

(論文内容の要旨)

神経幹細胞 (neural stem cell: NSC)は未分化状態を保持したまま増殖する事が出来る‘自己複製能’およびニューロンとグリア細胞に分化することが出来る‘多分化能’を併せ持つ細胞である。この NSC の生存・増殖・分化は、サイトカインやニッチ等の細胞外環境因子によって制御されていることが知られている。脳内の免疫担当細胞であるミクログリアは、脳内の環境変化に応じて様々なサイトカインを放出することから、NSC の挙動に対して影響を与えていると考えられているが、その役割に関しては不明な点が多い。一方、NSC は、細胞外の要因のみならず、細胞内在性のプログラムによってもその増殖・分化が制御されており、それらのプログラムの破綻は過形成や悪性化の原因になると考えられている。従って、いかなる内在性プログラムの破綻が NSC の増殖・分化異常を招き、腫瘍化を誘導するか、更にミクログリアによる細胞外環境変化は NSC と NSC を起点として発生した腫瘍にどのような影響を与えるかについて明らかにすることは、脳腫瘍の病態解明および NSC を用いた再生医療の最適化に有用であると考えられる。本研究において著者は、1) ミクログリアによる NSC の増殖・分化制御機構の検討、2) 癌遺伝子 H-RasV12、c-myc を用いた NSC の形質転換の試み、3) 誘導した脳腫瘍に対するミクログリアの役割について検討を行ない、以下の新知見を得た。

## 第一章 ミクログリアによる NSC の増殖・分化制御

まず NSC の増殖に対するミクログリアの影響を検討するため、NSC 増殖培地のミクログリア条件培地であるミクログリア conditioned-proliferation medium にて NSC をインキュベートした。その結果、コントロール群に比べ NSC の BrdU 取り込み量と細胞数に有意な差は認められず、ミクログリアより分泌される液性因子は NSC の増殖に影響を与えないことが示唆された。次に、NSC の分化に対する影響を検討するため、NSC 分化培地のミクログリア条件培地であるミクログリア conditioned-differentiation medium (CDM)にて NSC をインキュベートした。すると、TUJ1 陽性のニューロンへの分化が抑制され、glial fibrillary acidic protein (GFAP)陽性のアストロサイトへの分化が促進された。この CDM の作用は Janus kinase 2 (JAK2) の阻害薬 AG490 や signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)阻害ペプチドにより完全に抑制され、mitogen activated protein kinase kinase (MAPK kinase)阻害薬である PD98059 により部分的に抑制された。次に、CDM 中に存在する因子を同定する目的で、JAK-STAT 経路を介してアストロサイトへの分化を促進する interleukin-6 (IL-6)、leukemia inhibitory factor (LIF)、ciliary neurotrophic factor に対する中和抗体の効果を検討した。すると、IL-6 と LIF の中和抗体により CDM の作用が有意に抑制された。最後に、RT-PCR により、ミクログリアにおいて IL-6 と LIF が発現していることが確認された。以上の結果より、ミクログリアは IL-6 と LIF 分泌し、JAK-STAT 経路と MAPK 経路を介して NSC のアストロサイトへの分化を促進していることが明らかとなった。

