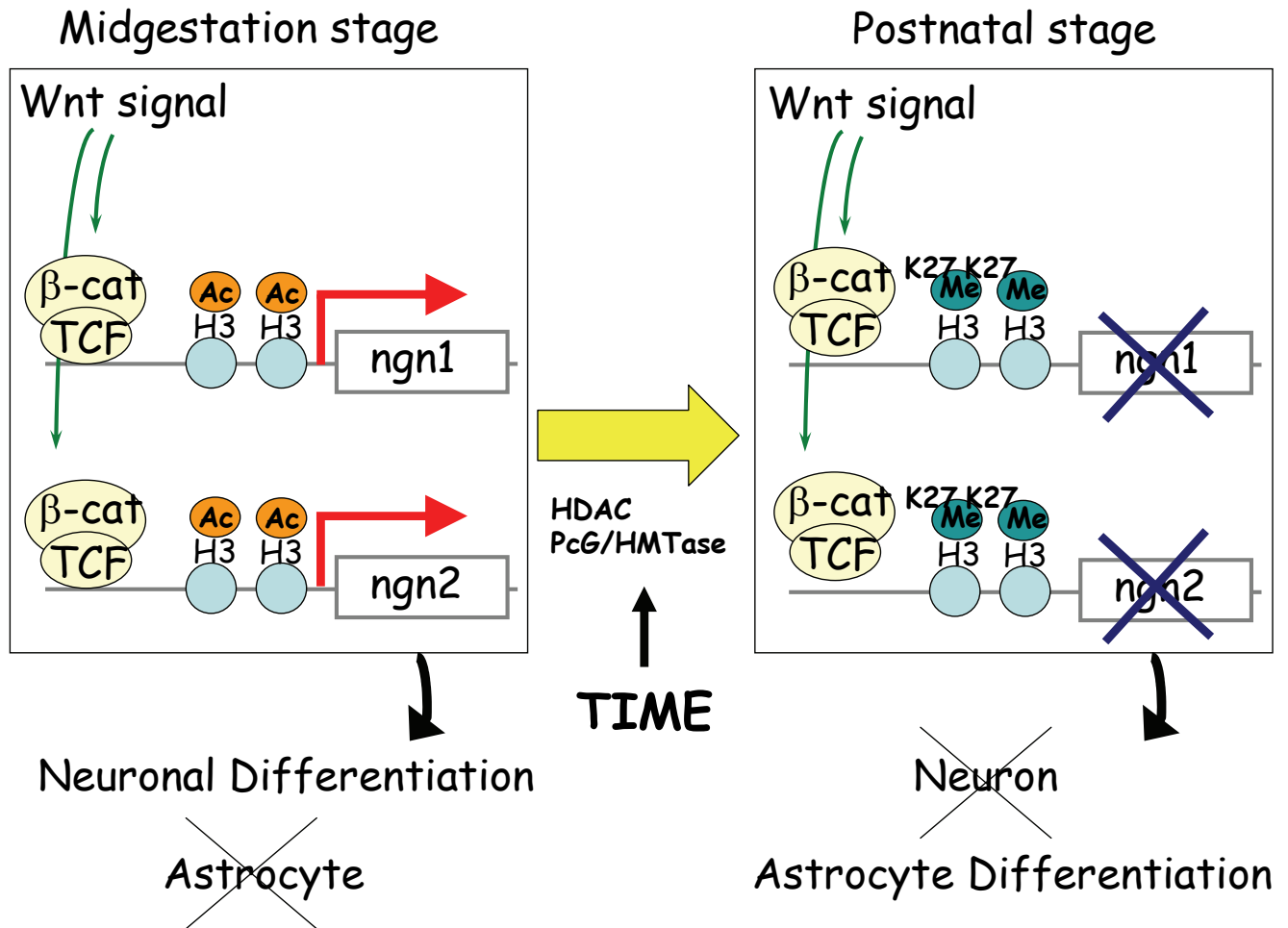


そこでH3K27トリメチル化を担うPolycomb複合体 (PRC2) の必須の構成因子Eedのノックダウンを行い、ニューロン分化への影響を検討した。発生後期の神経系前駆細胞 (9DIV) の場合、GSK3阻害剤によって内在性Wntシグナルを活性化したときほとんどニューロン分化の誘導や認められなかったが、Eedをノックダウンした場合にはGSK3阻害

