

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「生命動態の理解と制御のための  
基盤技術の創出」  
研究課題「細胞増殖と分化における遺伝子発現振  
動の動態解明と制御」

## 研究終了報告書

研究期間 平成24年10月～平成30年3月

研究代表者：影山 龍一郎  
(京都大学ウイルス・再生医科学研究所、教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

単一細胞レベルのライブイメージング解析によって細胞増殖や分化過程で各種遺伝子発現が定常状態だけでなく、2~3時間周期で振動することが分かっていたが、遺伝子発現振動の意義や制御機構については、多くの点が不明であった。本研究では、遺伝子発現振動が細胞間で同位相に制御されている未分節中胚葉細胞、および異なる位相に制御されている神経幹細胞に注目し、発現振動の意義と動作原理の解明、さらにその制御を目指した。影山 G は生物学的実験を担当し、郡 G は数理モデル構築を担当した。

未分節中胚葉では、分節時計遺伝子 Hes7 の発現が細胞間で同期して約2時間周期で振動する。分節周期における Hes7 の発現振動リズムの意義は不明であったので、加速化することを試みた。Hes7 遺伝子から2個のイントロンを削減するとネガティブフィードバックにかかる時間が短縮し、Hes7 の発現振動が加速化した。その結果、分節リズムも加速化し、体節数や椎骨数が増加した。従って、Hes7 の発現振動リズムが体節周期を決めること、この周期には Hes7 のイントロン配列を除去するスプライシングにかかる時間が重要であることが分かった。

一方、多分化能を持つ神経幹細胞ではニューロン分化決定因子 Ascl1/Mash1、アストロサイト分化決定因子 Hes1、オリゴデンドロサイト分化決定因子 Olig2 といった複数の因子の発現が振動すること、しかし分化決定時には選ばれた一つが持続発現することが分かった。さらに、光遺伝学的手法を使って Ascl1/Mash1 の発現振動を誘導すると神経幹細胞の増殖能が活性化されたが、持続発現では神経幹細胞は増殖を止めてニューロンに分化した。従って、同じ因子が発現動態に依存して全く逆の活性を示すことが明らかになった。また、多分可能とは複数の分化決定因子がお互いに拮抗しながら、発現が振動する状態であることが示された。

さらに、Hes1 や Hes7 の発現制御を受ける Notch リガンドである Delta-like1 (Dll1) の発現も分節過程や神経幹細胞で振動すること、Dll1 の発現を加速又は遅延させると振動が減弱して Hes1 や Hes7 の発現振動も減弱することを見出した。その結果、体節癒合や神経幹細胞の増殖阻害が起こった。従って、遺伝子発現振動が体節形成や脳形成に重要であること、発現振動を維持するには Dll1 の正しいタイミングでの発現が必須であることが明らかになった。この影山 G の Dll1 に関する結果は直感的には解釈できないものであったが、郡 G は細胞内および細胞間のネガティブフィードバックを元に数理モデルを構築し、シミュレーションに成功した。以上から、発生過程において正しいタイミングのネガティブフィードバックとそれに依存した発現振動の重要性が明らかになるとともに、数理モデル構築の重要性と発展性が示された。

上述のように Dll1 の発現振動の重要性が示されたが、Dll1 の発現振動を介して動的情報が隣接細胞間で伝達され、さらに周期や位相などの時間情報を解読できるのかどうかは不明であった。そこで、Notch シグナルを介した遺伝子発現リズムの細胞間位相同期現象を解析した。光遺伝学的手法によって Notch シグナル分子の振動動態に摂動を加え、さらに生物発光レポーターを用いて1細胞レベルの動的応答をライブイメージングによって計測した。その結果、影山 G によって受信機能に関しては Hes1 の遺伝子発現リズムが様々な周期の外部刺激に応答・同期できることが示され、郡 G によってその動的応答は位相情報だけを考慮した確率的位相モデルの数値シミュレーションによって再現可能であることが明らかになった。さらに、影山 G は、送信細胞の Dll1 の発現振動に対して、受信細胞が周期的応答を示すことを見出した。この結果は、リガンド分子である Dll1 の発現ダイナミクスが周期や位相といった動的情報を細胞間で伝達するのに必要十分であることを示している。以上から、光遺伝学による制御技術と生細胞イメージング技術を組み合わせることによって、遺伝子発現の動的情報が細胞間で送受信されて解読されるための情報処理機構を解明できることが示された。本研究は、様々な生体分子の細胞間動的制御機構を解明するための基盤技術として有用である。

## (2) 顕著な成果

### < 優れた基礎研究としての成果 >

#### 1.

##### 概要: (200 字程度)

神経幹細胞では複数の分化決定因子の発現が振動するが、分化時には選ばれた一つが持続発現する。光遺伝学的手法を使って神経分化決定因子 *Ascl1* の発現振動を誘導すると神経幹細胞の増殖能が活性化されたが、持続発現では神経幹細胞はニューロンに分化した。従って、発現動態の違いで同じ因子が全く逆の活性を示すことが分かった。本結果は *Science* 誌に Research Article として発表し、本内容に関して IBRO 世界大会のプレナリー講演や *Neuron* 等の著名雑誌から総説執筆の依頼を受けた。

#### 2.

##### 概要: (200 字程度)

*Hes7* 遺伝子から2個のイントロンを削減するとネガティブフィードバックにかかる時間が短縮し、*Hes7* の発現振動が加速化した。その結果、分節リズムも加速化し、体節数や椎骨数が増加した。従って、*Hes7* の発現振動リズムが体節周期を決めること、この周期には *Hes7* のイントロン配列を除去するスプライシングにかかる時間が重要であることが分かった。本成果は *Cell Reports* 誌に発表し、またこの成果は世界中で使われている教科書 *Molecular Biology of the Cell* にも詳しく紹介された。

#### 3.

##### 概要: (200 字程度)

Notch リガンド *Dll1* の発現は、分節過程や神経幹細胞で振動する。*Dll1* の発現のタイミングを加速化あるいは遅延化すると振動が減弱し、さらに *Hes1* や *Hes7* の発現振動も減弱して体節癒合や神経幹細胞の増殖阻害が起こった。細胞内および細胞間のネガティブフィードバックを元にした数理モデルで上記の結果をシミュレーションすることに成功し、正しいタイミングのネガティブフィードバックとそれによって起こる発現振動の重要性が示された。本成果は、*Genes & Development* 誌に発表した。

### < 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

#### 1.

##### 概要: (200 字程度)

光遺伝学的手法を応用した遺伝子発現制御方法を新たに開発した。3時間周期の青色光照射で *Ascl1* の発現振動を誘導して神経幹細胞の増殖を活性化し、30分周期照射で *Ascl1* の持続発現を誘導してニューロン分化を活性化することに成功した。本技術は、成体脳に存在する静止状態の神経幹細胞を活性化してニューロン分化を誘導することを可能にするもので、脳組織再生への応用が期待される。国内外に類似研究は無い。

#### 2.

##### 概要: (200 字程度)

新たに開発した光遺伝学的手法を使って *Hes1* や *Dll1* の発現振動を誘導することで、内在性の因子の発現振動を同期化することに成功した。その結果、細胞の増殖能を活性化したり、細胞周期をそろえたりすることが可能になった。本技術を使うことで、より均一に細胞分化を誘導できることが可能になり、再生医療への応用が期待される。

### 3.

概要: (200 字程度)

光遺伝学による制御技術と発光レポーターを用いた生細胞イメージング技術を組み合わせることによって、遺伝子発現の動的情報が細胞間で送受信して解読されるための情報処理機構を解明できることがわかった。本手法は、様々な生体分子による遺伝子活性の動的制御機構を解明するための基盤技術として有用である。

## §2 研究実施体制

### (1) 研究チームの体制について

#### ①「影山龍一郎」グループ

##### 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
影山 龍一郎	京都大学 ウイルス・再生医科学研究所	教授	H24.10～
大塚 俊之	同上	准教授	H24.10～
小林 妙子	同上	助教	H24.10～
今吉 格	京都大学白眉センター	特定准教授	H25.4～
下條 博美	京都大学 ウイルス・再生医科学研究所	非常勤研究者	H25.4～
磯村 彰宏	JST	非常勤研究者	H25.4～
播磨 有希子	京都大学 ウイルス・再生医科学研究所	CREST研究員	H25.4～H29.3
小林 久美子	同上	研究補助員	H25.4～
前田 勇樹	同上	研究補助員	H25.4～
大釜 里央	同上	研究補助員	H25.4～H29.7
澤田 英里	同上	研究補佐員	H26.4～
貝瀬 峻	同上	D1～3	H27.4～
越智 翔平	同上	D1～3	H27.4～
高木 あかり	同上	D1～3	H27.4～
松宮 舞奈	同上	D1～2	H28.4～
松崎 公信	同上	D1～2	H28.4～
篠原 千佳	同上	派遣職員	H29.7～
楯谷 智子	京都大学白眉センター	特定助教	H25.4～H29.3
渡邊 直希	京都大学 ウイルス・再生医科学研究所	CREST専任 RA	H25.4～H27.6
Shama Bansod	同上	研究補助員	H24.10～H29.3
山内 沙樹	同上	研究補佐員	H25.4～H26.3

##### 研究項目

- ・ 遺伝子発現振動の計測、操作と数理モデルの検証

#### ②「郡宏」グループ

##### 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
郡 宏	お茶の水女子大学基幹研究院	准教授	H24.10～
小林 康明	お茶の水女子大学 シミュレーション科学教育研究センター	特任助教	H28.4～
設楽 恭平	同上	特任リサーチフェロー	H28.4～
小串 典子	同上	同上	H25.4～H27.12
永田 裕作	同上	同上	H26.3～H28.3
川口 喬吾	東京大学理学系研究科	D2～3	H25.1～H27.3

## 研究項目

- ・ 遺伝子発現振動の数理モデル化と解析

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について  
(研究チーム外での連携や協働についてご記入ください。ライフ分野では臨床医等を含みます。)

国内外の研究者とは、以下の共同研究を行ってきた。

### 影山グループ

- ・ François Guillemot (英国) : 成体脳における *Ascl1* 因子のリアルタイムイメージング
- ・ James Briscoe (英国) : 神経発生における *Ascl1* や *Hes1* の機能解析
- ・ Lee Dunham (英国) : 培養細胞における *Hes1* のリアルタイムイメージング
- ・ Steven A. Goldman (米国) : 成体脳神経幹細胞の操作
- ・ Adolfo A. Ferrando (米国) : 白血病における *Hes1* の機能解析
- ・ Gord Fishell (米国) : 嗅球新生ニューロンの機能解析
- ・ Matthew J. Hilton (米国) : 骨形成における *Hes1* の機能解析
- ・ Hiroko Wakimoto (米国) : 心形成における *Hes1* の機能解析
- ・ Cheng-yu Lee (米国) : *Hes1* の新たな機能制御因子の解析
- ・ Carmen Birchmeier 博士 (ドイツ) : 筋肉前駆細胞における *Hes1*, *MyoD*, *Dll1* のリアルタイムイメージング
- ・ Palle Serup (デンマーク) : 臍形成における *Hes1* や *Dll1* の機能解析
- ・ Anna Bigas (スペイン) : 血液幹細胞における *Hes1* の機能解析
- ・ Marco Santorelli (イタリア) : 培養細胞における *Hes1* のリアルタイムイメージング
- ・ Diogo Castro (ポルトガル) : 神経幹細胞における *Ascl1* の光遺伝学的発現制御
- ・ Sally Dunwoodie (オーストラリア) : 分節時計遺伝子 *Hes7* の機能解析
- ・ Henning Ulrich (ブラジル) : 神経発生における *Ascl1* や *Hes1* の機能解析
- ・ 佐野雅己 (東大) : 神経幹細胞の動きに依存したトポロジカル欠陥の形成
- ・ 森憲作 (東大) : 嗅球新生ニューロンの機能解析
- ・ 齋藤琢 (東大) : 骨形成における *Hes1* の機能解析
- ・ 渡辺すみ子 (東大) : 網膜分化における *Notch* シグナルの機能解析
- ・ 宮本享 (京大) : 下垂体形成における *Hes1* の機能解析
- ・ 高橋良輔 (京大) : 神経変性疾患における *Notch* シグナルの機能解析
- ・ 伊藤壽一 (京大) : 内耳発生における *Notch* シグナルの機能解析
- ・ 千葉勉 (京大) : 消化管腫瘍形成における *Notch* シグナルの機能解析
- ・ 川口義弥 (京大) : 胆管形成における *Notch* シグナルの機能解析
- ・ 貝淵弘三 (名大) : *Hes1* タンパク質の安定性制御
- ・ 畠山淳 (熊本大) : 神経発生における *Notch* シグナルの機能解析
- ・ 玉巻伸章 (熊本大) : 神経幹細胞の遺伝学的操作
- ・ 千葉滋 (筑波大) : 白血病における *Hes1* の機能解析
- ・ 穂積勝人 (東海大) : 臍形成における *Notch* シグナルの機能解析
- ・ 上杉志成 (京大) : *Hes1* の機能を阻害する化合物の解析

### 郡グループ

- ・ CREST「生命動態」内の実験チームとの連携 (岡村チーム、三浦チーム、栗原チーム) : パターン形成や振動現象に関する興味深い実験研究がなされており、理論的取り扱いについて議論・情報交換をしている。

### § 3 研究実施内容及び成果

#### 3. 1 細胞増殖と分化における遺伝子発現振動の動態解明と制御(京都大学 影山グループ)

##### (1)研究実施内容及び成果

##### 3. 1. 1. 分節時計の加速化:分節時計遺伝子 Hes7 の発現振動の意義と制御

分節時計遺伝子 Hes7 の発現振動の意義を明らかにするために、リズムを加速化するとどのような現象が生じるのかを解析した。分節過程では、Hes7 はネガティブ・フィードバックを介して約2時間周期で発現振動することから、以下のような数理モデルを提唱した。

$$\begin{aligned} dp(t)/dt &= am(t - T_p) - bp(t) \\ dm(t)/dt &= k/[1 + \{p(t - T_m)\}^2/p_0^2] - cm(t) \end{aligned}$$

$p(t)$  : 時間  $t$  における Hes7 タンパク質量、 $m(t)$  : 時間  $t$  における Hes7 mRNA 量

ここに実測値や予測値を導入することで、Hes7 mRNA および Hes7 タンパク質量が安定に約2時間周期で振動することがシミュレーションできた(図1 a)。この数理モデルから、Hes7 が発現振動を維持するには、Hes7 の発現からネガティブ・フィードバックに至るまで十分な時間の遅れが必要であると予測された。以前の解析から、この十分な時間の遅れを生み出すには転写後のイントロン配列を除去するスプライシングのステップが必要で、3個すべてのイントロンを除去すると約19~20分短いタイミングで Hes7 が発現ようになって振動しなくなることを明らかにした(図1 cに相当)。さらに、数理モデルの予測から、5分短いタイミングで Hes7 蛋白が発現すると振動が加速化し、やがて定常発現になると予測された(図1 b)。この予測を検証するために Hes7 遺伝子から2個のイントロンを取り除いたところ、約5分短いタイミングで Hes7 蛋白が発現することがわかった。さらに、Hes7 の発現振動および分節時計のリズムが加速化し、前側の体節が平均2個増加し、本来7個の頸椎骨が9個に増加した(図2)。しかし、下部胸椎以降の椎骨が癒合しており、後期体節形成過程では Hes7 の発現が定常化していると考えられた。以上から、数理モデルの予測の正しさが検証できた。

