

氏 名	おのの 大 野 まこと 誠
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3132 号
学位授与の日付	平 成 19 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Neuropoietin induces neuroepithelial cells to differentiate into astrocytes via activation of STAT3 (新規 IL-6 ファミリーサイトカイン Neuropoietin による神経幹細胞におけるアストロサイト分化誘導の研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 影 山 龍 一 郎 教 授 中 辻 憲 夫 教 授 高 橋 良 輔

### 論 文 内 容 の 要 旨

背景と目的：神経幹細胞は自己複製能を持つと同時に中枢神経を構成するニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトへの多分化能を保持した細胞である。

神経幹細胞からアストロサイトへの分化においては白血病抑制因子 (leukemia-inhibitory factor: LIF) 等の Interleukin (IL) -6 ファミリーサイトカインが重要な役割を果たすことが知られている。従来の研究により IL-6 ファミリーサイトカインが転写因子 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) の活性化を介してグリア線維性酸性タンパク質 (glia fibrillary acidic protein: GFAP) 等のアストロサイト特異的遺伝子の発現を誘導し神経幹細胞からアストロサイトへの分化を制御することが明らかにされている。

Neuropoietin (NP) は最近新たに同定された IL-6 ファミリーに属するサイトカインで、胎生期マウスの脳室周囲、嗅球、網膜に局限した発現パターンを示すことが報告されている。胎生期マウス脳室周囲には多数の神経幹細胞が存在することから、胎生期の神経幹細胞からアストロサイトへの分化過程において岬が関与する可能性が考えられた。

そこで本研究は NP による神経幹細胞からアストロサイトへの分化誘導能の検討とその分化制御機構を解明することを目的とした。

方法：胎生 14.5 日目のマウス終脳から神経幹細胞を含む未分化な神経上皮細胞を調整し、神経幹細胞の自己増殖を促進する塩基性線維芽細胞増殖因子存在下で 4 日間単層培養を行い増殖・濃縮させた後、播きなおして各種のアッセイに用いた。アストロサイトへの分化誘導能は抗 GFAP 抗体を用いた免疫染色にて検討した。STAT3 の活性化は抗リン酸化 STAT3 抗体を用いたウェスタンブロットにて検討した。GFAP 遺伝子のプロモーター活性は GFAP 遺伝子の転写開始点から上流約 2.5kb の範囲を GFAP 遺伝子プロモーターとしてルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだものをレポーターとしたルシフェラーゼアッセイにて検討した。STAT3 の GFAP 遺伝子プロモーター上の STAT3 認識配列への結合は抗 STAT3 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法にて検討した。

結果：マウス胎仔終脳由来神経上皮細胞培養系に NP を添加すると、GFAP 陽性細胞の発現が観察され、NP によるアストロサイトへの分化誘導が認められた。また NP により STAT3 のリン酸化が誘導され、STAT3 が活性化されることを確認した。NP により GFAP 遺伝子プロモーターが活性化されるが、STAT3 の優性抑制型変異体を強制発現させた場合あるいは GFAP 遺伝子プロモーター領域の STAT3 認識配列に変異をいれた場合にはこの NP による GFAP 遺伝子プロモーターの活性化が阻害された。また NP により内在性 STAT3 の GFAP 遺伝子プロモーター上の STAT3 認識配列への結合が誘導された。さらに NP は胎仔脳に発現していることが知られている Bone morphogenetic protein2 (BMP2) と協調的にアストロサイト分化を誘導することを認めた。

結論：NP は STAT3 の活性化を介した神経幹細胞のアストロサイトへの分化誘導能を持つことが示された。本研究結果から、発生段階の脳において NP は他の IL-6 ファミリーサイトカインや BMP 等と協調して神経幹細胞のアストロサイト分化

を制御する可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

Neuropoietin は近年新規インターロイキン-6 ファミリーサイトカインとして同定され、胎仔脳室周囲に高発現することが報告されている。この領域には多数の神経幹細胞が存在すること及び他のインターロイキン-6 ファミリーサイトカインが神経幹細胞からアストロサイトへの分化を誘導することが知られていることから、今回 Neuropoietin のアストロサイト分化過程における関与を検討した。

マウス胎仔神経前駆細胞を Neuropoietin にて刺激すると a ストロサイトへの分化が観察された。また Neuropoietin により転写因子 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) の活性化が誘導された。さらに STAT3 の優性抑制型変異体を強制発現させた場合、あるいはアストロサイト特異的グリア線維性酸性タンパク質遺伝子プロモーター領域の STAT3 認識配列に変異を導入した場合、Neuropoietin によるそのプロモーターの活性化が阻害された。

これらのことから Neuropoietin は STAT3 の活性化を介してアストロサイト分化制御に関与する可能性が示唆された。

本研究は胎生期脳における神経幹細胞からアストロサイトへの分化に関与する新たなサイトカインを報告したものであり、中枢神経発生メカニズムの解明に寄与するところが大きいと考える。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 19 年 3 月 19 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。