剤処理によるニューロン分化の促進が観察された（図8）。

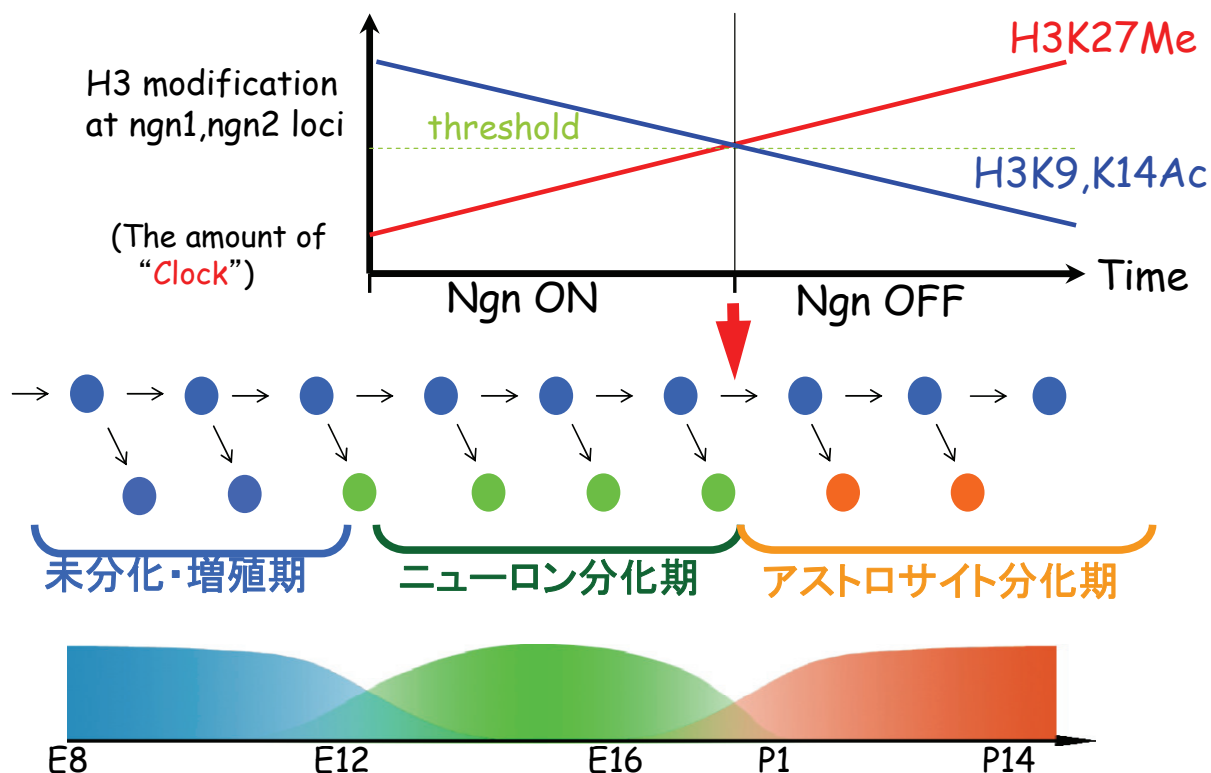


このようなEedノックダウンによるWntシグナルのニューロン分化を促進する効果は、発生中期の神経系前駆細胞（3DIV）では見られなかった。従って、polycomb複合体の活性は、神経系前駆細胞のWntシグナルによるニューロン分化を、後期でのみ抑制していることが示唆された。以上の結果から、時間経過とともに徐々にNgn1, Ngn2プロモーター上のヒストンアセチル化量が（HDAC依存的に）減少し、ヒストンH3K27トリメチル化量が（Polycomb依存的に）上昇し、これによって後期においてはNgn1, Ngn2プロモーターのクロマチン状態が閉じた状態になるために、例えWnt-β-catenin経路が活性化してもNgn1, Ngn2が転写されず、ニューロン分化が停止してアストロサイト分化が起こるようになる、というメカニズムが示唆された（図9）。



神経系前駆細胞が発生過程においてニューロン分化期からグリア分化期(アストロサイト分化期)に運命転換する際の細胞内因性の分子メカニズムの一つとして、Ngn1, Ngn2 プロモーターのepigeneticな制御が存在し、これらが時間を計るメカニズムのひとつとなっていることを示唆している(図10)。