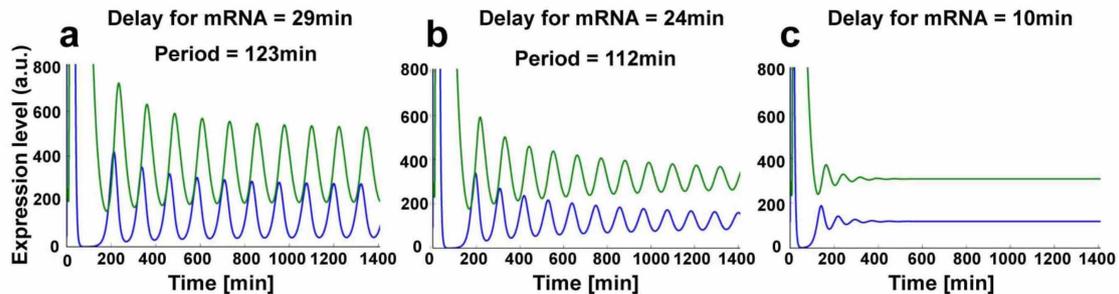


図1 : 数理モデルからの予測 : Hes7 の発現が安定に振動する条件に比して(a)、19分短いタイミングで Hes7 蛋白が発現すると発現は振動しなくなると予測された(c)。一方、5分短いタイミングで Hes7 蛋白が発現すると、振動が加速化し、やがて定常発現になると予測された(b)。

これらの結果から、Hes7 が分節時計の周期を決定する中心的な遺伝子であること、さらにイントロンが正しいタイミングの遺伝子発現に必須な役割を担うことが明らかになった。今後、他の振動遺伝子についてもイントロンを削減して発現のタイミングを変化させて、振動現象と細胞増殖・分化との関係を探る予定である。哺乳動物の頸椎骨数はマウス、ヒト、キ

リン、クジラも7個に保存されていることはよく知られているが、この特徴が Hes7 遺伝子のイントロン数に依存することが明らかになり、イントロンの新たな役割が示された (Cell Reports 2013)。

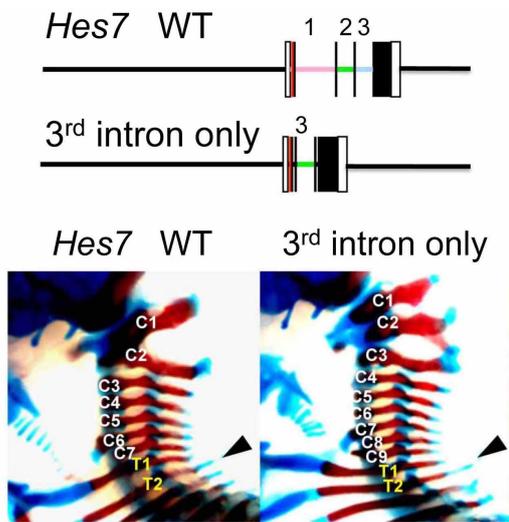


図2：Hes7 遺伝子のイントロン削減による分節時計の加速化。

(上図)正常な Hes7 遺伝子とイントロンを2個除去した Hes7 遺伝子の構造。

(下図)正常マウス(左)および Hes7 遺伝子から2個のイントロンを除去したマウス(右)の椎骨と肋骨。イントロンを2個除去することによって、本来7個の頸椎骨が9個になった。

### 3.1.2. 神経幹細胞における bHLH 因子群の発現振動の意義と制御

神経幹細胞は、自己複製を行うことができ、かつ脳を構成する主要な3種類の細胞であるニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを生み出す多分化能を持つ。神経幹細胞の自己複製と細胞分化制御機構の解明は、脳神経系の発生機構の解明に繋がるだけでなく、脳損傷や神経変性疾患に対する再生医療の実現に向けた基盤的知識になる。しかし、自己複製能(分化することなく、自分のコピーを作ることができる)と、多分化能(様々な細胞に分化できる)という全く異なる能力をどのようなメカニズムで神経幹細胞は保持しているのかは不明であった。また、神経幹細胞が細胞分化を行う際に、ニューロン、アストロサイト、及びオリゴデンドロサイトという3種類の選択肢の中から、どのように一つの選択肢を選んで分化していく(細胞分化運命決定)のかについてもよくわかっていなかった。

神経幹細胞の自己複製と細胞分化は bHLH 型転写因子によって制御されている。神経幹細胞の増殖能や多分可能の維持には、アストロサイト分化を制御する Hes1、ニューロン分化を制御する Ascl1、オリゴデンドロサイト分化を制御する Olig2 という3種類の bHLH 型転写因子が重要な役割を担うことが知られている。しかし、Hes1 がどのようなメカニズムで幹細胞の未分化性維持とアストロサイト分化という相反する2つの機能を発揮するのかよくわかっていない。また、Ascl1 や Olig2 は、ニューロン分化とオリゴデンドロサイト分化以外に、神経幹細胞の増殖・維持にも重要であることが知られているが、この相反する機能をどのように制御しているのかも不明である。本研究では、発光タンパク質であるルシフェラーゼと bHLH 型転写因子の融合タンパク質が発現するような遺伝子改変マウスを作製し、bHLH 型転写因子の発現動態を解析した。Hes1、Ascl1、Olig2 の3種類の bHLH 型転写因子について、ルシフェラーゼとの融合タンパク質の発現動態を観察・解析した。

顕微鏡システムや画像解析法の至適化により、単一細胞レベルで、細胞分化運命決定因子である bHLH 型転写因子タンパク質のリアルタイムイメージングに成功した。その結果、神経幹細胞において Hes1、Ascl1 タンパク質は 2~3 時間周期で、Olig2 タンパク質は 5~8 時間周期で発現が増減(発現振動)していることが明らかになった(図3)。さらに、Hes1、Ascl1、Olig2 のいずれかを欠損した神経幹細胞では細胞増殖が減少していたことから、bHLH 型転写因子が発現振動を繰り返すことによって神経幹細胞の細胞分裂を促進することが示唆された。

次に、神経幹細胞に細胞分化を誘導して、Hes1、Ascl1、Olig2 タンパク質の発現動態をリアルタイムイメージングにて解析した。その結果、ニューロン分化の際には Ascl1 が、アストロサイト分化の際には Hes1 が、オリゴデンドロサイト分化の際には Olig2 がそれぞれ蓄積することが明らかになっ

た(図3)。神経幹細胞からどれかの細胞種に分化運命決定が行われる際には、発現振動を繰り返していた Hes1、Ascl1、Olig2 タンパク質のどれか1種類の発現レベルが上昇し、他の2種類のタンパク質の発現が消失した。

ルシフェラーゼと bHLH 型転写因子の融合タンパク質の発現動態の観察結果から、Hes1、Ascl1、Olig2 などの細胞分化決定因子は、神経幹細胞にもすでに発現しており、発現振動を繰り返すことで神経幹細胞の増殖を促進すると考えられた。一方、細胞分化誘導時にはどれか1種類の bHLH 因子の発現が上昇し、細胞分化を促進することが明らかになった。神経幹細胞は、複数の細胞分化決定因子を発現振動させることで、多分化能を備えつつも未分化性を保持して自身のコピーを作る(自己複製する)と考えられた。

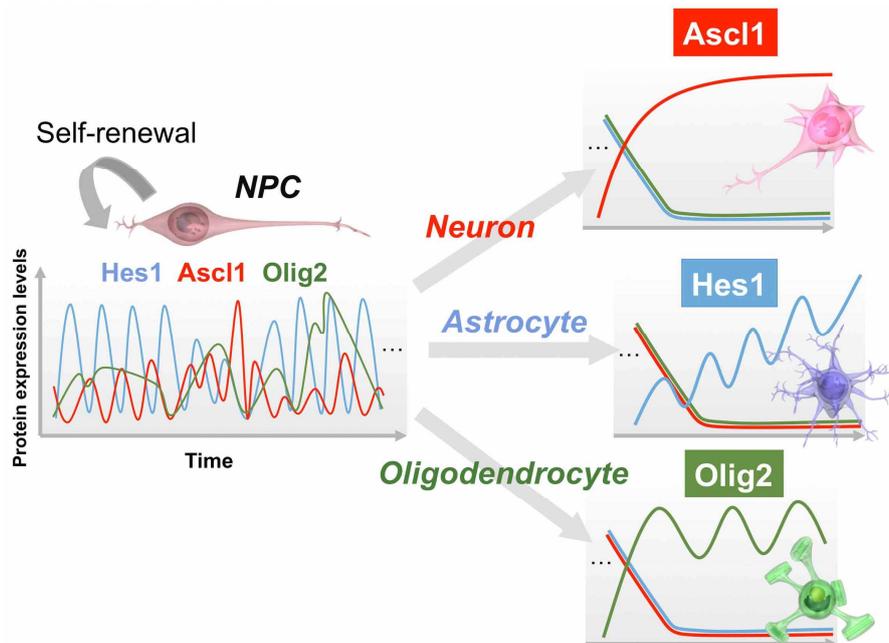


図3: 神経幹細胞の自己複製および分化決定時における Hes1、Ascl1、Olig2 の発現動態

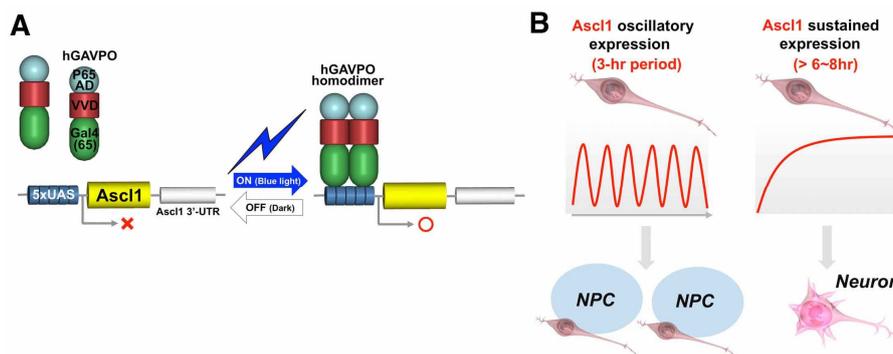


図4: 光遺伝学的手法をつかった神経幹細胞操作

上記の結果から、同一因子が発現動態を変えることによって神経幹細胞の増殖を活性化したり、特定の種類の細胞に分化誘導することが示唆された。たとえば、Ascl1 は発現振動すると神経幹細胞の増殖を活性化し、蓄積するとニューロン分化を誘導すると考えられた。そこで、光応答性の転写因子である GAVPO のコドンを変化した hGAVPO を用いて、光照射依存的に Ascl1 の発現動態を人工的にコントロールできる実験系を開発した(図4A)。3 時間ごとに青色光を照射することで Ascl1 の発現振動を、30 分ごとに青色光を照射することで Ascl1 の持続発現を神経幹細胞に誘導できた(Science 2013)。

神経幹細胞に青色光照射を行い、Ascl1 の 3 時間周期の発現振動を誘導したところ、細胞増殖 (自己複製) が促進された (図4B 左)。一方、Ascl1 の持続発現を誘導したところ、ニューロン分化が誘導された (図4B 右)。すなわち、従来用いられてきた外来性のタンパク質や化合物を投与することなく、青色光の照射パターンを変えるだけで、神経幹細胞の増殖やニューロン分化を自在にコントロールできる技術を開発できた。この技術は、今後再生医療研究に貢献することが期待される。本研究は、自己複製能と多分化能の両立という神経幹細胞の根幹のメカニズムを明らかにした。Hes1 タンパク質は、神経幹細胞だけではなく、万能細胞 (ES 細胞・iPS 細胞) や造血幹細胞・皮膚幹細胞などほとんどの幹細胞で発現が確認されていることから、本研究で見いだされた細胞分化決定因子の発現振動による制御機構は、他の種類の幹細胞においても普遍的に使用されているメカニズムであると考えられ、幹細胞研究全体への幅広い波及効果が予想される。

上記の結果から、神経幹細胞における多分化能とは、3種類の分化運命決定因子があたかも3人用シーソーで拮抗し合っている状態であることを提唱した (図5A)。3種類の分化運命決定因子が等量ずつ持続発現して拮抗し合っても多分化能が維持される可能性があるが (図5B)、その場合はノイズに対して不安定である。したがって、発現振動がノイズに対してより抵抗性の高いいわゆる「准安定状態」であることを提唱した (Neuron 2014)。

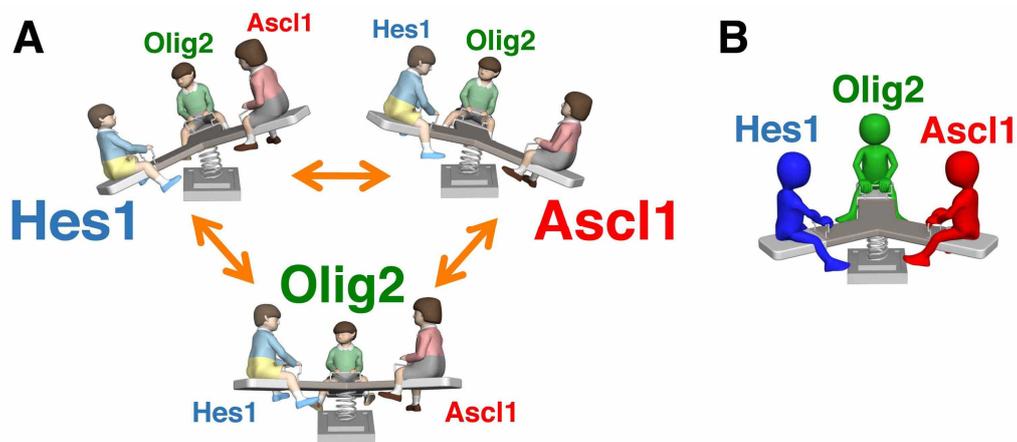


図5: 神経幹細胞の多分化能における2つのシーソーモデル。A. 3種類の分化運命決定因子が、あたかも3人用シーソーで拮抗し合っている状態。B. 3種類の分化運命決定因子が等量ずつ持続発現して拮抗し合っている状態。実際の神経幹細胞では、モデルAの状態が多分化能が維持される。

### 3.1.3. Notch シグナルのエフェクター因子 Hes5 の発現振動の意義と制御

神経幹細胞は、初め深層ニューロンを、続いて浅層ニューロンを形成し、最後にグリア細胞であるアストロサイトを形成する。このように神経幹細胞は経時的に分化能を変えていくが、分化能のスイッチングには Hmga1 や Hmga2 が関わるということが知られている。この因子の発現は発生の進行とともに徐々に低下すること、このゆっくりとした発現低下が分化能のスイッチングのタイミングを制御することが明らかにされているが、徐々に発現低下する分子機構はよく分かっていない。神経幹細胞の維持に重要な役割を担う転写抑制因子 Hes1 や Hes5 はネガティブフィードバックを介して自律的に2~3時間周期の発現リズムを刻むことから、発生時計として機能することが示唆された。そこで、これらの因子と Hmga1 や Hmga2 との関与について調べることにした。まず、Hes5 を持続発現するマウスを作製した。Nestin プロモーター・エンハンサーによって神経幹細胞特異的に TetON を発現させ、TRE の下流に Hes5 をつないだ (図6A)。このマウスの 9.5 日胚からドキシサイクリンを投与したところ、神経幹細胞で Hes5 を強制発現できた (図6B)。

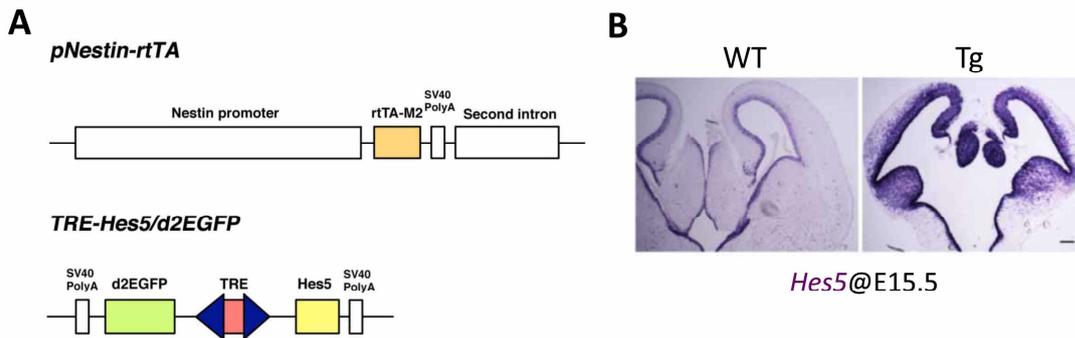


図6: 神経幹細胞に Hes5 を強制発現。(A) Nestin プロモーター・エンハンサーによって神経幹細胞特異的に TetON を発現させ、TRE の下流に Hes5 をつないだ。(B) 9.5 日胚からドキシサイクリンを投与したところ、神経幹細胞で Hes5 が強制発現できた。

