

京都大学	博士（医学）	氏名	上谷 大 介
論文題目	Intrinsic transition of ES cell differentiation into neural progenitors (ES細胞から神経前駆細胞への内因的分化機構)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文では、ES細胞から神経前駆細胞への分化を制御する分子メカニズムの解明を目的として以下の解析を行なった。まず、In vitroにおいてES細胞を効果的に神経分化させるSFEB (Serum-free Floating culture of Embryoid Body-like Aggregates) 法を用いて、マウスES細胞を神経前駆細胞へと分化させ、その際に神経分化に伴い発現が上昇する遺伝子をDNA-microarrayを用いてスクリーニングを行った。その結果、ES細胞から神経前駆細胞への分化過程において発現が有意に上昇する109個の遺伝子が同定された。そのうち29個の遺伝子が神経前駆細胞に特異的な発現を示すことが判明した。</p> <p>この29個の遺伝子のcDNAをクローニングし、マウスES細胞に強制発現させたところ、その1つのZfp521が強い神経分化促進活性を有することが明らかとなった。例えば、神経分化を強く抑制する因子である牛胎児血清やBMP4を含む培地でマウスES細胞を培養した場合にも、Zfp521の強制発現により神経分化を誘導できることが観察された。Zfp521は核内に局在するmultiple-zinc finger因子をコードし、その発現はin vitro分化系において、神経分化とともに上昇する。また、マウス初期胚においては、神経上皮細胞にその発現が認められた。</p> <p>次に、Zfp521が神経分化に必須であるかどうかを検討するため、Zfp521の機能阻害実験を行った。shRNAによりZfp521が抑制されたES細胞では、SFEB法での神経分化が抑制され、Zfp521は多能性細胞から神経前駆細胞への分化に必須な因子であることが明らかになった。このin vitro神経分化培養系において、Zfp521の発現が抑制されたため神経分化が阻害されたES細胞でも、epiblast（胚盤上葉）細胞への分化は効率よく起こることから、Zfp521は少なくともepiblast以降の分化に必要であることが分かった。この細胞では内胚葉や中胚葉組織、あるいは表皮細胞への分化も正常に起こることが確認された。これらの結果から、Zfp521はepiblastより神経前駆細胞へと分化する段階に特異的に作用していることが明らかとなった。</p> <p>さらに、Zfp521の作用機序を検討した。クロマチン免疫沈降法によりZfp521が結合しているDNA領域を探索した結果、Sox3やPax6といった初期神経遺伝子のゲノム領域に結合することが分かった。また、Zfp521を強制発現させると、Sox3のプロモーター活性が上がることも明らかになった。タンパク免疫沈降法および機能阻害実験により、Zfp521はgeneral co-activatorであるp300と結合し、それらの協調作用が神経分化活性に必要であることが分かった。</p> <p>以上のことから、ES細胞から神経前駆細胞への分化の過程の中で、Zfp521は神経分化の初発過程に必須の制御因子であり、p300依存的な転写アクチベーターとして働くことが明らかとなった。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本研究では、多能性幹細胞から神経前駆細胞への分化段階を制御する機序を明らかにする事を目的として以下の解析を行った。まず、試験管内においてES細胞を効果的に神経分化させるSFEB (Serum-free Floating culture of Embryoid Body-like Aggregates) 法を用いて、マウスES細胞を神経前駆細胞へと分化させ、その際に神経分化に伴い発現が上昇する遺伝子をDNA-microarrayを用いてスクリーニングを行った。その結果、神経分化の初発段階に誘導される因子としてmultiple-zinc finger タンパク質Zfp521を同定した。

マウスES細胞の試験管内分化系を用いた解析から、Zfp521は神経分化促進活性を有しており、通常神経分化が起こらない牛胎児血清やBMP4を含む培養条件下においても、Zfp521の強制発現により神経分化を誘導できることが明らかとなった。

RNAi法による機能阻害実験の結果、Zfp521はマウス及びヒトES細胞の神経分化に必須であり、epiblastより神経前駆細胞へと分化する段階に特異的に作用していることが明らかとなった。さらに、Zfp521はSox3など神経前駆細胞特異的遺伝子のプロモーター領域に結合すること、また、転写co-activatorであるp300と複合体を形成し、転写活性化因子として働くことが判明した。

以上の研究は、脳発生の開始機序における分子メカニズムの解明に貢献し、神経細胞への選択的分化等の神経難病の再生医療の進展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23年 3月 8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。

要旨公開可能日： 年 月 日以降