Ngn遺伝子座のエピジェネティカルな変化が時間を計っている？



(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される成果

これまで、脳の神経系前駆細胞が発生過程において運命を変える事が記述されてきたが、その分子的なメカニズムについては未だ非常に限られた知見しかない。今回得られた結果は、ニューロン分化期からグリア分化期への運命転換において鍵となる分子メカニズムを明らかにした点で意義深い。神経系前駆細胞（神経幹細胞とも呼ばれる）の運命制御については、細胞外因性の制御（分泌因子、接着因子等）および内因性の遺伝子プログラムの両方が重要であると考えられているが、本研究はその組み合わせが運命制御において主要な役割を果たす事を示している。

現在更に、Ngn1, Ngn2プロモーター上にいかなる分子基盤でPolycomb依存的な修飾が遺伝子座特異的、時期特異的に誘導されるのかを検討中である。また、ニューロン分化期の中でも異なる種類のニューロンが時期依存的に産生される際のメカニズムについても調べつつある。

神経幹細胞は再生医療へのポテンシャルから注目されているが、その運命制御機構がほとんど明らかになっていない事が応用の際の障壁となっている。特に移植された神経幹細胞が、必要なニューロンでなくアストロサイト分化する傾向にあることが一つの問

題となっている。本研究で明らかにしてニューロン分化能を失わせアストロサイト分化に向かわせる機構が、そのような問題を克服する際の基礎知識となる可能性があると期待している。

4. 研究実施体制

(1)体制

研究代表者 後藤 由季子

後藤グループ 東京大学 分子細胞生物学研究所 情報伝達研究分野
神経系前駆細胞の運命制御に関わるシグナル伝達の解析を担当

(2)メンバー表

後藤グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
後藤 由季子	東京大学分子細胞生物学研究所	教授	研究の総括	平成16年12月～ 平成19年3月
樋口 麻衣子 増山 典久 加藤 智子 平林 祐介 吉松 剛志 伊藤 靖浩 大西 啓介 寰島 弘 青木 一郎 綿谷 健治 川口 大地 桑原 篤 森永 光一郎 大橋 淳一郎	以下全員 同上	助手 助手 技術補佐員 博士研究員 博士研究員 D3 D3 D3 D2 D2 D1 D1 D1 M2	神経系前駆細胞の運命制御に関わるシグナル伝達の解析 以下も同上の研究を行う	H16. 12- H19. 3 H16. 12- H19. 3 H16. 12- H19. 3 H16. 12- H19. 3 H16. 12- H19. 3 H16. 12- H19. 3 H16. 12- H19. 3 H17. 10- H19. 3 H16. 12- H19. 3 H16. 12- H19. 3 H16. 12- H19. 3 H16. 12- H19. 3 H16. 12- H18. 3 H16. 12- H18. 3

岩井 謙一	M2	H16. 12-	H18. 3
岸 雄介	M2	H17. 3-	H19. 3
中野 徳重	M2	H17. 3-	H19. 3
長谷川 強	M2	H17. 3-	H19. 3
米山 知佳子	M2	H17. 3-	H19. 3
伊達 靖	M1	H18. 3-	H19. 3
鈴木 はな絵	M1	H18. 3-	H19. 3
二宮 寿洋	M1	H18. 3-	H18. 9
金 明煥	M1	H18. 3-	H19. 3
小野口 真広	M1	H18. 3-	H19. 3
岡崎 朋彦	M1	H18. 3-	H19. 3
古館 昌平	M1	H18. 3-	H19. 3

5. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2006年3月 1日-3日	JBSバイオフロンティアシンポジウム “タンパク質修飾と 遺伝子制御：組織分 化／幹細胞における 役割”	グリーン プラザ軽 井沢(群馬 県)	100名	組織の発生や再生の過程を理解する上で、「幹細胞」あるいは各種の前駆細胞のアイデンティティと運命制御を明らかにする

(2) 招聘した研究者等

なし

6. 主な研究成果

(1) 論文発表 (国内 6件、海外13件)

国内

伊藤靖浩、後藤由季子、神経系前駆細胞と脳がん幹細胞、 *Medical Science Digest* 31, 353-357, 北隆館 2005

樋口麻衣子、後藤由季子、Akt の活性化因子と哺乳類における機能、*実験医学* 23 増刊, 1679-1685, 羊土社 2005

砂山潤、鶴田文憲、後藤由季子、細胞生存シグナルと死シグナルのバランスによる生死決定機構、 *実験医学* 23, 2006-2011, 羊土社 2005

大石 康二・後藤 由季子、脳発生と細胞死、*実験医学* 増刊、22(11)、pp1634-1639、2004

鎌倉 幸子・吉松 剛志、後藤 由季子、神経幹細胞の運命を制御する Notch-Hes 経路と JAK-STAT3 経路のクロストーク、*実験医学*、22(15)、pp2167-2170、2004

大橋 淳一郎、後藤 由季子、生存シグナル、*生体の科学*、55(5)、 pp450-451、2004

海外

Onishi, K., Higuchi, M., Asakura, T., Masuyama, N., and Gotoh, Y.(2007)
The PI3K-Akt pathway promotes microtubule stabilization in migrating fibroblasts. **Genes to Cells** 12, 535–546.