この Hes5 強制発現マウスにおける深層ニューロン産生期から浅層ニューロン産生期への移行および浅層ニューロン産生期からグリア細胞産生期の移行のタイミングを調べたところ、いずれも加速化していた(図7)。逆に、Hes5 欠損マウスを調べたところ、それぞれの移行が遅延化していた(図8)。このことから、深層ニューロン、浅層ニューロン、グリア細胞産生期の正常なタイミングでの移行には Hes5 の正常な発現パターンが必須であることが明らかになり、おそらく発現振動が重要であることが示唆された。同様の機能は、Hes1 でも確認できた。

次に、Hmga1 および Hmga2 の発現を調べたところ、野生型マウスに比べて Hes5 強制発現マウスでは低下し、Hes5 欠損マウスでは増加していた(図9)。さらに、Hmga1 および Hmga2 のプロモーター解析を行ったところ、Hes5 によって発現が抑制されることが分かった。したがって、Hes1 や Hes5 の発現振動によって Hmga1 および Hmga2 のプロモーターが徐々に抑制されて発現が低下していくと考えられた。以上の結果から、Hes1 や Hes5 が刻む2~3時間周期の発現リズムが発生時計として機能すると結論付けられた(Development 2017)。

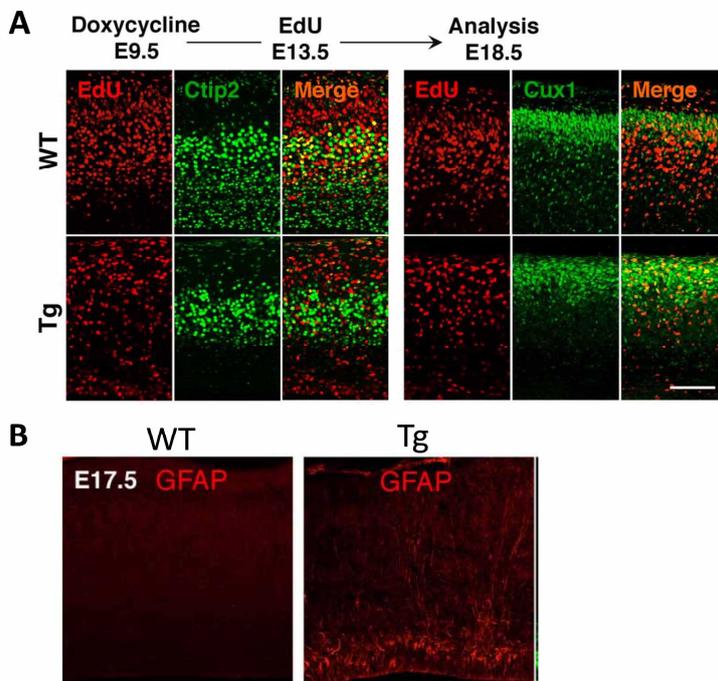


図7: Hes5 強制発現マウスにおける深層ニューロン産生期から浅層ニューロン産生期への移行および浅層ニューロン産生期からグリア細胞産生期の移行のタイミングの加速化。(A) 13.5 日胚への EdU 投与実験。野生型では多くの深層ニューロン(Ctip2+)が産生されるが、Hes5 強制発現マウス(Tg)では浅層ニューロン(Cux1+)が産生されていた。(B) 胎生 17.5 日では、野生型マウスにはアストロサイト(GFAP+)はほとんど形成されていないが、Hes5 強制発現マウス(Tg)では多く分化している。

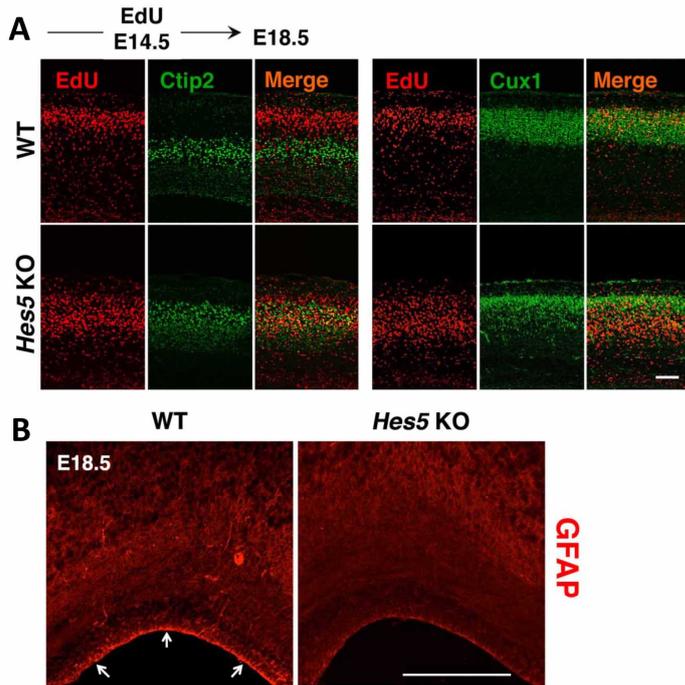


図8:Hes5 欠損マウスにおける深層ニューロン産生期から浅層ニューロン産生期への移行および浅層ニューロン産生期からグリア細胞産生期の移行のタイミングの遅延化。(A)14.5日胚への EdU 投与実験。野生型では多くの浅層ニューロン(Cux1+)が産生されるが、Hes5 欠損(KO)マウスでは深層ニューロン(Ctip2+)が産生されていた。(B)胎生 18.5 日では、野生型マウスにおいてアストロサイト(GFAP+)が分化を開始しているが(矢印)、Hes5 欠損(KO)マウスではまだ始まっていない。

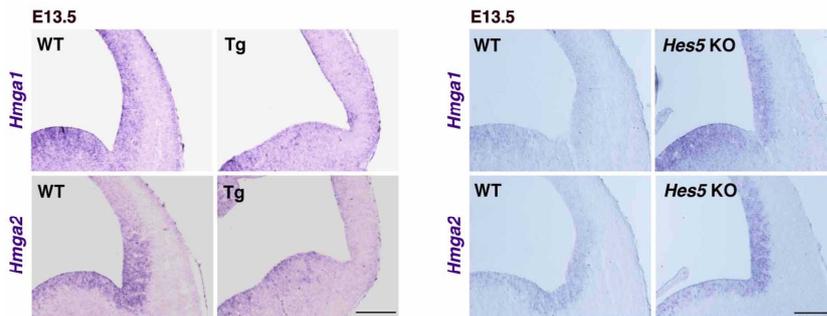


図9:Hmga1 およびHmga2の発現は、Hes5 強制発現マウス(Tg)では低下し、Hes5 欠損(KO)マウスでは増加している。

### 3. 1. 4. Notch リガンド Delta-like1 (Dll1)の発現振動の意義と制御

細胞増殖・分化における遺伝子発現振動の意義と動作原理を探るために、Hes1 と Ascl1 の下流遺伝子である Delta-like1 (Dll1)に注目して解析を行った。Dll1 mRNA および Dll1 タンパク質の発現をモニターできるレポーターマウスを開発した。特に、後者のマウスは Dll1 遺伝子座に3種類 (firefly, emerald green, red) のルシフェラーゼ (Fluc, Eluc, RLuc) cDNA をそれぞれノックインして Dll1 との融合タンパク質ができるようにした(図10)。

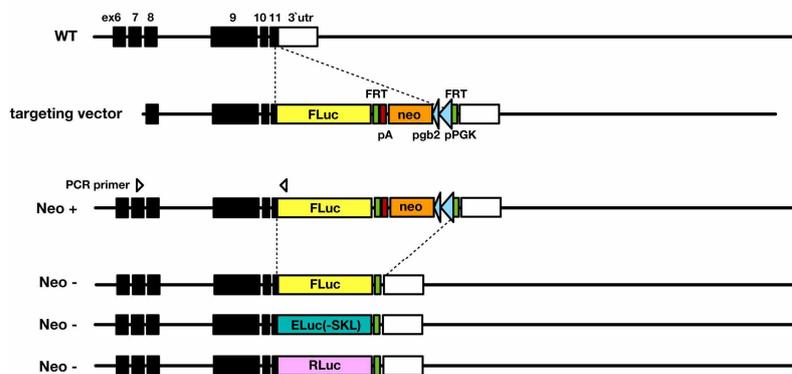


図10:3種類の Dll1 ノックインマウスの作製: 3種類 (firefly, emerald green, red) のルシフェラーゼ (Fluc, Eluc, RLuc) cDNA をそれぞれ Dll1 遺伝子座にノックインして Dll1 との融合タンパク質ができるようにした。

その結果、Fluc と Rluc の2種類のルシフェラーゼ・ノックインマウスはホモでも生育した。したがって、この2種類のノックイン・マウスのルシフェラーゼ活性は、正常な Dll1 タンパク質の発現動態を表すと考えられた。これらのマウスを使って Dll1 の発現を調べたところ、神経幹細胞や未分節中胚葉において Dll1 の mRNA およびタンパク質量は振動することが明らかになった(図11)。Dll1 の発現は、Hes1 によって抑制され、Ascl1 によって活性化されることから、Hes1 と Ascl1 依存性に発現振動すると考えられた。

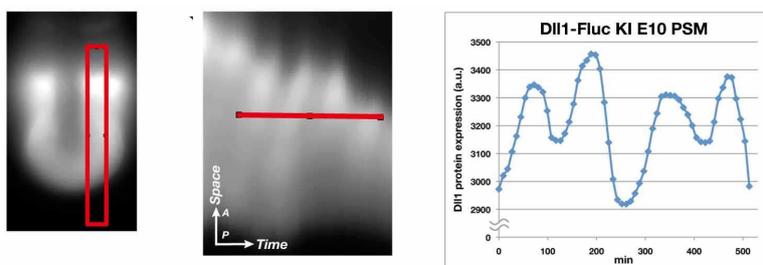


図11: Dll1-Fluc ノックインマウスの未分節中胚葉における Dll1 タンパク質の発現イメージング。約2時間周期で振動していた。

次に、Dll1 の発現振動の意義を明らかにするために、Dll1 を定常発現するマウスの作製を試みた。郡グループの作成した数理モデルから、Dll1 の発現のタイミングが加速あるいは遅延することで、Dll1 の発現振動が減弱、あるいは定常発現になることが予測された。そこで、イントロンを除去して Dll1 遺伝子を短くしたもの (Dll1 type 1 変異)、および挿入して Dll1 遺伝子を長くしたもの (Dll1 type 2 変異) の2種類の Dll1 遺伝子ノックインマウスを作製した(図12)。Dll1 の発現をイメージングできるように Fluc cDNA もノックインして Dll1 との融合タンパク質が発現するようにした(図12)。Dll1 の発現のタイミングを測定したところ、野生型に比べて Dll1 type 1 変異では加速し、Dll1 type 2 変異では遅延していた(図13)。

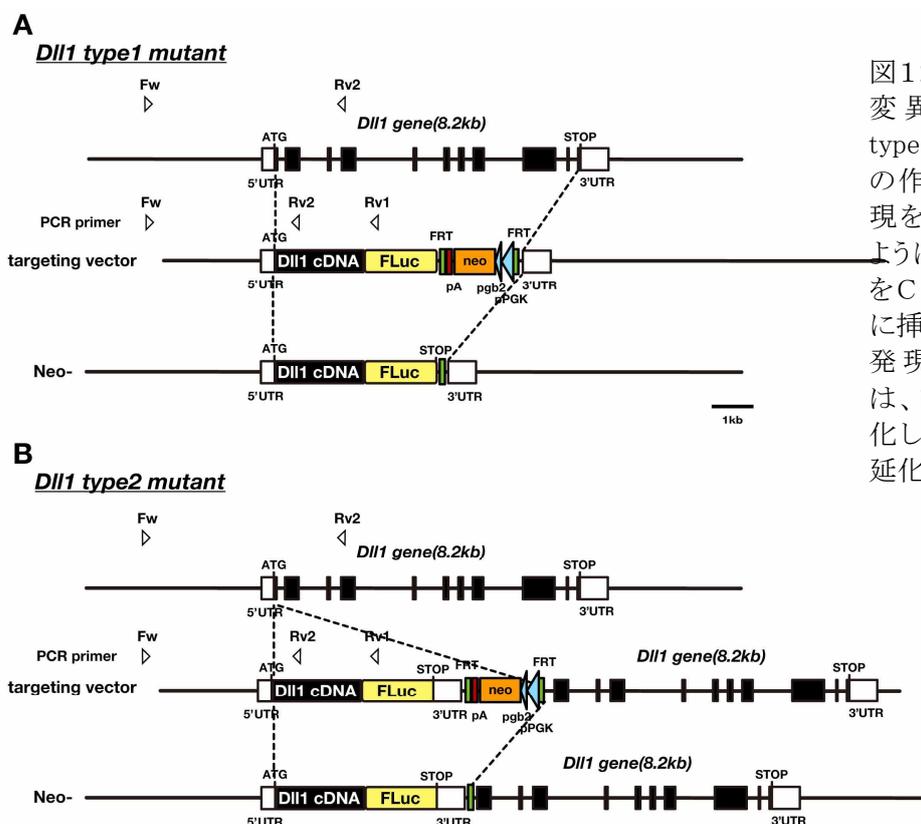


図12: Dll1 type 1 変異および Dll1 type 2 変異マウスの作製。Dll1 の発現を可視化できるように、Fluc cDNA をC末側に in frame に挿入した。Dll1 の発現のタイミングは、前者では加速化し、後者では遅延化した。

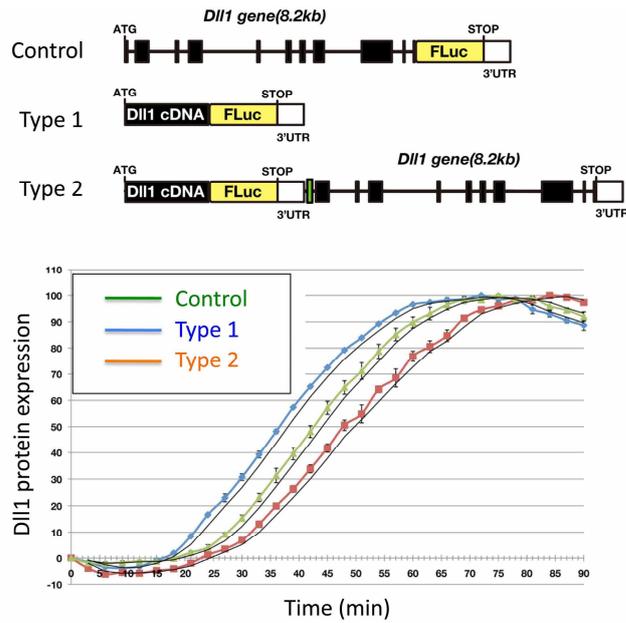


図13:Dll1 変異マウス。  
 (上)Dll1 遺伝子からイントロンを除去して短くした変異 (Type 1)、および余分な配列を挿入して長くした変異 (Type 2) の2種類のノックインマウスを作製。Dll1 の発現をイメージングできるように Fluc cDNA をノックインした。  
 (下)Dll1 の発現は、野生型に比べて Type 1 は加速し、Type 2 は遅延した。