## 第二章 癌遺伝子 H-RasV12 と c-myc による NSC の形質転換

癌遺伝子 Ras と myc は様々な細胞の増殖・分化に深く関わっていることが知られ

ている。今回、我々は、野生型マウスまたは *Ink4a/Arf*<sup>-/-</sup>マウスより取り出した NSC に活性型変異体 H-RasV12 又は c-myc を過剰発現させることにより、脳腫瘍モデルの作製を試みた。まず、野生型 NSC に H-RasV12 又は c-myc を過剰発現させ、マウス前脳に移植したところ、移植後 20 週を経過しても脳腫瘍は発生しなかった。次に、*Ink4a/Arf*<sup>-/-</sup> NSC に H-RasV12 を過剰発現させマウス前脳に移植したところ、移植後 4 週目に脳腫瘍が発生し、病理組織学的検討の結果、ネクローシス、巨細胞形成、血管周囲の細胞増生という典型的な Grade IV グリオーマ、即ち多型性神経膠芽腫 (Glioblastoma multiform: GBM) の病理像を呈していることが明らかとなった。この GBM は神経幹細胞マーカー nestin 陽性であり、分化マーカーである TUJ1、GFAP 陰性であったことから、未分化性の高い GBM であることが示唆された。一方、*Ink4a/Arf*<sup>-/-</sup> NSC に c-myc を過剰発現させたところ、移植後 9 週目に脳腫瘍が発生した。この脳腫瘍は、病理組織学的検討の結果、原始神経外胚葉性腫瘍 (Primitive neuroectodermal tumor: PNET) であることが明らかとなった。以上の結果により、NSC は、異なる遺伝子変異の組み合わせにより病理学的に異なる腫瘍を発生することが明らかになった。

### 第三章 GBM 悪性維持におけるミクログリアの関与

GBM の腫瘍内部と周辺部に活性化したミクログリアが集積していることが知られているが、その役割に関しては不明な点が多い。そこで、前章で作成した H-RasV12 による GBM モデルマウスを用いて GBM におけるミクログリアの役割を解析した。まず、免疫組織化学により、この GBM の腫瘍内部と周辺部にも活性化したミクログリアが集積していることが明らかとなった。次に、GBM におけるミクログリアの機能解析を行うため、ミクログリアの活性化を抑制するミノサイクリンはこの GBM モデルマウスに投与し、検討を行なった。すると、ミノサイクリン用量依存的に、巨細胞の増加が確認され、また巨細胞の一部は GFAP 陽性になり、分化傾向を示した。更に、ミノサイクリン 100 mg/kg 投与群においては大部分の腫瘍が脱落し、腫瘍の浸潤低下も確認された。以上の結果より、GBM の悪性維持にはミクログリアの活性化が重要であることが示唆された。

以上、著者は、ミクログリアは NSC の増殖には影響を与えないが、IL-6 と LIF を分泌し、JAK-STAT 経路と MAPK 経路を介してアストロサイトへの分化を促進することを見出した。また、*Ink4a/Arf*<sup>-/-</sup> NSC に H-RasV12 を強制発現させることにより GBM が発生すること、一方 c-myc を強制発現させることにより PNET が発生することを明らかにした。さらに、この H-RasV12 による GBM モデルマウスにおいて、ミクログリアの活性化を抑制することにより、GBM が悪性状態を維持できなくなることを明らかにした。本研究の成果は NSC を用いる再生医療の最適化、GBM と PNET の発生機構および病態の解明に寄与するものであり、新たな治療法の開発など臨床応用に結びつく有用な基礎的知見を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

神経幹細胞 (neural stem cell: NSC)は未分化状態を保持したまま増殖することができる‘自己複製能’およびニューロンとグリア細胞に分化することが出来る‘多分化能’を併せ持つ細胞である。いかなる内在性プログラムの破綻が NSC の増殖・分化異常を招き、腫瘍化を誘導するか、さらにミクログリアによる細胞外環境変化は NSC と NSC を起点として発生した腫瘍にどのような影響を与えるかについて明らかにすることは、脳腫瘍の病態解明および NSC を用いた再生医療の最適化に有用であると考えられる。本研究において申請者は、1 ミクログリアによる NSC の増殖・分化制御機構の検討、癌遺伝子 H-RasV12、c-myc を用いた NSC の形質転換の試み、および誘導した脳腫瘍に対するミクログリアの役割について検討を行ない、以下の新知見を得た。

