

氏名	なかのいちろう 中野伊知郎
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	論医博第1947号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) regulates multipotent neural progenitor proliferation. (Maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) の神経幹細胞における発現と機能に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 高橋良輔 教授 福山秀直 教授 瀬原淳子

論文内容の要旨

中枢神経系の幹細胞は、胎生脳の脳室周囲と、成体脳の subventricular zone (SVZ)、海馬に局在している。そのうち SVZ の幹細胞は neurosphere 法によって単離培養することが可能であり、様々な遺伝子の幹細胞での機能解析においてこの系が広く使われている。当論文は、この neurosphere 法を用いて、神経幹細胞に発現が高い遺伝子群をより多く単離することを目的に、representative difference analysis という PCR と cDNA microarray を組み合わせたスクリーニングの上で、in situ hybridization を用いた生体内での発現解析による段階的スクリーニングを行った。その上で、その結果を embryonic stem cell や血球系幹細胞に発現する遺伝子群と比較することで、より広いカテゴリーの幹細胞に特異的に高発現する遺伝子群を単離した。この段階的スクリーニングから、多種の幹細胞にわたって高発現し、かつ脳内で幹細胞の局在する脳室周囲に発現が特異的に見られるものとして最終的に同定された遺伝子の一つが、maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) である。

MELK は 1997 年に他グループによって unovulated egg 等から単離された、serine/threonine kinase を N 末にもつ AMPK/snf1 family に属する遺伝子である。この family には AMPK, ARK, SNARK などの遺伝子が属し、いずれも転写因子 LKB1 の下流に位置する tumor survival factor と考えられているが、唯一例外の MELK については、シグナル伝達系、機能共にこれまでほとんど報告がなかった。当論文は、神経系、血球系、および胎生幹細胞に高発現するこの遺伝子について、transgenic reporter mice を作成しその発現を、また強制発現と RNAi での選択的発現抑制によって neurosphere 法を用いた神経系幹細胞での機能を解析した。

まず、MELK の発現を制御するゲノムにおけるプロモーター領域を同定単離し、培養系を用いて MELK 発現細胞が高率に神経幹細胞に局在する事を見いだした。また、バーナム研究所の DR. Terskikh の研究室との共同研究によって作製した Transgenic mice は GFP によって認識される MELK 発現細胞が少なくとも脳内では in situ hybridization の結果と相関する事を確認した。続いて行った FACS の実験、つまり脳内から GFP の発現によって単離された MELK 陽性細胞には、高率に neurosphere initiating cell である神経幹細胞が局在し、陰性細胞にはないことが分かった。また、上に記した方法による機能解析によって、MELK が発現する神経幹細胞の自己複製を制御することが分かった。

以上より、MELK は神経幹細胞に発現し、その自己複製を制御する遺伝子である事が判った。神経幹細胞に発現するとして過去に報告された nestin や sox2, Msi1 などの遺伝子と比較しても、MELK が幹細胞により特異的に発現することも見いだされている。偶然だが、当報告と時期を同じくして、他グループからも、この遺伝子が血球系細胞の発生にも重要であるとの報告が出ている。

論文審査の結果の要旨

中枢神経系の幹細胞は、胎生期から成体まで脳室周囲と海馬に局在し、脳神経系の形成と可塑性に重要な役割を持つとさ

れている。神経幹細胞の自己複製のメカニズム解明を目的に、幹細胞に発現する遺伝子群を単離するため、cDNAmicroarray embryonic leucine-zipper kinase (MELK) である。MELKはAMPK/snf1 familyに属する遺伝子だが、これまでそのシグナル伝達系や機能は共にほとんど報告がなかった。

本研究では、マウスゲノムにおけるMELKの発現を制御するプロモーター領域を同定単離し、MELK発現細胞がgreen fluorescent proteinをリポーターとして発現するよう設計したtransgenic mouseを作製した。この解析の結果、MELKが脳室周囲において神経幹細胞に特異的に発現することを明らかにした。

また、神経幹細胞での機能解析を目的に強制発現とRNA阻害の手法を用いることで、MELKが神経幹細胞の自己複製を制御することを示した。その上で、MELKのシグナルは癌原遺伝子であるB-MYBに対して直接働き、癌抑制遺伝子PTENのシグナル伝達系とその直接の関係がないことが示唆された。以上より、MELKは神経幹細胞に発現し、その自己複製を制御する遺伝子であると結論付けた。

以上の研究は、ヒト脳内にも存在する神経幹細胞の自己複製を制御するメカニズムの解析に貢献し、今後の神経再生治療や癌治療への応用に寄与するところが多い。

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20年1月22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。