野生型マウスの未分節中胚葉では Dll1, Hes7, Lfng の発現は振動していたが、Dll1 type 1 および type 2 変異マウスでは発現振動が減弱し、定常発現に近かった (図14A-C)。そのため、Dll1 type 1 および type 2 変異マウスでは体節は癒合しており、体節由来の組織である椎骨や肋骨も癒合していた (図14D)。また、野生型マウスの神経幹細胞では Dll1 や Hes1 の発現は振動していたが、Dll1 type 1 および type 2 変異マウスでは発現振動が減弱し、定常発現に近かった (図15A,B)。そのため、Dll1 type 1 および type 2 変異マウスでは神経幹細胞の増殖能が低下し、脳は低形成になった (図15C)。

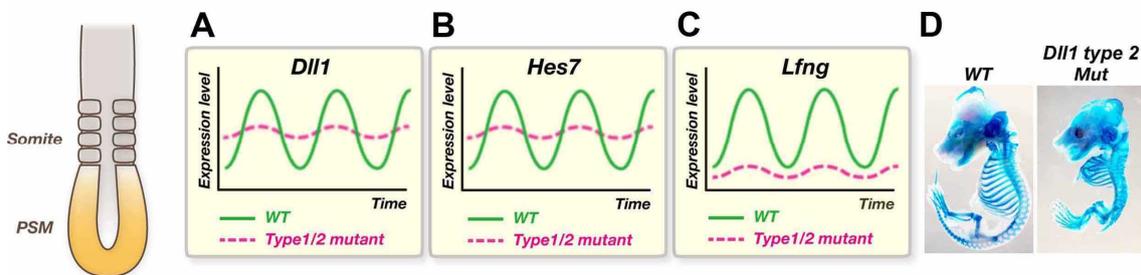


図14:未分節中胚葉での Dll1 の発現動態と分節。(A-C) 野生型マウス(WT)では Dll1, Hes7, Lfng の発現は振動しているが、Type 1 および Type 2 変異マウスでは発現振動が減弱した。(D) Dll1 type 2 変異マウスの体節は癒合しており、体節由来の組織である椎骨や肋骨も癒合していた。

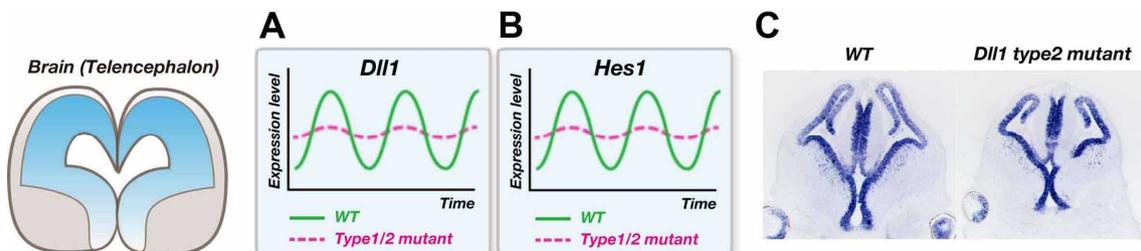


図15:神経幹細胞における Dll1 の発現動態と脳発生。(A,B) 野生型マウス(WT)では Dll1 や Hes1 の発現は振動しているが、Type 1 および Type 2 変異マウスでは発現振動が減弱し、定常発現に近かった。(C) Dll1 type 2 変異マウスの脳は、野生型マウス(WT)に比べて低形成であった。

これらの結果から、Dll1 の発現が振動するには正しいタイミングが必須であること、Dll1 の発現振動は体節形成や脳形成にとって重要であることが明らかになった。さらに、本結果から、数理モデルの予測の正しさが検証された (Genes & Development 2016)。

これまでの遺伝子発現のリアルタイム・イメージング解析の結果から、未分節中胚葉では隣接細胞間で同位相の発現振動が起こり、神経幹細胞は異なる位相の発現振動が起こることが分かっていた。さらに、今回の解析から、Dll1 の発現のタイミングを加速化したり遅延化したりすることで、未分節中胚葉や神経幹細胞で見られる発現振動がともに減弱することが明らかになった。この結果は直感的には理解できなかったが、群グループの数理モデルによって統一的に理解できるようになった。このモデルによると、Dll1-Notch を介した細胞間シグナル伝達速度が非常に重要で、この伝達速度を変えるだけで発現振動が同位相になったり、逆位相になったり、あるいは発現振動が減弱したり、停止したり (oscillation/amplitude death) することが予測できた (図16)。今後、実際の細胞間シグナル伝達速度を測定することで、この数理モデルを検証していくことが必要である。また、より細胞間シグナル伝達速度を変化させて隣接細胞間の位相関係が逆転するかどうか調べることも重要である。

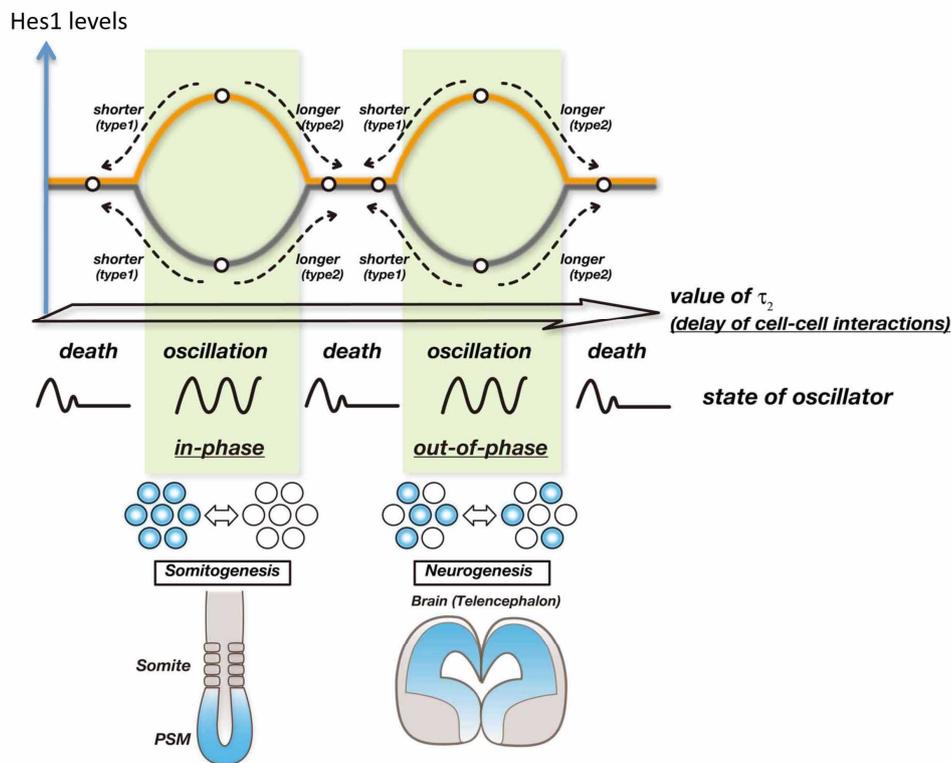


図16: 隣接細胞間の位相関係における細胞間シグナル伝達速度の重要性。この伝達速度を変えるだけで発現振動が同位相になったり、逆位相になったり、あるいは発現振動が減弱したり、停止 (oscillation death, amplitude death) したりする。

### 3. 1. 5. Notch シグナルを介した遺伝子発現リズムの細胞間位相同期現象の分子機構と制御

上記の実験では、Dll1 の発現振動が減弱すると Hes1 や Hes7 の発現振動も減弱することから、Dll1 の発現振動が周囲の細胞に振動情報を伝えている可能性が示唆された。しかし、Dll1 の発現振動が本当に周囲の細胞に振動情報を伝えることが可能かどうかは不明であった。そこで本研究では、遺伝子発現リズムの周期・位相といった動的情報の細胞間伝達を可能にする最小要素を同定するため、Notch シグナルを介した遺伝子発現リズムの細胞間位相同期現象を光

遺伝学技術によって再構成することを試みた。具体的には、Notch シグナルの制御に関わる生体分子の振動ダイナミクスを光遺伝学技術によって人工的に誘導・再構築した。それと同時に、遺伝子活性の生細胞観察を可能にする生物発光レポーターを用いることで、光摂動に対する細胞の動的応答を 1 細胞経時イメージングによって定量計測した。

まず、同一細胞内で光制御によって外来性 Hes1 の発現振動を誘導したところ、内在性 Hes1 の発現振動が位相を変えることによって同期化することが分かった(図17)。また、通常 2~3 時間周期で振動している Hes1 の遺伝子発現リズムが様々な周期(1.8~5.5 時間)の外部刺激に応答・同期できること、特に Hes1 リズムの自然周期(約 2.6 時間)に近い周期の外部刺激で最も効率的に同期できること(図17D)が明らかになった。この動的応答は、群グループによって、位相情報だけを考慮した確率的位相モデルを使った数値シミュレーションによって再現可能であることが明らかになった。この数理モデルは、自然周期に伴う位相の前進、外部刺激に伴う位相変調、及び確率的な位相の前進・後退といった非常に単純な位相ダイナミクスだけで構成されている。この結果は、多数の分子種からなる複雑かつ確率的な 1 細胞レベルの遺伝子制御についても、詳細を捨象した少数自由度の数理モデルによって定量的に記述可能であることを実証している。

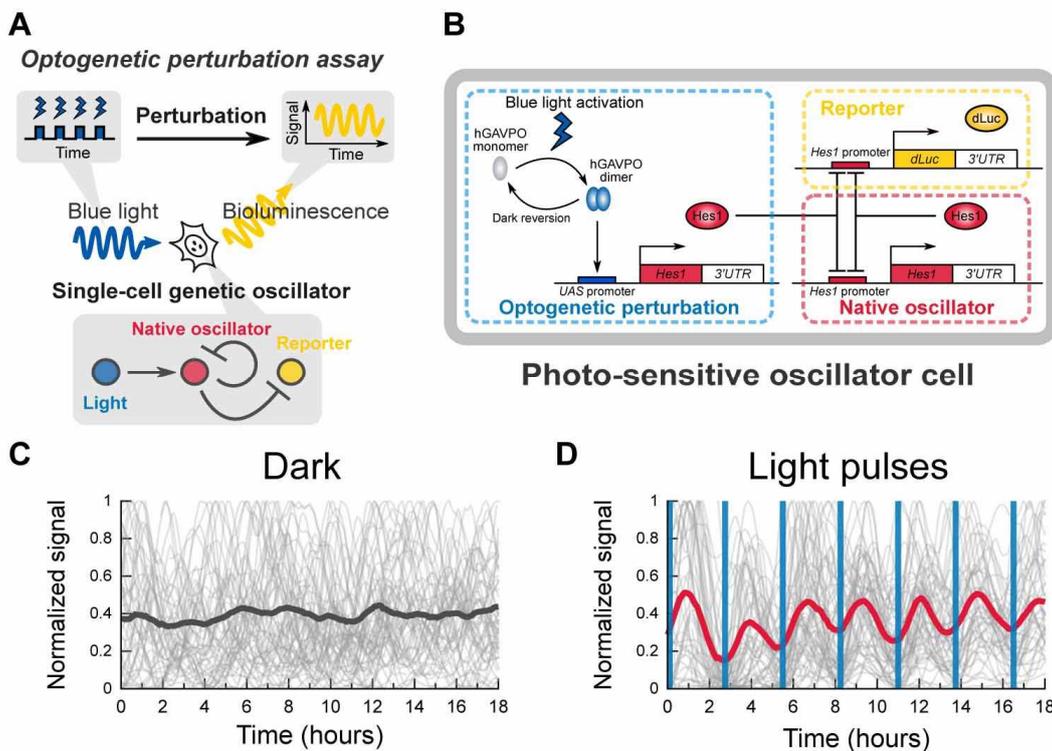


図17:Hes1 の光制御による内在性 Hes1 発現振動のエントレインメント。(A,B) Hes1 の光制御と内在性 Hes1 発現振動のモニターシステム。(C)暗条件下では内在性 Hes1 の発現振動は細胞間で同期していない。(D)光制御で Hes1 の発現振動を誘導すると、内在性 Hes1 の発現振動が同期化する。

次に、リガンド分子の Dll1 の発現を光制御可能な送信細胞と、隣接細胞の Dll1 からの刺激に伴う応答を発光によって光計測可能な受信細胞の 2 種類の細胞を混在させて培養した。ここに周期的光刺激を与えたところ、受信細胞の周期的な応答が観察できた(図18)。この動的情報伝達の再構成実験の結果は、リガンド分子の Dll1 の発現ダイナミクスが周期・位相の動的情報の細胞間伝達を実現するのに必要十分であることを示している。

以上のことから、光遺伝学による制御技術と生細胞イメージング技術を組み合わせることによって、遺伝子発現の動的情報が細胞間で送信・解読されるための情報処理機構を解明できることがわかった。本研究は、様々な生体分子による遺伝子活性の動的制御機構を解明するための基盤技術として有用であると考えられる(Genes & Development 2017)。

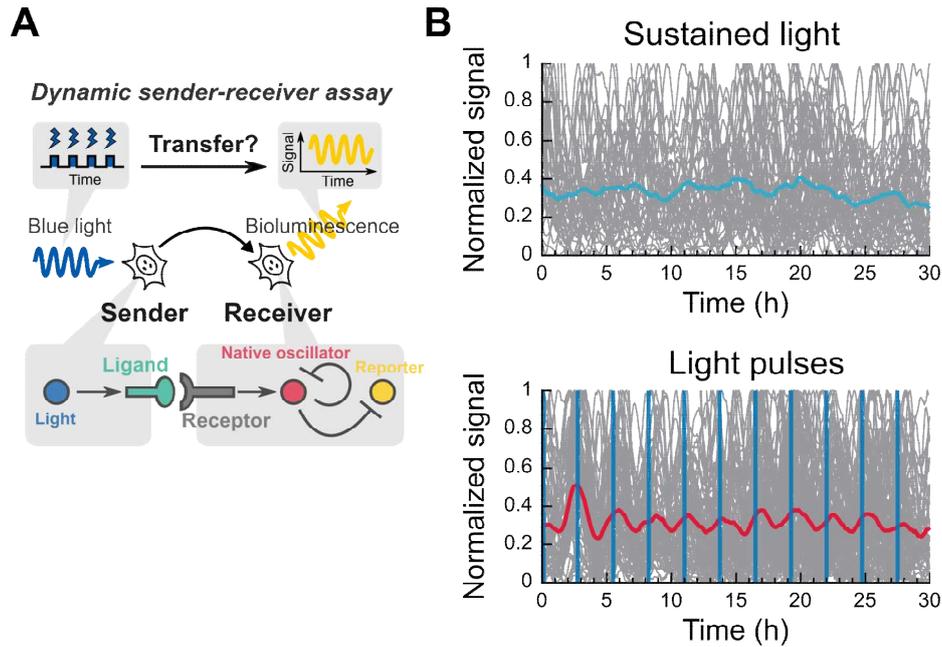


図 18: 送信細胞における Notch リガンド Dll1 の光遺伝学的発現制御と受信細胞における Hes1 の周期的な応答。

### 3. 1. 6. 神経幹細胞の動きに依存したトポジカル欠陥の形成

次に、神経幹細胞の転写因子ダイナミクスの理論モデルの妥当性を検討する関係で、細胞がどのような頻度で近接相互作用をする相手を交換しているかを調べた。その過程で、神経幹細胞がマクロに作るパターンを観察したところ、ネマチック液晶と同様なパターンが現れると同時に、細胞が配向した方向に沿って大きく運動をしていることを発見した。

1 細胞レベルの運動方向の相関関数の解析から、このシステムが有限の運動方向反転レートを持つ「アクティブネマチック系」という物理モデルのクラスに属することが確かめられた。アクティブネマチック系においては、細胞が非平衡に運動することの結果として、巨大な空間的な細胞数ゆらぎやトポジカル欠陥の運動が起きると理論的に予想されてきたが、この実験系においてまさにそれを観察できることを証明した。また、成体脳において新生ニューロンが嗅球に送り出される過程 (rostral migratory stream, RMS) で同様な細胞の配向・ネマチック運動が起きることが報告されていることを受け、RMS において重要な役割を担う NCAM と呼ばれる細胞接着因子の阻害を試みたところ、ネマチックパターンが破壊されることも確かめられた。