第一章 ミクログリアによる NSC の増殖・分化制御

NSC の増殖に対するミクログリアの影響を検討するため、NSC 増殖培地のミクログリア条件培地であるミクログリア conditioned-proliferation medium にて NSC をインキュベートした。その結果、ミクログリアより分泌される液性因子は NSC の増殖に影響を与えないことが示唆された。一方、NSC 分化培地のミクログリア条件培地であるミクログリア conditioned-differentiation medium (CDM)にて NSC を培養すると、TUJ1 陽性のニューロンへの分化が抑制され、glial fibrillary acidic protein (GFAP)陽性のアストロサイトへの分化が促進された。CDM の作用は Janus kinase 2 (JAK2)の阻害薬や signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)阻害ペプチドにより完全に抑制され、mitogen activated protein kinase kinase (MAPK kinase)阻害薬により部分的に抑制された。CDM 中に存在する因子を同定する目的で interleukin-6 (IL-6)、leukemia inhibitory factor (LIF)、ciliary neurotrophic factor に対する中和抗体の効果を検討したところ、IL-6 と LIF の中和抗体により CDM の作用が抑制された。以上の結果より、ミクログリアは IL-6 と LIF 分泌し、JAK-STAT 経路と MAPK 経路を介して NSC のアストロサイトへの分化を促進していることが明らかとなった。

第二章 癌遺伝子 H-RasV12 と c-myc による NSC の形質転換

癌遺伝子 Ras と myc は様々な細胞の増殖・分化に深く関わっていることが知られている。申請者は、野生型マウスまたは Ink4a/Arf<sup>-/-</sup>マウスより取り出した NSC に活性型変異体 H-RasV12 又は c-myc を過剰発現させることにより、脳腫瘍モデルの作製を試みた。野生型 NSC に H-RasV12 又は c-myc を過剰発現させ、マウス前脳に移植したところ、移植後 20 週を経過しても脳腫瘍は発生しなかった。Ink4a/Arf<sup>-/-</sup> NSC に H-RasV12 を過剰発現させマウス前脳に移植したところ、移植後 4 週目に脳腫瘍が発

生し、ネクローシス、巨細胞形成、血管周囲の細胞増生という典型的な Grade IV グリオーマ、即ち多型性神経膠芽腫 (Glioblastoma multiform: GBM) の病理像を呈すした。一方、*Ink4a/Arf*<sup>-/-</sup> NSC に *c-myc* を過剰発現させたところ、移植後 9 週目に脳腫瘍が発生した。この脳腫瘍は、病理組織学的検討の結果、原始神経外胚葉性腫瘍 (Primitive neuroectodermal tumor: PNET) であることが明らかとなった。以上の結果により、NSC は、異なる遺伝子変異の組み合わせにより病理学的に異なった腫瘍を発生することが明らかになった。

### 第三章 GBM 悪性維持におけるミクログリアの関与

前章で作成した *H-RasV12* による GBM モデルマウスを用いて GBM におけるミクログリアの役割を解析した。免疫組織化学により、この GBM の腫瘍内部と周辺部にも活性化したミクログリアが集積していることが明らかとなった。ミノサイクリンの用量依存的に、巨細胞が増加し、巨細胞の一部は GFAP 陽性になり、分化傾向を示した。さらに、ミノサイクリン (100 mg/kg) 投与群においては大部分の腫瘍が脱落し、腫瘍の浸潤低下も確認された。以上の結果より、GBM の悪性維持にはミクログリアの活性化が重要であることが示唆された。

以上、申請者は、ミクログリアは NSC の増殖には影響を与えないが、IL-6 と LIF を分泌し、JAK-STAT 経路と MAPK 経路を介してアストロサイトへの分化を促進することを見出した。さらに、*Ink4a/Arf*<sup>-/-</sup> NSC に *H-RasV12* を強制発現させることにより GBM が発生すること、*c-myc* を強制発現させることにより PNET が発生することおよび、ミクログリアの活性化を抑制することにより GBM が悪性状態を維持できなくなることを明らかにした。本研究の成果は NSC を用いる再生医療の最適化、GBM と PNET の発生機構および病態の解明に寄与するものであり、新たな治療法の開発など臨床応用に結びつく有用な基礎的知見を提供するものである。

よって本論文は博士 (薬学) の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成 21 年 2 月 23 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。