Itoh, Y., Masuyama, N., Nakayama, K., Nakayama, K.I. and *Gotoh, Y. (2007) The cdk inhibitors p57 and p27 regulate neuronal migration in the developing mouse neocortex. **J. Biol. Chem.** 282, 390-396.

Yoshimatsu, T., Kawaguchi, D., Oishi, K., Takeda, K., Akira, S., Masuyama, N. and Gotoh, Y. (2006) Non-cell-autonomous action of STAT3 in maintenance of neural precursor cells in the mouse neocortex. **Development** 133, 2553-2563.

Sunayama, J., Tsuruta, F., Masuyama, N. and Gotoh, Y. (2005)
JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. **J. Cell. Biol.** 170, 295-304.

Hirabayashi, Y. and Gotoh, Y. (2005) Stage-dependent fate determination of neural precursor cells in mouse forebrain. **Neurosci. Res.** 51, 331-336.

Oishi, K., Kamakura, S., Isazawa, Y., Yoshimatsu, T., Kuida, K., Nakafuku, M., Masuyama, N. and Gotoh, Y. (2004) Notch promotes survival of neural precursor cells via mechanisms distinct from those regulating neurogenesis. **Dev. Biol.** 276, 172-184.

Kamakura, S., Oishi, K., Yoshimatsu, T., Nakafuku, M., Masuyama, N. and Gotoh, Y. (2004)
Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signaling. **Nat. Cell Biol.** 6, 547-554

Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N. and Gotoh, Y. (2004) JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. **EMBO J.** 23, 1889-1899.

Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N. and Gotoh, Y. (2004) The Wnt-beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. **Development** 131, 2791-2801.

Miyagi, S., Saito, T., Mizutani, K., Masuyama, N., Gotoh, Y., Iwama, A., Nakauchi, H., Masui, S., Niwa, H., Nishimoto, M., Muramatsu, M. and Okuda, A. (2004) The sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct multipotent stem cells. **Mol. Cell. Biol.** 24, 4207-4220.

Sunayama, J., Ando, Y., Itoh, N., Tomiyama, A., Sakurada, K., Sugiyama, A., Kang, D., Tashiro, F., Gotoh, Y., Kuchino, Y. and Kitanaka, C. (2004) Physical and functional interaction between BH3-only protein Hrk and mitochondrial pore-forming protein p32. **Cell Death Differ.** 11, 771-781.

Mori, Y., Higuchi, M., Masuyama, N. and Gotoh, Y. (2004) Adenosine A2A receptor facilitates calcium-dependent protein secretion through the activation of protein kinase A and phosphatidylinositol-3 kinase in PC12 cells. **Cell Struct. Funct.** 29, 101-110.

Ogihara T, Asano T, Katagiri H, Sakoda H, Anai M, Shojima N, Ono H, Fujishiro M, Kushiyaama A, Fukushima Y, Kikuchi M, Noguchi N, Aburatani H, Gotoh Y, Komuro I, Fujita T. (2004) Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-B pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase. **Diabetologia** 5, 794-805.

(2) 口頭発表

①招待、口頭講演 (国内 4件、海外10件)

Yukiko Gotoh: "Regulation of cell death by phosphorylation". 6th Joint Conferences of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association: Advances in Cancer Research 2004. Waikoloa, Hawaii, January 25-28 2004.

Yukiko Gotoh: "Regulation of 14-3-3 function by phosphorylation". Gordon Research Conference: Biology of 14-3-3 proteins. Ventura, CA, February 22-27, 2004.
(Session Chair and Speaker)

Yukiko Gotoh: "Cell death regulation by kinases". Molecular Cancer Therapeutics: A symposium celebrating 30 years of cooperation in Cancer Research sponsored by JSPS and NCI. Washington DC, March 1-2, 2004.

Yukiko Gotoh: "Regulation of cell death by phosphorylation". 16th International Congress of the IFAA. Kyoto. August 22-27, 2004.