さらに、これまでの実験で報告のない新規の現象として、トポジカル欠陥に依存した細胞の集積が起きることを発見した(図19)。神経幹細胞に限らず、棒状の細胞の 2 次元培養は世界中の研究室で日常的に行われているが、ネマチック系の集団運動としての性質に着目して解析した研究は少なく、トポジカル欠陥に密度異常が発生するという現象は理論や数値シミュレーションにおいても知られていなかった。我々は、この現象を説明する新規の理論も構築した。具体的には、これまでアクティブマター研究では重要視されてこなかった粘性の非等方性が、トポジカル欠陥の付近では密度の時間発展に重要な役割を担うことを指摘し、ネマチック場と速度場の連続体方程式の最低次である

$$\gamma v = -\zeta \nabla \cdot Q$$

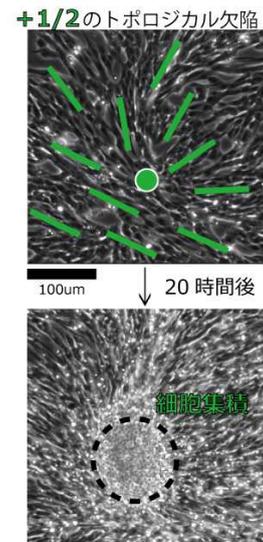


図19: 神経幹細胞の 2 次元観察 (位相差顕微鏡)。+1/2 トポジカル欠陥の形成。

を解析的・数値的に解くことで、トポロジカル欠陥への細胞集積が説明できることを示した。ここで、 $v$ は2次元の空間に依存する2次元の速度場、 $\zeta$ は系の「アクティブ度合い」を示す係数、 $Q$ はQ-テンソルと呼ばれるネマチックなオーダーパラメータを表す2次元空間に依存する2x2行列、 $\gamma$ は $Q$ に依存した摩擦に対応するテンソルである。この式に+1/2のトポロジカル欠陥を表す $Q$ を代入すると、集団運動により発生するマクロな力(式右辺、図20緑矢印)による流れが、細胞の配向パターンによる摩擦のために堰き止められる(式左辺、図20紫点線)様子がとらえられた。

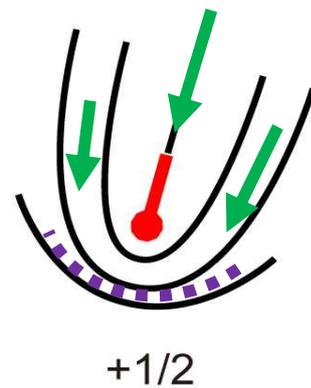


図20: トポロジカル欠陥に細胞が集積するメカニズム。

本研究では、物理学でよく知られているトポロジカル欠陥が、神経幹細胞の培養皿上に自然に発生するだけでなく、欠陥の種類によって細胞が集積するという現象が明らかになった。トポロジカル欠陥が理論の便宜上の概念ではなく、実際に細胞のふるまいに影響を与えている点は驚きで、運動する細胞が織りなす一見複雑な集団挙動を、今後系統的に理解するための手がかりが得られたといえる(Nature 2017)。

また、本結果は、誘因因子や反発因子が無くても、物理的法則に従って細胞密度が濃くなったり薄くなったりすることを示している。このトポロジカル欠陥は培養細胞だけでなく、発生途中の胎児内にも観察されている。このように細胞が密集することで分化誘導や細胞死が引き起こされることが示唆されており、トポロジカル欠陥はシグナリングセンターとして働いたり、臓器形成等の位置を決めるといった重要な役割を持つ可能性が考えられた。

### 3.1.7. ES細胞から誘導した未分節中胚葉様組織における同期化したHes7の発現振動

上述(4.1.5.)のように、細胞間位相同期現象について分子機構の基本原則を明らかにしたが、まだ未分節中胚葉でみられるような完璧な細胞間同期化機構の理解には至っていない。この研究の困難さは、未分節中胚葉様の培養細胞が存在しないためマウス個体を用いざるを得ないことによる。この問題点を解決するために胚性幹(ES)細胞から未分節中胚葉様の組織(iPSM)を誘導できる手法を開発した。作製したiPSMではHes7の発現が上昇した後、振動した。さらに、iPSM全体で波状の発現振動が起こり、分節が形成された。

また、iPSMを用いて、80種類のエピジェネティクス関連ケミカルライブラリースクリーニングを行ったところ、新規体節形成関連遺伝子としてBET family因子がHes7の発現振動の維持に関わっている可能性を発見した。

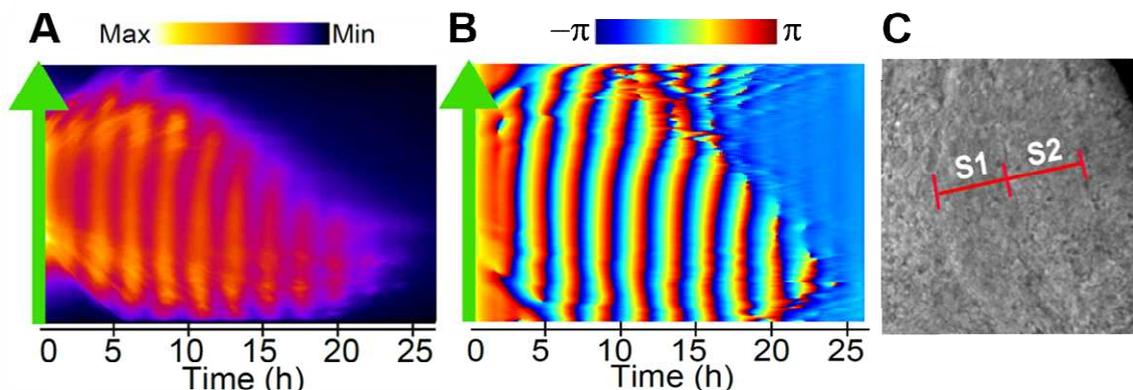


図21. iPSMにおけるHes7発現ダイナミクスと体節形成

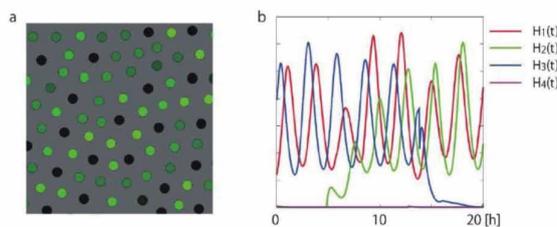
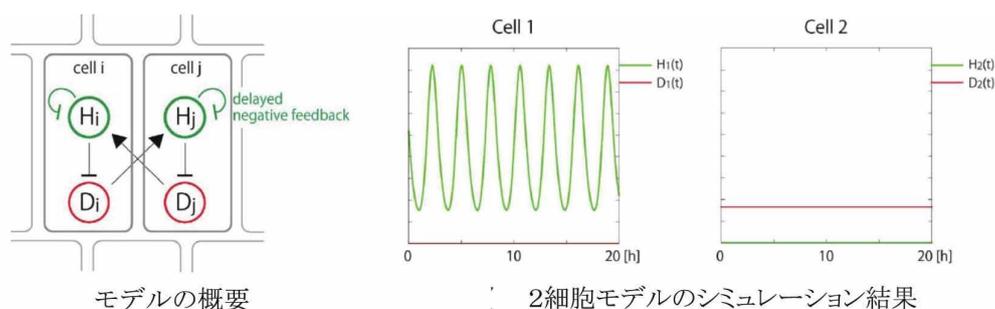
(A)時間経過におけるHes7発現パターンの変化 矢印はHes7発現オシレーションの方向を示す。  
(B)Hes7オシレーションの位相変化 (C)体節形成時の明視野画像

### 3.2 遺伝子発現振動の数理モデル化と解析(お茶の水大学 郡グループ)

#### (1)研究実施内容及び成果

##### 3.2.1. 遺伝子発現の振動と静止状態が共存する数理モデル作成と解析

影山グループは神経前駆細胞の Hes 発現が2峰性分布を示すことを発見した。この現象のメカニズムを数理モデルの構築と解析を通して理解することを目指した。神経幹細胞が多数集まった状況における振動の様子をシミュレーションするために、時間遅れのある振動子(転写因子 Hes1 発現量)が近接的な相互作用(Notch signal のリガンドである Dll1 の発現量)により影響を及ぼしあうモデルを考えた。まず2細胞だけが相互作用する場合に、片方の細胞の Hes1 発現量のみが振動し、もう片方の細胞では振動が見られない(休止状態)、という条件があることを見つけた(図22)。細胞内因子の発展方程式をそのままに、多粒子の配置を調和ポテンシャル+ブラウン運動でモデル化すると、細胞が Hes1 振動状態と休止状態を行き来する(図22)ことがデモンストレーションできた。この結果は実験結果とともに報告した(Science 2013)。発生過程において、神経幹細胞には神経細胞に分化するものと幹細胞として残るものがあることが知られているが、モデルで示された細胞間相互作用と運動による振動状態と休止状態の間の切り替えが、こうした神経幹細胞の不均一性の起源になっている可能性がある。



多細胞モデルのシミュレーション結果  
図22: 遺伝子発現の振動と静止状態が共存する数理モデル

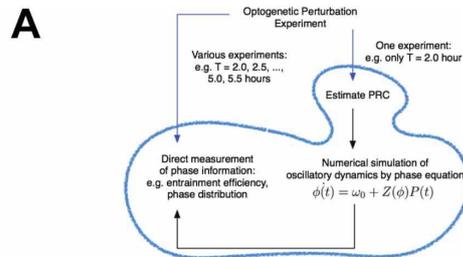
##### 3.2.2. Hes1 遺伝子発現振動の位相モデルによる解析

細胞における生物学的機能は、対応した遺伝子(あるいは複数の遺伝子のセット)発現により制御されている。この時、遺伝子の平均的発現量や積算した発現量といった静的な値だけではなく、発現量の変動のような動的な情報も利用している可能性があることが知られてきている。影山研究室の磯村氏が行った実験では、細胞集団における Hes1 遺伝子の発現を外部からの光刺激により制御し、遺伝子発現のダイナミクスを個々の細胞において観測することに成功している。この実験では、外部からの周期刺激に対し引き込み同期(遺伝子発現の振動周期と外部刺激の周期が一致すること)を示す様子が示されている。しかし、1細胞においても遺伝子発現が振動しているか(細胞が振動しとして記述できるのか)は不明である。そこで本研究では磯村氏の実験から得られた位相応答曲線を用い、位相モデルから Hes1 遺伝子発現における周期刺激に対する応答を調べ実

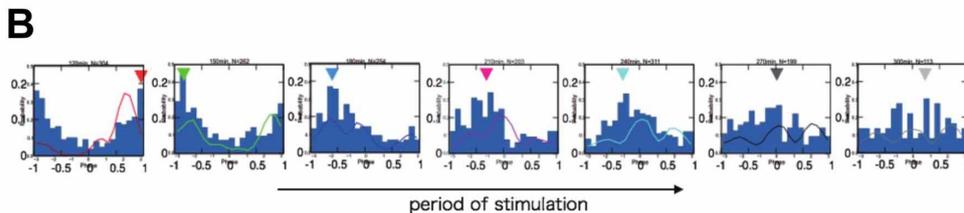
実験結果と突き合わせることで、1細胞での細胞の位相記述の妥当性を検証した(図23A: 青く囲った箇所が本研究の担当箇所)。また、細胞は本来非常に強い揺らぎを含む系であり、揺らぎの由来も種々考えられる。本研究では先ず、位相モデルにおいて考えられる2つの揺らぎ(固有振動数の揺らぎと刺激への応答の揺らぎ)についてそれぞれ検証した。次式のモデルを考える。

$$\dot{\phi}_i(t) = \omega_0 + Z(\phi_i)P(t)$$

ここで、 $\phi_i(t)$ は細胞*i*におけるHes1遺伝子発現を記述する位相、 $\omega_0$ は細胞の固有振動数を示す。外部刺激がなければこの細胞は振動数 $\omega_0$ でHes1遺伝子を発現する。この細胞に外部刺激 $P(t)$ が与えられると、刺激が与えられた位相に応じて反応を返すある応答関数 $Z(\phi)$ だけ余分に変動する。図23Bに、刺激周期毎の位相分布を示す。棒グラフが実験値、実線がシミュレーション結果を示す。どちらもバラツキの大きな分布であるが、ピーク位置や分布の外形など、典型的には良い一致を示している。また、オーダーパラメータについても、定性的には一致した振る舞いを再現できることがわかった。本モデルの含む2つの揺らぎは、固有振動数の揺らぎはオーダーパラメータが刺激周期と共に減少する傾向に、位相応答の揺らぎは位相分布の形状に強く影響を与える。本研究から、Hes1遺伝子の発現に関しては個々の細胞はそれぞれが強い揺らぎを含んだ振動子集団として捉えることができることがわかった。この結果は、実験結果とともに報告された(Genes Dev. 2017)。



数理モデルの位置づけ



実験と位相モデルの数値シミュレーション結果の比較

図23: Hes1 遺伝子発現振動の位相モデルによる解析

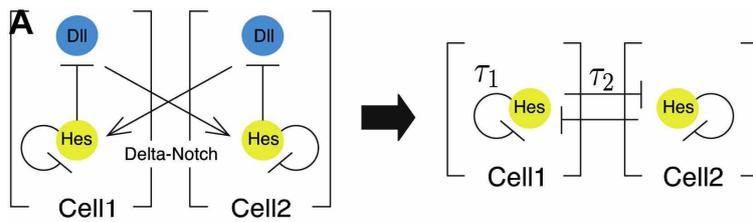
### 3. 2. 3. 細胞間相互作用の時間遅れによる振動子死現象

細胞には、隣り合う細胞との細胞間相互作用により制御される遺伝子が存在する。例えば、DII や Hes 遺伝子は排他的相互作用である細胞間の Delta-Notch 相互作用を介して相手の細胞における DII 遺伝子の発現により自身の Hes 遺伝子の発現が制御される(図24A)。Hes 遺伝子は自身の発現に対してネガティブフィードバックを持つ為、生成/分解のパラメータによって振動を示し、Hes が振動することで DII も振動を示す。Hes の自身へのネガティブフィードバック、および細胞間

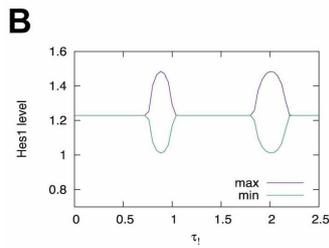
$$\frac{d}{dt} x_i(t) = v \frac{K_1^m}{K_1^m - x_i(t - \tau_1)^m} \frac{K_2^n}{K_2^n - x_j(t - \tau_2)^n} - c x_i(t)$$

相互作用による時間遅れをそれぞれ  $\tau_1$ 、 $\tau_2$  とし、1変数でモデル化した式を下に示す。

ここで、 $x_i(t)$ は細胞*i*におけるHesのmRNAの発現量を示す。vおよびcはそれぞれHesの最大の合成率、分解率をしめす。また、 $K_1$ 、 $K_2$ はそれぞれ合成に寄与する典型的なHesの量を示す。Hill係数m,nはともに2とした。

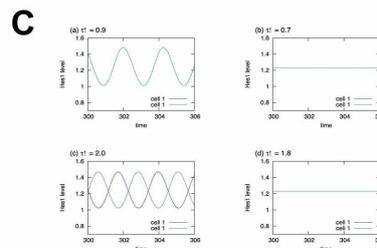


Delta-Notch を介した Hes/Dll 発現ネットワークの模式図



相互作用の時間遅れが

Hes 発現の振動振幅に与える効果



Hes 発現ダイナミクス

図24: 細胞間相互作用の時間遅れによる振動子パターン。

(A) 隣接細胞間におけるNotchシグナルを介した Hes の発現制御。この経路は、右のような double negative feedback loop に簡略化できる。(B,C) 細胞間相互作用における時間遅れに依存した発現パターン。

