

論文内容の要旨

申請者氏名 佐野坂 司

哺乳類中枢神経系を構成するニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトは、共通の神経幹細胞から分化・産生されるが、神経幹細胞の各細胞種への分化能獲得は時空間的に厳密に制御されていることが知られている。神経幹細胞のアストロサイト分化においては、転写因子 STAT3 の活性化と DNA のメチル化といったエピジェネティックなゲノム修飾が重要な役割をはたしている事が知られている。しかし、この神経幹細胞の発生段階依存的な DNA メチル化制御機構については未だ不明な点が多い。また、このようなエピジェネティクス変動を伴った神経幹細胞の多分化能獲得に、どのような転写調節因子群が関与しているかについてはほとんど明らかにされていない。

そこで申請者は、アストロサイトへの分化能を獲得した胎生後期の神経幹細胞と、獲得していない胎生中期神経幹細胞において、特異的に発現している遺伝子を DNA マイクロアレイ解析により比較することで、アストロサイト分化抑制能を担う因子 (N-myc, Hmga2) を同定した。これらの因子は、アストロサイトへの分化抑制作用を示すものの、メチル化状態には影響を与えていないことが分かり、神経幹細胞のアストロサイト分化制御において DNA メチル化以外の制御機構の存在が示唆された。

一方で、神経幹細胞のアストロサイトへの分化には、アストロサイト特異的遺伝子の脱メチル化が必須である。申請者はこの脱メチル化が、細胞間情報伝達分子である Notch によって誘導されることを波平助教らと共同で報告した。しかし、この際重要な役割を担う Notch シグナルは神経幹細胞のアストロサイトへの分化能の獲得を促すのみであり、最終的にアストロサイトへの分化を誘導するシグナルがどこから来るのかについては解明されていない。アストロサイトへの分化能を獲得した胎生後期の神経幹細胞は放射状 (ラジアル) グリアという形態をとり、ラジアルファイバーを伸ばして髄膜に接しているが、髄膜形成不全のマウスではラジアルグリアの形成に異常が起ることや神経幹細胞の増殖が減少することから、髄膜がラジアルグリアに作用している可能性が示唆されている。申請者は、髄膜と胎生後期神経幹細胞を共培養した結果、髄膜と共培養した神経幹細胞においてはアストロサイト分化が誘導されることを発見した。また、髄膜の培養上清を用いた場合にも神経幹細胞のアストロサイト分化が観察されたため、髄膜細胞が分泌している因子が重要であると考えられた。Gfap プロモーター用いたルシフェラーゼアッセイを行ったところ、培養上清によりプロモーター活性の上昇が確認された。一方、優性抑制型 STAT3 及び IL-6 ファミリーサイトカインの共通信号伝達受容体である gp130 の特異的阻害抗体によってその効果が抑制された。IL-6 ファミリーサイトカインの発現量を定量的 PCR 法により解析した結果、髄膜細胞が LIF, CNTF, CLC 等を発現している事が分かり、髄膜細胞が分泌している IL-6 ファミリーサイトカインがラジアルグリアに作用し、最終的なアストロサイトへの分化を誘導している可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 佐野坂 司

神経幹細胞は自己複製能を持つと共に、中枢神経系を構成する主要細胞種であるニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの多分化能を持った細胞である。神経幹細胞の各細胞種への分化はサイトカイン等の細胞外因子や DNA のメチル化といった細胞内在性プログラムによって厳密に制御されている。申請者は、神経幹細胞のアストロサイト分化に注目し、神経幹細胞のアストロサイト分化能獲得及び最終的にアストロサイトへ分化するまでの機構を、①細胞内在性プログラムと②細胞外因子の両方の視点から解析を行った。

①細胞内在性プログラムによる制御：神経幹細胞はアストロサイト特異的遺伝子プロモーターが脱メチル化されることによってアストロサイトへの分化能を獲得する事が知られているが、その際変動する DNA メチル化はゲノム全体でどの程度変化するのか分かっていない。神経幹細胞の性質変化を正確に捉えるためには、ゲノム全体における DNA メチル化変動と、それに伴って変化する遺伝子発現を網羅的に解析する必要がある。申請者は、発生段階依存的な性質変化を詳細に捉えるために、神経幹細胞で特異的発現が見られる Sox2 遺伝子のプロモーター制御下に GFP を組み込んだ Sox2-GFP トランスジェニックマウスを用いて解析を行った。各胎生期マウス脳より GFP の蛍光を指標に神経幹細胞を単離後ゲノム DNA を回収し、既にメチル化状態が変動することが知られている Gfap プロモーターのメチル化解析を行った。その結果、胎生中期では高頻度メチル化されているものの発生進行に伴い脱メチル化が生じ、出生後 3 日目においてはほとんど脱メチル化されていることが分かり、実際に生体内でも DNA メチル化というエピジェネティックな修飾が関与していることが示唆された。このトランスジェニックマウスを用いて、各胎生期神経幹細胞における遺伝子発現の変化をマイクロアレイ法によって網羅的に解析するとともに、DNA メチル化状態を bisulfite shotgun sequence (BSS) 法にてゲノムワイドに解析している。

②細胞外因子による制御：神経幹細胞のアストロサイト分化は、アストロサイト特異的発現遺伝子 Gfap の発現制御機構の解明から転写因子 STAT3 の活性化が必須であることが分かっているが、生体内で STAT3 を活性化する IL-6 ファミリーサイトカインがどこから分泌されているのか分かっていない。申請者は脳を覆っている髄膜に着目して実験を行い、髄膜と神経幹細胞の共培養の結果、髄膜が神経幹細胞のアストロサイト分化を誘導することを発見した。髄膜培養上清 (CM) でも同様の作用が観察されたため、髄膜 CM が Gfap を活性化する作用があるかどうかを Gfap プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイにより検討した結果、髄膜 CM によりプロモーター活性の上昇が観察された。このプロモーター活性は優性抑制型 STAT3 及び gp130 特異的阻害抗体により抑制されたため、髄膜 CM の作用が IL-6 ファミリーサイトカインであることが示唆された。実際に髄膜細胞が IL-6 ファミリーサイトカインを高発現していることが定量的 PCR 法により確認され、神経幹細胞が最終的にアストロサイトへ分化する際に、髄膜から分泌された IL-6 ファミリーサイトカインが作用している可能性が示唆された。

以上のように、本論文は神経幹細胞のアストロサイト分化能獲得機構の解明及びアストロサイト分化を誘導する IL-6 ファミリーサイトカイン発現細胞の同定を行っており、神経幹細胞のアストロサイト分化能獲得から最終的な分化といった一連の流れを説明するもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。