Yukiko Gotoh: "Fate regulation of neural precursor cells in the embryonic mouse neocortex". International Symposium on Adult Neurogenesis in Normal and Pathological Conditions. Okazaki. November 11-13, 2004.

Yukiko Gotoh: "Cell death regulation by kinases". Cell Death, Cell Cycling and Cell Senescence. Kazusa. November 17-19, 2004.

Yukiko Gotoh: Fate regulation of neural precursor cells in the embryonic mouse neocortex, International Society for Stem Cell Research, San Francisco Marriott, June 22-27, 2005

Yukiko Gotoh: Fate regulation of neural precursor cells in the embryonic mouse neocortex ,Neuroscience 2005 SfN35th Annual Meeting, Washington Convention Center, November 14-18, 2005

Yukiko Gotoh: Fate regulation of neural precursor cells in the embryonic mouse neocortex ,Croucher Advanced Study Institute “ Signaling on Cell Growth & Differentiation” , The Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong, January 16-20, 2006

Yukiko Gotoh : 4th International Society for Stem Cell Research. Toronto, Ontario. June 29–July 3, 2006.

Yukiko Gotoh : Cold Spring Harbor Laboratory, Meetings & Courses Program. Cold Spring Harbor, NY. August 11–16, 2006.

Yukiko Gotoh : 2006 Society for Neuroscience symposium, “Fate regulation of mouse neocortical neural stem cells” , Atlanta

Yukiko Gotoh : 3rd Japanese-German Frontiers of Science Symposium, November 2-5 2006, Heidelberg, Germany

Yukiko Gotoh : The 19th Naito Conference 、Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells[II]、湘南国際村センター、神奈川県葉山町、November 14-17, 2006

②ポスター発表

特になし

(3)特許出願

なし

(4)新聞報道等

①新聞報道

特になし

②受賞

第1回分子生物学会三菱化学奨励賞

第9回日本女性科学者の会奨励賞

平成16年度日本癌学会奨励賞

③その他

招待講演

2004 Gordon Research Conference (Session Chair and Speaker), Ventura, USA. “Regulation of 14-3-3 function by phosphorylation”

2004 American Association for Cancer Research, Hawaii, USA. “Regulation of cell death by phosphorylation”

2004 National Cancer Institute Symposium Joint with JSPS, Washington D.C. “Cell death regulation by kinases”

2005 Symposium: Signaling on Cell Growth and Differentiation, Hong Kong. “Fate

- regulation of mouse neocortical neural precursor cells”
2006 IUBMB Symposium (Session Chair and Speaker), Kyoto “Regulation and Function of Akt”
2006 Cold Spring Harbor Laboratory Lecture “Biology of Stem Cells”
2006 Society for Neuroscience symposium, Atlanta,
USA “Fate regulation of mouse neocortical neural stem cells”

(5) その他特記事項

特になし

7. 結び

本研究は、当研究グループのさきがけ研究（タイムシグナルと制御）の中で得られた“Wntシグナルに対する神経系前駆細胞の応答が発生時期に依存して変化する“という結果を受けて、その時期依存性を説明する分子的な基盤を明らかにする事により神経発生において時間経過とともに起こる運命転換のメカニズムを理解する事を目指して開始された。結果の項で示した通り、本研究においてWntシグナルがニューロン分化を起こす時期と起こさなくなる時期での違いを説明する細胞内の変化（Intrinsic programme）を明らかにする事が出来た。これこそが、脳発生におけるニューロン分化期の終結を説明する重要なメカニズムであると現在考えている。今回、ニューロン分化期が終結し、アストロサイト分化期が開始する際のメカニズムとしてPolycomb複合体による特定のゲノム領域におけるepigeneticな変化が重要である事を示した。最近さらに、ニューロン分化期内でおこる神経系前駆細胞の運命変化（ニューロンサブタイプの変化）に関してもPolycomb複合体が関係するという予備的な結果を得ている。そこで、時期依存的な神経系前駆細胞の運命転換において類似の機構が共通に関与する可能性を追求する予定である。今回は特に検討しなかったが重要な課題のひとつとして、いかにしてニューロン分化期が開始するか、という点がある。これに関しても、Polycomb複合体の関与あるいはWntシグナルに対する応答性といった視点から今後当グループ独自の展開が可能であると考えている。

本研究はひとつの研究室内で行われたため、非常にスムーズに有機的なメンバー間の相互作用を元に遂行された。特にこの研究を通して修士あるいは博士課程の学生の著しい成長がみられたことについても、SORSTのご支援に感謝している。