Hes の振動振幅の細胞間相互作用における時間遅れ依存性を表す分岐図を示す(図24B)。細胞間相互作用により振動が停止する状態、より強く振動を示す状態を遷移することがわかる。振動状態における典型的な Hes 発現の時系列を図24C に示す。図24C に見られる2つの振動状態 ( $\tau_2 \sim 0.9$  および  $\tau_2 \sim 2.0$ ) では、前者が同相で同期して振動しているのに対し、後者は逆相で同期していることがわかる。また、同期している状態から細胞間相互作用の時間遅れを少し短くすると、振動が停止する状況があることもわかる。これらの結果は対応する実験結果とともに報告された(Genes & Development 2016)。

## § 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌35件)

### ①欧文

1. Guiu J, Shimizu R, D'Altri T, Fraser S, Hatakeyama J, Bresnick E, Kageyama R, Dzierzak E, Yamamoto M, Espinosa L, Bigas A (2013) Hes repressors are essential regulators of hematopoietic stem cell development downstream of Notch signaling. *J Exp Med* 210:71-84.
2. Harima Y, Takashima Y, Ueda Y, Ohtsuka T, Kageyama R (2013) Accelerating the tempo of the segmentation clock by reducing the number of introns in the *Hes7* gene. *Cell Rep* 3:1-7.
3. González A, Manosalva I, Liu T, Kageyama R (2013) Control of the *Hes7* expression by Tbx6, the Wnt pathway and the chemical Gsk3 inhibitor LiCl in the mouse segmentation clock. *PLoS ONE* 8:e53323.
4. Manosalva I, González A, Kageyama R (2013) *Hes1* in the somatic cells of the murine ovary is necessary for oocyte survival and maturation. *Dev Biol* 375:140-151.
5. Jacob J, Kong J, Moore S, Milton C, Sasai N, Gonzalez-Quevedo R, Terriente J, Imayoshi I, Kageyama R, Wilkinson DG, Novitsch BG, Briscoe J (2013) Retinoid signalling specifies distinct neuronal identities through graded expression of the transcription factor, *Ascl1*. *Curr Biol* 23:412-418.
6. Benraiss A, Toner MJ, Xu Q, Bruel-Jungerman E, Rogers EH, Wang F, Economides AN, Davidson BL, Kageyama R, Nedergaard M, Goldman SA (2013) Mobilization of endogenous progenitor cells regenerates functionally-integrated medium spiny striopallidal projection neurons and delays disease progression in a transgenic model of Huntington's disease. *Cell Stem Cell* 12:787-799.
7. Sparrow DB, Fageih EA, Sallout B, Alswaid A, Ababneh F, Al-Sayed M, Rukban H, Eyaid WM, Kageyama R, Ellard S, et al. (2013) Mutation of *HES7* in a large extended family with spondylocostal dysostosis and dextrocardia with *situs inversus*. *Am J Med Genet* 161, 2244-2249.
8. Kitagawa M, Hojo M, Imayoshi I, Goto M, Ando M, Ohtsuka T, Kageyama R, Miyamoto S (2013) *Hes1* and *Hes5* regulate vascular remodeling and arterial specification of endothelial cells in brain vascular development. *Mech Dev* 130:458-466.
9. Tateya T, Imayoshi I, Tateya I, Hamaguchi K, Torii H, Ito J, Kageyama R (2013) Hedgehog signaling regulates prosensory cell properties during the basal-to-apical wave of hair cell differentiation in the mammalian cochlea. *Development* 140:3848-3857.
10. Imayoshi I, Isomura A, Harima Y, Kawaguchi K, Kori H, Miyachi H, Fujiwara TK, Ishidate F, Kageyama R (2013) Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors. *Science* 342:1203-1208.
11. Hatakeyama J, Wakamatsu Y, Nagafuchi A, Kageyama R, Shigemoto R, Shimamura K (2014) Cadherin-based adhesions in the apical endfoot are required for active Notch signaling to control neurogenesis in vertebrates. *Development* 141:1671-1682.
12. Sakamoto M, Ieki N, Miyoshi G, Mochimaru D, Miyachi H, Imura T, Yamaguchi M, Fishell G, Mori K, Kageyama R, Imayoshi I (2014) Continuous postnatal neurogenesis contributes to formation of the olfactory bulb neural circuits and flexible olfactory associative learning. *J Neurosci* 34:5788-5799.
13. Kori H, Kuramoto Y, Jain S, Kiss IZ, Hudson JL (2014) Clustering in globally coupled oscillators near a Hopf bifurcation: theory and experiments. *Phy Rev E* 89:062906.
14. Kato T, Sakata-Yanagimoto M, Nishikii H, Miyake Y, Yokoyama Y, Asabe Y, Kamada Y, Ueno M, Obara N, Suzukawa K, et al. (2015) *Hes1* suppresses acute myeloid leukemia

- development through FLT3 repression. *Leukemia* 29:576-585.
15. Hosokawa S, Furuyama K, Horiguchi M, Aoyama Y, Tsuboi K, Sakikubo M, Goto T, Hirata K, Tanabe W, Nakano Y, et al. (2015) Impact of Sox9 dosage and Hes1-mediated Notch signaling in controlling the plasticity of adult pancreatic duct cells in mice. *Sci Rep* 5:8518.
  16. Sugita S, Hosaka Y, Okada K, Mori D, Yano F, Kobayashi H, Taniguchi Y, Mori Y, Okuma T, Chang SH, et al. (2015) Transcription factor Hes1 modulates osteoarthritis development in cooperation with calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:3080-3085.
  17. Schnell SA, Ambesi-Impiombato A, Sanchez-Martin M, Belver L, Xu L, Qin Y, Kageyama R, Ferrando AA (2015) Therapeutic targeting of HES1 transcriptional programs in T-ALL. *Blood* 125: 2806-2814.
  18. Kobayashi T, Iwamoto Y, Takashima K, Isomura A, Kosodo Y, Kawakami K, Nishioka T, Kaibuchi K, Kageyama R (2015) Deubiquitinating enzymes regulate Hes1 stability and neuronal differentiation. *FEBS J* 282:2475-2487.
  19. Nakano Y, Negishi N, Gocho S, Mine T, Sakurai Y, Yazawa M, Abe K, Yagita H, Habu S, Kageyama R, et al. (2015) Disappearance of centroacinar cells in the Notch ligand-deficient pancreas. *Genes Cells* 20:500-511.
  20. Watanabe N, Kageyama R, Ohtsuka T (2015) Hbp1 regulates the timing of neuronal differentiation during cortical development by controlling cell cycle progression. *Development* 142:2278-2290.
  21. Tateya T, Sakamoto S, Imayoshi I, Kageyama R (2015) In vivo overactivation of Notch signaling pathway in the developing cochlear epithelium. *Hearing Res* 327:209-217.
  22. Imai Y, Kobayashi Y, Inoshita T, Meng H, Arano T, Uemura K, Asano T, Yoshimi K, Zhang C-L, Matsumoto G, et al. (2015) The Parkinson's disease-associated protein kinase LRRK2 modulates Notch signaling through the endosomal pathway. *PLoS Genet* 11:e1005503.
  23. Goto M, Hojo M, Ando M, Kita A, Kitagawa M, Ohtsuka T, Kageyama R, Miyamoto S (2015) *Hes1* and *Hes5* are required for differentiation of pituicytes and formation of the neurohypophysis in pituitary development. *Brain Res* 1625:206-217.
  24. Sugimura K, Kori H (2015) Exponential system-size dependence of the lifetime of transient spiral chaos in excitable and oscillatory media. *Phys Rev E* 92:062915.
  25. Shimojo H, Isomura A, Ohtsuka T, Kori H, Miyachi H, Kageyama R (2016) Oscillatory control of Delta-like1 in cell interactions regulates dynamic gene expression and tissue morphogenesis. *Genes Dev* 30:102-116.
  26. Souilhol C, Lendinez JG, Rybtsov S, Murphy F, Wilson H, Hills D, Batsivari A, Binagui-Casas A, McGarvey AC, MacDonald HR, Kageyama R, et al. (2016) Developing HSCs become Notch independent by the end of maturation in the AGM region. *Blood* 128:1567-1577.
  27. Kobayashi Y, Kori H (2016) Synchronization failure caused by interplay between noise and network heterogeneity. *Chaos* 26:094805.
  28. Izumida Y, Kori H, Seifert U (2016) Energetics of synchronization in coupled oscillators rotating on circular trajectories, *Phys Rev E* 94:052221.
  29. Isomura A, Ogushi F, Kori H, Kageyama R (2017) Optogenetic perturbation and bioluminescence imaging to analyze cell-to-cell transfer of oscillatory information. *Genes Dev* 31:524-535.
  30. Kawaguchi K, Kageyama R, Sano M (2017) Topological defects control collective dynamics in neural progenitor cell cultures. *Nature* 545:327-331.
  31. Kori H, Yamaguchi Y, Okamura H (2017) Accelerating recovery from jet lag: prediction

- from a multi-oscillator model and its experimental confirmation in model animals. *Sci Rep* 7:46702.
32. Bansod S, Kageyama R, Ohtsuka T (2017) Hes5 regulates the transition timing of neurogenesis and gliogenesis in mammalian neocortical development. *Development* 144:3156-3167.
  33. Sugimura K, Kori H (2017) A reduced cell-based phase model for tissue polarity alignment through global anisotropic cues. *Sci Rep* 7.1:17466.
  34. Matsumiya M, Tomita T, Yoshioka-Kobayashi K, Isomura A, Kageyama R (2018) ES cell-derived presomitic mesoderm-like tissues for analysis of synchronized oscillations in the segmentation clock. *Development* 145, dev156836.
  35. Perron A, Nishikawa Y, Iwata J, Shimojo H, Takaya J, Kobayashi K, Mbenza NM, Takenoya M, Kageyama R, Kodama Y, Uesugi M (2018) A small-molecule Hes1 inhibitor that arrests cell cycle by interacting with PHB2. *J Biol Chem*, in press.

## ②和文

### (2)その他の著作物(総説、書籍など)

#### ① 欧文

1. Harima Y, Kageyama R (2013) Oscillatory links of Fgf signaling and Hes7 in the segmentation clock. *Curr Opin Genet Dev* 23:484-490.
2. Imayoshi I, Shimojo H, Sakamoto M, Ohtsuka T, Kageyama R (2013) Genetic visualization of notch signaling in mammalian neurogenesis. *Cell Mol Life Sci* 70:2045-2057.
3. Imayoshi I, Kageyama R (2014) bHLH factors in self-renewal, multipotency, and fate choice of neural progenitor cells. *Neuron* 82:9-23.
4. Isomura A, Kageyama R (2014) Ultradian oscillators: rhythms and cell fate decisions. *Development* 141:3627-3636.
5. Harima Y, Imayoshi I, Shimojo H, Kobayashi T, Kageyama R (2014) The roles and mechanism of ultradian oscillatory expression of the mouse Hes genes. *Semin Cell Dev Biol* 34C:85-90.
6. Imayoshi I, Kageyama R (2014) Oscillatory control of bHLH factors in neural progenitors. *Trends Neurosci* 37:531-538.
7. Kobayashi T, Kageyama R (2014) Expression dynamics and functions of Hes factors in development and diseases. *Curr Top Dev Biol* 110:263-283.
8. Kageyama R, Shimojo H, Imayoshi I (2015) Dynamic expression and roles of Hes factors in neural development. *Cell Tissue Res* 359:125-133.
9. Imayoshi I, Ishidate F, Kageyama R (2015) Real-time imaging of bHLH transcription factors reveals their dynamic control in the multipotency and fate choice of neural stem cells. *Front Cell Neurosci* 9:288.
10. Shimojo H, Kageyama R (2016) Oscillatory control of Delta-like1 in somitogenesis and neurogenesis: a unified model for different oscillatory dynamics. *Semin Cell Dev Biol* 49:76-82.
11. Shimojo H, Kageyama R (2016) Making waves towards the shore by synchronicity. *Dev Cell* 36:358-359.
12. Isomura A, Kori H, Kageyama R (2017) Segmentation genes enter an excited state. *Dev Cell* 43, 121-123.
13. Shimojo H, Kageyama R (2017) Ultradian oscillations in Notch signaling during tissue

- morphogenesis. In Biological Clocks (Eds: K. Honma and S. Honma) Hokkaido Univ. Press, pp. 79-92.
14. Isomura A, Kageyama R (2017) Illuminating information transfer in signaling dynamics by optogenetics. *Curr Opin Cell Biol* 49, 9-15.
  15. Isomura A, Kageyama R (2018) An optogenetic method to control and analyze gene expression patterns in cell-to-cell interactions. *J Vis Exp* 133, e57149.
  16. Kageyama R, Shimojo H, Isomura A (2018) Oscillatory control of Notch signaling in development. *Molecular Mechanisms of Notch Signaling*, in press.

② 和文

1. 今吉格、影山龍一郎 (2013) bHLH 型転写因子の発現の振動による神経幹細胞の自己複製能と多分化能の制御およびその光操作、*ライフサイエンス新着論文レビュー First Author's*.
2. 影山龍一郎 (2014) 再生医療シリーズ:脳神経系の再生医学「発生と再生の融合的新展開」, 45-49.
3. 影山龍一郎 (2014) 医学のあゆみ「神経幹細胞研究の最前線」 1107-1112.
4. 影山龍一郎 (2015) 神経幹細胞における遺伝子発現の動的制御. 再生医療シリーズ「脳神経系の再生医学」 45-49.
5. 影山龍一郎、今吉格、磯村彰宏 (2015) 神経幹細胞分化制御機構. *分子脳科学* 242-248.
6. 下條博美、影山龍一郎 (2016) 形態形成を司る Notch リズム *実験医学* 34, 397-403.
7. 影山龍一郎 (2017) 神経分化と転写制御. *遺伝子発現制御機構* 140-144.
8. 影山龍一郎 (2017) 時間・空間パターン形成の制御:分節時計. *遺伝子発現制御機構* 187-191.
9. 影山龍一郎 (2018) 生き物を精密に理解する:分節時計. *フロンティア生命科学* in press.

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

- ① 招待講演 (国内会議33件、国際会議33件)

国際学会

1. Kageyama R. Hes oscillations in somitogenesis and neurogenesis. Swiss Japanese Developmental Biology Meeting, 京都, 2013年11月5日~11月8日.
2. Kageyama R, Imayoshi I, Sakamoto M. Functional significance of neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus and olfactory bulb. Commemorative Symposium of the 28<sup>th</sup> International Prize for Biology "Neurogenesis throughout Life", 神戸, 2013/11/28-29.
3. Kageyama R. "Ultradian oscillations in somitogenesis and neurogenesis", Dynamics of Stem Cell Decisions, Copenhagen, Denmark, 2013/8/28-30.
4. Kageyama R. Oscillatory gene expression in somitogenesis and neurogenesis. Mouse Molecular Genetics, Cambridge, UK, 2013/9/18-21.
5. Kageyama R. Dynamic control of neural determination genes in multipotency and fate choice. 5<sup>th</sup> International Stem Cell Meeting. Jerusalem, Israel, 2013/10/8-9.
6. Kageyama R. Dynamic control of neural determination genes in multipotency and fate choice. Cold Spring Harbor Asia/International Society for Stem Cell Research Joint Meeting on Stem Cells in Science and Medicine, Suzhou, China, 2013/10/14-17.
7. Kageyama R. Oscillatory control of determination factors for multipotency versus fate choice in mouse neural progenitors. OIST Symposium on Gradients and Signalling, 沖縄, 2013/11/11-15.
8. Kageyama R. Oscillatory gene expression with ultradian rhythms in somitogenesis and neurogenesis. National Taiwan University & Kyoto University Symposium, Taipei,

- 2013/12/19-20.
9. Kageyama R. The significance of dynamic control of fate determination factors in proliferation of neural stem cells. Adult Neurogenesis – From Stem Cells to Therapies, Mumbai, India, 2014/2/6-8.
  10. Kageyama R. Oscillatory gene expression in somitogenesis and neurogenesis. IAS Research Conference 2014 “Chromatin Decoding”. 木津川, 2014/5/12-15.
  11. Kageyama R. Light control of Ascl1/Mash1 expression in neural stem cells. iCeMS International Symposium “Light Control in Cell Biology”. 京都, 2014/6/12-13.
  12. Kageyama R. The significance of oscillatory expression of Notch effectors in neural development. Gordon Research Conference “Notch Signaling in Development, Regeneration & Disease”, Lewiston, USA, 2014/7/20-25.
  13. Kageyama R. Dynamic control of bHLH genes in multipotency and fate choice of neural progenitors. Gordon Research Conference “Neural Development”, Newport, USA, 2014/8/10-15.
  14. Kageyama R. Dynamic control of Notch signaling in multipotency and fate choice of neural stem cells. Notch Meeting VIII, Athens, Greece, 2014/9/28-10/1.
  15. Kageyama R. Dynamic control of bHLH genes in multipotency and fate choice of neural stem cells. DiSCUSS-CSC, Hanover, Germany, 2014/10/15-17.
  16. Kageyama R. Dynamic control of bHLH factors in multipotency and fate choice of neural stem cells. 18<sup>th</sup> International Conference of ISD in conjunction with BSDB, London, UK, 2014/11/2-5.
  17. Kageyama R. Dynamic control of bHLH factors in somitogenesis and neurogenesis. Cincinnati Children’s Hospital, Cincinnati, USA, 2015/3/4.
  18. Kageyama R. Dynamic control of bHLH factors in multipotent neural stem cells. CDB Symposium 2015: Time in Development, Kobe, 2015/3/23-25.
  19. Kageyama R. Plenary Lecture: Molecular control of neural stem cells. IBRO 9<sup>th</sup> World Congress, Rio de Janeiro, Brazil, 2015/7/7-11.
  20. Imayoshi I. Oscillatory control of determination factors for multipotency versus fate choice in neural stem cells. IBRO 9<sup>th</sup> World Congress, Rio de Janeiro, Brazil, 2015/7/7-11.
  21. Isomura A. Interrogating oscillatory gene expression by optogenetics. International Symposium on Synthetic Systems Biology Joint 14th Symposium of Biochemical Systems Theory (BST2015), Fukuoka, 2015/9/17-18.
  22. Kageyama R. Dynamic control of neural determination factors in multipotency and fate choice. Workshop “Development and Adult Neurogenesis in the Central Nervous System”, Baeza, Spain, 2015/10/5-7.
  23. Kageyama R. Oscillatory control of neural stem cells. JST CREST-PRESTO Joint International Symposium, 東京, 2015/11/5-6.
  24. Kageyama R. Oscillatory control of multipotency and fate choice of neural stem cells. EMBO/EMBL Symposium “Biological Oscillators”, Heidelberg, Germany, 2015/11/12-14.
  25. Kageyama R. Oscillatory control of multipotency and fate choice of neural stem cells. Cortical Organization 3. Tokyo, 2016/2/11-12.
  26. Kageyama R. Understanding the mechanism of biological events by validating mathematical modeling. Kyoto Winter School 2016, Kyoto, 2016/2/15-26.
  27. Kageyama R. Oscillatory control of neural stem cells. The 9<sup>th</sup> Annual Meeting for Japanese Developmental Neuroscientists. Tokyo, 2016/3/18-19.
  28. Kageyama R. Oscillatory control of neural stem cells. Swiss-Kyoto Joint Symposium on Life Science. Kyoto, 2016/6/13.
  29. Kageyama R. Dynamic control of neural stem cells. Volga Neuroscience Meeting 2016, Saint Petersburg-Nizhny Novgorod, Russia, 2016/7/24-30.

30. Kageyama R. Understanding the mechanism of biological events by using mathematical modeling. Life Science Seminars of EPFL. Lausanne, Switzerland, 2016/10/14.
31. Kageyama R. Dynamic control of neural stem cells. IST, Vienna, Austria, 2016/10/18.
32. Kageyama R. Oscillatory control of neural stem cells. Keystone Symposium: Neurogenesis during Development and in the Adult Brain, Olympic Valley, USA, 2017/1/8-12.
33. Kageyama R. How to rejuvenate your brain. International Symposium on "Frontiers of Innovative Research towards Sustainable Society in Asia", Bangkok, Thailand, 2017/2/4.
34. Kageyama R. Dynamic transcriptional control of neural stem cells. EMBO Conference "Gene Regulatory Mechanisms in Neural Fate Decisions" Alicante, Spain, 2017/9/7-10.
35. Kageyama R. Dynamic transcriptional control of neural stem cells. The Notch Meeting X, Athens, Greece, 2017/10/1-6.

#### 国内学会

1. Kageyama R. Ultradian oscillations in somitogenesis and neurogenesis. The 8<sup>th</sup> Symposium of the Institute Network, 京都, 2013年6月27-28日.
2. 影山龍一郎. 体節形成と遺伝子発現振動, 第14回運動器科学研究会, 東京, 2013年9月13-14日.
3. Kageyama R. Oscillatory control of determination factors for multipotency versus fate choice in mouse neural progenitors. International Symposium "Neocortical Organization 2", 岡崎, 2013年11月22日.
4. 影山龍一郎. 多分化能と運命決定における神経分化決定遺伝子のダイナミックな制御, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013年12月3日~6日.
5. 下條博美、播磨有希子、前田勇樹、大塚俊之、宮地均、影山龍一郎. 神経発生過程における遺伝子発現ダイナミクスによる神経分化制御機構の解明, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013年12月3-6日.
6. 影山龍一郎. 遺伝子発現振動の分子機構と意義, 第5回 Molecular Cardiovascular Conference II, 神戸, 2014年9月5-6日.
7. 影山龍一郎. Dynamic control of bHLH factors in multipotency and fate choice of neural stem cells, 第37回日本神経科学大会, 横浜, 2014年9月11-13日.
8. 影山龍一郎. 多分化能と運命決定におけるbHLH因子のダイナミックな制御, 第92回茨城県脳神経外科集談会, つくば, 2015年3月14日.
9. 影山龍一郎. 遺伝子発現振動の分子機構と意義, 生命動態の分子メカニズムと数理, 京都, 2015年3月16-17日.
10. Shimojo H, Isomura A, Ohtsuka T, Miyachi T, Kageyama R. Dynamic expression of Notch ligand Dll1 during development. 第120回日本解剖学会総会全国学術集会・第92回日本生理学会大会, 神戸, 2015年3月21-23日.
11. 今吉格. bHLH型転写因子の発現振動による神経幹細胞の自己複製能と多分化能の制御およびその光操作, 第120回日本解剖学会総会全国学術集会・第92回日本生理学会大会, 神戸, 2015年3月21-23日.
12. Kageyama R. Dynamic control of bHLH factors in multipotency and fate choice of neural stem cells. 4<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Clock, 京都, 2015年3月27日.
13. Imayoshi I. 第19回分子神経科学研究センター国際シンポジウム, 大津, 2015年10月8日.
14. 影山龍一郎. 神経幹細胞の光遺伝学的操作, KRIワークショップ, 2015年10月29-30日.
15. 影山龍一郎. 神経幹細胞の理解と操作を目指して, 第50回慶應ニューロサイエンス研

- 究会,東京,2015年10月31日.
16. Imayoshi I, Kageyama R. Regulatory mechanism of neural stem cells revealed by optical manipulation of gene expression. BMB2015, 神戸, 2015年12月1-4日.
  17. Shimojo H, Kori H., Isomura A, Ohtsuka T, Miyachi H, Kageyama R. Dynamic expression of Notch ligand Dll1 during development. BMB2015, 神戸, 2015年12月1-4日.
  18. 郡宏. 時差ボケの東西移動に対する非対称性: 実験と数理の協働アプローチ、日本細胞生物学会、京都、2016年6月16日
  19. 影山龍一郎. 神経幹細胞のダイナミックな制御、第48回日本結合組織学会学術大会、長崎、2016年6月24-25日.
  20. Kageyama, R. Dynamic control of neural stem cells. 第39回日本神経科学大会、横浜、2016年7月20-22日.
  21. Shimojo H, Isomura A, Ohtsuka T, Kori H., Miyachi H, Kageyama, R. Oscillatory Control of Delta-Like1 in Cell Interactions Regulates Dynamic Gene Expression and Tissue Morphogenesis. 第39回日本神経科学大会、横浜、2016年7月20-22日.
  22. 影山龍一郎. 数理モデルを使って生命現象を理解する 第28回高遠・分子細胞生物学シンポジウム、高遠、2016年8月25-26日.
  23. Shimojo H, Kori H., Isomura A, Ohtsuka T, Miyachi H, Kageyama R. Oscillatory Control of Delta-Like1 in Cell Interactions Regulates Dynamic Gene Expression and Tissue Morphogenesis. 第89回日本生化学会大会、仙台、2016年9月25-27日.
  24. Shimojo H, Kori H., Isomura A, Ohtsuka T, Miyachi H, Kageyama R. Oscillatory Control of Delta-Like1 in Cell Interactions Regulates Dynamic Gene Expression and Tissue Morphogenesis. The 10<sup>th</sup> Notch Meeting. 三島、2016年10月5-6日.
  25. Shimojo H, Kori H., Isomura A, Ohtsuka T, Miyachi H, Kageyama R. Ultradian oscillations in Notch signaling during tissue morphogenesis. Sapporo Symposium on Biological Rhythm. 札幌、2016年11月9-10日.
  26. 影山龍一郎. 短周期遺伝子発現リズムの動作原理と意義 第23回日本時間生物学会学術大会、名古屋、2016年11月12-13日.
  27. Shimojo H, Kori H., Isomura A, Ohtsuka T, Miyachi H, Kageyama R. Notch signaling dynamics during murine morphogenesis. 第39回日本分子生物学会年会、横浜、2016年11月30日-12月2日.
  28. 磯村彰宏. 光遺伝学による遺伝子発現リズムの細胞間情報伝達機構の解明 第39回日本分子生物学会年会、横浜、2016年11月30日-12月2日.
  29. 影山龍一郎. 受精から体ができるまで 世界トップレベル研究拠点プログラム10周年記念講演会「日本の科学の未来に向けて」、東京、2016年12月17日.
  30. 影山龍一郎. Understanding the mechanisms of biological events by using mathematical modeling. 第9回 NAGOYA グローバルリトリート、愛知、2017年2月10-11日.
  31. 影山龍一郎. Dynamic transcriptional control of neural stem cells. Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. 東京、2017年5月10-13日.
  32. Shimojo H, Kori H., Isomura A, Ohtsuka T, Miyachi H, Kageyama R. Ultradian oscillations of Notch signaling in cell-cell interactions regulate dynamic gene expression networks and tissue morphogenesis. Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. 東京、2017年5月10-13日.
  33. 影山龍一郎. 発生過程におけるダイナミックな遺伝子発現動態の解明と制御、第

39回日本光医学・光生物学会, 名古屋, 2017年7月21-22日.

② 口頭発表 (国内会議19件、国際会議 7件)

国際学会

1. Harima Y, Takashima Y, Ueda Y, Ohtsuka T, Kageyama R. Accelerated tempo of the segmentation clock by reducing the number of introns in the Hes7 gene. The 20<sup>th</sup> East Asia Joint Symposium, 東京, 2013/11/5-8.
2. Kobayashi K. Single-cell analysis of mouse segmentation clock. East Asia Joint Symposium 2015, Okinawa, 2015/11/11-14.
3. Shimojo H, Isomura A, Kori H, Ohtsuka T, Miyachi H, Kageyama R. Dynamic expression of Notch ligand Dll1 during development. EMBO/EMBL Symposium “Biological Oscillators”, Heidelberg, Germany, 2015/11/12-14.
4. Maeda Y, Kageyama R. How does Hes1 oscillation control cell cycle progression? The 14th International Student Seminar. Kyoto, 2016/3/9-14.
5. Shimojo H, Kori H, Isomura A, Ohtsuka T, Miyachi H, Kageyama R. Oscillatory Control of Delta-Like1 in Cell Interactions Regulates Dynamic Gene Expression and Tissue Morphogenesis. Gordon Research Seminar. Lewiston, USA, 2016/7/30-31.
6. Kobayashi K, Kageyama R. Single-Cell Quantification of Synchronized Oscillation in the Mouse Segmentation Clock. Gordon Research Conference. Lewiston, USA, 2016/7/31-8/5.
7. Sugimura K. Phase model for polarity ordering in spatially extended dynamical units: Derivation and dynamical properties. 9th Dynamics Days Asia Pacific, Hong Kong Baptist University, Hong Kong, 2016/12/15.

国内学会

1. Harima Y, Takashima Y, Ueda Y, Ohtsuka T, Kageyama R. Accelerated tempo of the segmentation clock by reducing the number of introns in the Hes7 gene. 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012年12月11-14日.
2. 小串典子. 遺伝子発現分布の細胞密度依存性、日本物理学会第68回秋季大会、徳島, 2013年9月26日.
3. 小串典子. 排他的相互作用に基づく細胞分化モデルにおけるノイズ依存性, 日本物理学会第69回年次大会, 東海大学, 2014年3月27日.
4. 小林妙子. Hes1の脱ユビキチン化酵素はHes1タンパク質の安定性と機能を制御する, 第87回日本生化学会大会, 京都, 2014年10月15-18日.
5. 下條博美、磯村彰宏、大塚俊之、宮地均、影山龍一郎. マウス発生過程におけるNotchリガンドDll1の発現ダイナミクスの意義, 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014年11月25-27日.
6. 渡邊直希、大塚俊之、影山龍一郎. 大脳皮質形成期においてHbp1は細胞周期進行の制御を介してニューロン分化のタイミングを制御する, 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014年11月25-27日.
7. Imayoshi I. Impairment of hippocampal postnatal neurogenesis and its involvement in the neurodevelopmental disorders. 第38回日本神経科学大会, 神戸, 2015年7月28-31日.
8. Shimojo H, Kori H, Isomura A, Ohtsuka T, Miyachi H, Kageyama R. Oscillatory Control of Delta-Like1 in Cell Interactions Regulates Dynamic Gene Expression and Tissue Morphogenesis. 日本発生生物学会 秋季シンポジウム 2016, 三島, 2016年10月19-21日.
9. 小林久美子、新野祐介、宮脇敦史、影山龍一郎. 一細胞レベルの蛍光イメージングによる分節時計遺伝子Hes7の発現振動位相調節機構の解析. 第69回日本細胞生物学会

大会, 仙台, 2017年6月13-15日.

10. Shimojo H, Kageyama R. Dynamic gene expressions during neural development. 第40回日本神経科学大会, 幕張, 2015年7月20-23日.
11. Tateya T, Sakamoto S, Ishidate F, Imayoshi I, Kageyama R. Dynamic Atoh1 expression in prosensory domain of mammalian developing cochlea. 第40回日本神経科学大会, 幕張, 2015年7月20-23日.
12. Araki A, Minatohara K, Akiyoshi M, Imayoshi I, Kim R, Kawashima T, Bito H, Kageyama R, Okuno H. Reactivation of a neuronal subpopulation in hippocampal dentate gyrus during recent and remote memory recall. 第40回日本神経科学大会, 幕張, 2015年7月20-23日.
13. 郡宏. なぜ東向き旅行で時差ボケに苦しむのか?: 時差ボケをめぐる実験と数理の協働, 研究会「非線形現象の捉え方」、シンクロする生き物たち, 石垣, 2016年5月14日.
14. 杉村佳織. 平面内細胞極性のモデルの位相縮約理論, 日本物理学会秋季大会, 金沢 2016年9月14日.
15. 杉村佳織. 平面内細胞極性ダイナミクスの幾何的情報依存性, 日本物理学会第72回年次大会, 大阪, 2017年3月17日.
16. 設楽恭平. 平面内細胞極性を意識したアクティブマター集団モデル, 日本物理学会第72回年次大会, 大阪, 2017年3月20日.
17. 小林久美子、新野祐介、宮脇敦史、影山龍一郎. 一細胞レベルの蛍光イメージングによる分節時計遺伝子 *Hes7* の発現振動位相調節機構の解析. 第40回日本分子生物学会年会, 神戸, 2017年12月6-9日.
18. 松宮舞奈、小林久美子、磯村彰宏、影山龍一郎. ES細胞から未分節中胚葉組織への分化誘導. 第40回日本分子生物学会年会, 神戸, 2017年12月6-9日.
19. 下條博美、影山龍一郎. 遺伝子発現動態と神経分化の時間制御機構. 次世代脳プロジェクト・冬のシンポジウム, 東京, 2017年12月21-22日.

③ ポスター発表 (国内会議 20件、国際会議 20件)

国際会議

1. Shimojo H, Kageyama R. Dynamic expression of Notch ligand Dll1 during neural development. Swiss Japanese Developmental Biology Meeting, Kyoto, 2013/11/5-8.
2. Harima Y, Kageyama R. Accelerated tempo of the segmentation clock by reducing the number of introns in the *Hes7* gene. Swiss Japanese Developmental Biology Meeting, Kyoto, 2013/11/5-8.
3. Ohtsuka T, Kageyama R. Overexpression of *Hes1* leads to decelerated timing of cortical neurogenesis and expansion of neural stem cell reservoir in postnatal brain. Jerusalem, Israel, 2013/10/8-9.
4. Imayoshi I, Kageyama R. Oscillatory expression of bHLH transcriptional factors in neural stem cells. Jerusalem, Israel, 2013/10/8-9.
5. Ogushi N. Reliability of cell fate decision using a simple multi-cell model with inhibitory cell-cell interaction, The Third Annual winter q-bio meeting, the Big Island of Hawaii at the Hilton Waikoloa Village, 2014/2/19.
6. Ogushi N. Reliability of cell fate decision using a simple multi-cell model, Third international workshop on Spatiotemporal Pattern Formation in Biological and Active Matters, Tokyo, 2014/3/2.
7. Kobayashi T. Deubiquitination modulates *Hes1* repressor activity by *Hes1* protein

- stabilization. The 5th International Congress on Stem Cells and Tissue Formation, Dresden, Germany, 2014/7/8-11.
8. Ogushi N. Reliability of cell fate decision using a simple multiple cell model with inhibitory interaction, International Conference on Statistical physics (SigmaPhi 2014), Rhodes (Greece), 2014/7/11.
  9. Sakamoto S, Tateya T, Harima Y, Imayoshi I, Ito J, Kageyama R. Expression of bHLH genes in developing cochlear epithelium. Inner ear biology workshop, Kyoto, 2014/11/1-4.
  10. Tateya T, Sakamoto S, Imayoshi I, Kageyama R. In Vivo Overactivation of Notch Signaling Pathway in Cochlear Prosensory Epithelium. Inner ear biology workshop, Kyoto, 2014/11/1-4.
  11. Isomura A, Ogushi F, Kori H, Kageyama R. Controlling natural genetic oscillators by light. 3rd Annual Winter q-bio Meeting, Hawaii, USA, 17-20 February, 2015.
  12. Isomura A. Single-cell robustness of mammalian genetic oscillators revealed by optogenetic perturbation. CDB Symposium 2015: Time in Development, Kobe, 2015/3/23-25.
  13. Kobayashi T. Deubiquitinating enzymes regulate Hes1 stability and neuronal differentiation. CDB Symposium 2015: Time in Development, Kobe, 2015/3/23-25.
  14. Shimojo H. Dynamic expression of Notch ligand Dll1 during development. CDB Symposium 2015: Time in Development, Kobe, 2015/3/23-25.
  15. Sugimura K, Kori H. Role of oscillation in periodic pattern formation in a noisy system. 8th International Conference Engineering of Chemical Complexity, Garching, Germany, 2015/6/23.
  16. Isomura A, Ogushi F, Kori H, Kageyama R. Dynamic responses of genetic oscillators revealed by optogenetic perturbation. EMBO/EMBL Symposium "Biological Oscillators", Heidelberg, Germany, 2015/11/12-14.
  17. Shimojo H, Kori H, Isomura A, Ohtsuka T, Miyachi H, Kageyama R. Dynamic expression of Notch ligand Dll1 during development. CDB Symposium. Kobe, 2016/3/28-30.
  18. Shimojo H, Kori H, Isomura A, Ohtsuka T, Miyachi H, Kageyama R. Oscillatory Control of Delta-Like1 in Cell Interactions Regulates Dynamic Gene Expression and Tissue Morphogenesis. Gordon Research Conference. Lewiston, USA, 2016/7/31-8/5.
  19. Sugimura K, Kori H. Phase model for polarity ordering in spatially extended dynamical units: Derivation and dynamical properties. 5th winter q-bio meeting, Hawaii, 2017/2/23.
  20. Araki A, Minatohara K, Akiyoshi M, Imayoshi I, Kim R, Kawashima T, Bito H, Kageyama R, Okuno H. Reactivation of a neuronal subpopulation in the dentate gyrus during memory recalls with long intervals. Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington DC, USA, 2017/11/11-15.

#### 国内会議

1. Harima Y, Takashima Y, Ueda Y, Ohtsuka T, Kageyama R. Accelerated tempo of the segmentation clock by reducing the number of introns in the Hes7 gene. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 松江、2013年5月29-31日.
2. 小串典子. Dependence of cell differentiation ratio on cell-cell interaction and noise. 第51回日本生物物理学会年会, 国立京都国際会館、2013年10月30日.
3. Harima Y, Takashima Y, Ueda Y, Ohtsuka T, Kageyama R. Accelerated tempo of the segmentation clock by reducing the number of introns in the Hes7 gene. The 20<sup>th</sup> East Asia Joint Symposium, 東京、2013年11月5-8日.

4. 小林妙子. Hes1 の脱ユビキチン化酵素は Hes1 タンパク質の安定性と機能を制御する, 第 87 回日本生化学会大会, 京都, 2014 年 10 月 15-18 日.
5. 下條博美、磯村彰宏、大塚俊之、宮地均、影山龍一郎. マウス発生過程における Notch リガンド Dll1 の発現ダイナミクスの意義, 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月 25-27 日.
6. 渡邊直希、大塚俊之、影山龍一郎. 大脳皮質形成期において Hbp1 は細胞周期進行の制御を介してニューロン分化のタイミングを制御する, 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月 25-27 日.
7. 磯村彰宏. 遺伝子発現リズムの動的応答の定量計測, 定量生物学の会 第七回年会, 福岡, 2015 年 1 月 11-12 日.
8. 磯村彰宏、小串典子、郡宏、影山龍一郎. 光遺伝学による遺伝子発現リズムの動的応答の定量計測. BMB2015, 神戸, 2015 年 12 月 1-4 日.
9. Tateya T, Sakamoto S, Imayoshi I, Kageyama R. In vivo overactivation of the Notch signaling pathway in the developing cochlear epithelium. BMB2015, 神戸, 2015 年 12 月 1-4 日.
10. Kobayashi K, Niino Y, Miyawaki A, Kageyama R. Quantification of synchronized oscillation in mouse segmentation clock. BMB2015, 神戸, 2015 年 12 月 1-4 日.
11. 荒木杏菜、今吉格、湊原圭一郎、金亮、川島尚之、影山龍一郎、尾藤晴彦、奥野浩行. 限定された時間枠における活性化細胞集団の持続標識法. BMB2015, 神戸, 2015 年 12 月 1-4 日.
12. 前田勇樹、磯村彰宏、影山龍一郎. オプトジェネティクスを用いた Hes1 の発現振動による細胞周期制御メカニズムの解析. BMB2015, 神戸, 2015 年 12 月 1-4 日.
13. 大塚俊之、影山龍一郎. Hes1 強制発現により大脳皮質ニューロン産生が遷延し生後脳における神経幹細胞プールが増大する. BMB2015, 神戸, 2015 年 12 月 1-4 日.
14. 渡邊直希、影山龍一郎、大塚俊之. 大脳皮質形成期において Hbp1 は細胞周期の長さを延長することによってニューロン分化のタイミングを制御する. BMB2015, 神戸, 2015 年 12 月 1-4 日.
15. 杉村佳織、郡宏. 平面内細胞極性を示す数理モデルの構築. 日本物理学会第 71 回年次大会, 仙台, 2016 年 3 月 20 日
16. Kobayashi K, Niino Y, Miyawaki A, Kageyama R. Single-cell quantification of mouse segmentation clock. The 10<sup>th</sup> Notch Meeting. 三島, 2016 年 10 月 5-6 日
17. 小林久美子、新野祐介、宮脇敦史、影山龍一郎. 分節時計遺伝子 Hes7 の発現同期機構の解明 第 28 回高遠・分子細胞生物学シンポジウム、高遠、2016 年 8 月 25-26 日.
18. 前田勇樹、影山龍一郎. オプトジェネティクスを用いた Hes1 の発現振動による細胞周期制御メカニズムの解析 第 28 回高遠・分子細胞生物学シンポジウム、高遠、2016 年 8 月 25-26 日.
19. Ohtsuka T, Bansod S, Kageyama R. Hes5 regulates the transition timing of neurogenesis and gliogenesis in neocortical development via downregulation of *Hmga* genes. 第40回日本神経科学大会, 幕張, 2017 年 7 月 20-23 日.
20. Araki A, Minatohara K, Akiyoshi M, Imayoshi I, Kim R, Kawashima T, Bito H, Kageyama R, Okuno H. Reactivation of a neuronal subpopulation during memory recalls in the dentate gyrus of the hippocampus. 第 9 回光操作研究会, 仙台, 2017 年 10 月 21-22 日.

#### (4)知財出願

##### ①国内出願 (1件)

1. 発明の名称:幹細胞の増殖と分化の光遺伝学的制御方法、発明者:影山龍一郎・

磯村彰宏・今吉格、出願人：国立大学法人京都大学、出願日：2013.9.18、出願番号：2013-193582

②海外出願（1件）

1. 発明の名称：幹細胞の増殖と分化の光遺伝学的制御方法、発明者：影山龍一郎・磯村彰宏・今吉格、出願人：国立大学法人京都大学、出願日：2014.9.17、出願番号：PCT/JP2014/074458

③その他の知的財産権

(5)受賞・報道等

①受賞

1. 播磨有希子(影山 G)：第20回東アジアジョイントシンポジウム・TOMY賞1等賞、2013年11月8日
2. 今吉格(影山 G)：ドイツ・イノベーション・アワード「ゴットフリード・ワグネル賞 最優秀賞」、2014年6月18日
3. 影山龍一郎：平成27年度文部科学大臣表彰 科学技術賞研究部門、2015年4月15日
4. 今吉格(影山 G)：平成27年度日本神経科学会奨励賞、2015年7月
5. 小林久美子(影山 G)：第22回東アジアジョイントシンポジウム・TOMY賞、2015年11月13日
6. 影山龍一郎：平成28年度時実利彦記念賞、2016年7月
7. 今吉格(影山 G)：ジョセフ・アルトマン記念発達神経科学賞、2017年7月
8. 影山龍一郎：第49回内藤記念科学振興賞、2018年3月20日

②マスコミ(新聞・TV等)報道

1. Hes7 遺伝子のイントロン削減による分節時計の加速化（京都大学においてプレス発表）：京都新聞 2012年12月7日、科学新聞 2013年1月1日  
概要：Hes7 遺伝子のイントロン削減による分節時計の加速化した結果、頸椎骨が本来7個であるのに対して、9個に増加した。これらの結果は、本来意義の分かっていたいなかったイントロンに、発現のタイミングを正確に決めるという重要な役割があることを明らかにした。
2. 多分化能と運命決定における神経分化決定遺伝子のダイナミックな制御（京都大学においてプレス発表）：京都新聞、毎日新聞、日刊工業新聞、日本経済新聞、2013年11月1日；科学新聞、2013年11月22日；読売新聞、2014年2月24日；毎日放送テレビ、2013年11月1日放映  
概要：神経幹細胞の状態と分化時で分化決定因子の発現パターンが変わることを見出した。さらに、光遺伝学的手法を用いることによって、分化決定因子は発現が持続すると細胞分化に働くが、発現が振動すると幹細胞の状態を維持することを明らかにした。この技術によって光の照射パターンを変えるだけで、神経幹細胞を維持したり、ニューロン分化を誘導したりすることが可能になり、神経再生医療への応用が期待された。
3. 2017年度内藤記念科学振興賞決定について：科学新聞、2018年2月16日；化学工業日報、2018年2月21日；日刊工業新聞 2018年2月23日

③その他

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

<公開可能なもの>

②社会還元的な展開活動

- 得られた成果である光遺伝学的遺伝子発現制御技術について、iCeMS International Symposium “Light Control in Cell Biology”を開催して発表し、観客 120 名を集めた。
- iCeMS カフェにおいて、約 30 名の一般の方を対象にわかりやすく研究成果を紹介した。
- JST 数学キャラバンにおいて、主に高校生を対象とした一般向け講演会を2回開催した。それぞれ約 100 名の参加があった。
- 本研究成果をインターネット  
(URL: <http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/Kageyama/index.html>)で公開し、一般に情報提供している。

## § 5 研究期間中の活動

### 5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2013年8月11日	iCeMS カフェ	京都大学	30人	一般の方を対象にしたアウトリーチ活動。影山が細胞リズムについて解説した。
2014年6月12日～13日	iCeMS International Symposium “Light Control in Cell Biology”	京都大学	120人	光遺伝学的制御技術を利用した最先端研究に関する国際シンポジウムを影山がオーガナイズした。
2014年8月9日	JST 数学キャラバン	北海道大学	100人	アウトリーチ。主に高校生を対象とした一般向け講演会で郡が講演を行った。 <a href="http://www.mmc.es.hokudai.ac.jp/sympo2014/">http://www.mmc.es.hokudai.ac.jp/sympo2014/</a>
2014年11月29日	JST 数学キャラバン	水戸第二高等学校	100人	アウトリーチ。主に高校生を対象とした一般向け講演会で郡が講演を行った。 <a href="http://nonlinear.s.chiba-u.jp/carabanMito/">http://nonlinear.s.chiba-u.jp/carabanMito/</a>
2016年12月17日	世界トップレベル研究拠点プログラム10周年記念講演会	文部科学省	600人	
2017年10月1日	JST 数学キャラバン@気仙沼	気仙沼中央公民館	50名	高校生を対象とした啓蒙活動。郡(お茶の水女子大)が企画。JST の支援を受けている。 <a href="http://www.ocha.ac.jp/event/20170706_1.html">http://www.ocha.ac.jp/event/20170706_1.html</a>

## § 6 最後に

上述のように、研究は順調に進んだ。今後は、今まで開発してきた光遺伝学的技術を使って、成体脳に内在する静止期の神経幹細胞に遺伝子発現振動を誘導して、静止状態から活性化状態に移す技術を長期間に渡って維持できるかどうかを調べる予定である。これらの成果や技術は、本研究領域の戦略目標である「生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出」とも非常に良く合致し、脳再生医療にも応用できるので、社会的にも大きなインパクトがあると考えられる。

一方、今まであまりダイナミックな変化は想定されていなかった *Dll1* の発現が体節形成過程や神経発生過程で発現振動すること、さらにその発現のタイミングを加速化あるいは遅延化すると振動が減弱すること、その結果、*Hes1* や *Hes7* の発現振動も減弱して体節形成や神経発生に大きな異常が起こることが分かった。これらの結果は、生物学研究者にとっては直感的には理解しにくいですが、数理モデルからは見事に予測できており、数理モデル構築の重要性が示された。この数理モデルは影山 G と郡 G とが頻りに議論を交わすうちに生み出されたもので、単純ではあるが非常に示唆に富むものである。このように、実験チームと数理モデルチームは非常にうまく連携し、成果をあげることができた。



影山 G の集合写真(2016年4月撮影)