

氏 名	おお つか とし ゆき 大 塚 俊 之
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2040 号
学位授与の日付	平 成 10 年 7 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	Regulated expression of neurogenic basic helix-loop-helix transcription factors during differentiation of the immortalized neuronal progenitor cell line HC2S2 into neurons (神経前駆細胞不死化細胞株HC2S2の神経分化におけるbasic helix-loop-helix型転写因子の発現制御に関する研究)
	(主査)
論文調査委員	教 授 野 田 亮 教 授 中 西 重 忠 教 授 橋 本 信 夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

中枢神経由来の不死化細胞株HC2S2の神経への分化過程における各種因子の発現を解析し、神経分化における経時的な遺伝子発現及びその制御に関して考察した。

HC2S2細胞はテトラサイクリンによりv-mycの発現が抑制されるレトロウイルスを用いて成熟ラットの神経前駆細胞を不死化したものであるが、テトラサイクリン投与により神経特異的因子の発現及び神経ネットワーク形成を伴う神経最終分化を誘導することが可能である。この系を用いて神経発生分化に重要なbasic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子の発現を中心に解析した。

bHLH型転写因子は細胞系譜の決定や最終分化において中心的役割を担っていることが次第に解明されてきている。近年ショウジョウバエの神経発生を制御しているbHLH型転写因子の哺乳類でのホモログがいくつか発見され解析されている。しかしながら、哺乳類の中枢神経系における神経前駆細胞から成熟神経細胞への最終分化過程を制御する分子機構には不明な点が多い。

今回Northern blotにより発現を検討した9種の神経特異的bHLH型転写因子のうち、MASH-1, NeuroD, NeuroD-related factor (NDRF) 及びHES-1 mRNAの発現がHC2S2細胞の分化過程を通じて認められた。Total RNAを用いた解析ではMASH-1, MATH-2, neurogenin, HES-3 及びHES-5の発現は認めなかった。

テトラサイクリン投与後の分化過程での経時的変化を見ると、神経分化抑制因子であるHES-1 mRNAはv-mycの抑制に伴い一過性に増加し、神経最終分化に伴い再び減少した。v-mycによる転写抑制のためのconsensus sequenceがHES-1転写開始領域に存在することから、未分化なHC2S2細胞においてはHES-1 mRNAの発現がv-mycにより抑えられており、その抑制解除により発現が誘導された可能性がある。

MASH-1 mRNAは分裂増殖中のHC2S2細胞において著明に発現し、免疫組織化学により細胞核内に蛋白発現を認めしたが、MASH-1 mRNAは3日後より発現が減少し、MASH-1蛋白も5日後には殆ど全細胞で発現が減弱していた。

NeuroDは神経最終分化の開始に、NDRFは一部成熟神経細胞にも発現しその形質の維持に関与すると考えられている。この系では分裂増殖中のHC2S2細胞にもNeuroD, NDRF mRNAの発現を認め、その発現は少なくともテトラサイクリン投与5日後まで減少せず持続した。NeuroD, NDRF mRNAはMASH-1と対照的に最終分化を遂げた神経細胞にも発現しており、in vivoにおいてMASH-1よりさらに分化の進んだ段階で発現が見られる事実に一致する。

これらの結果よりHC2S2細胞が成熟ニューロンに神経最終分化を遂げるためにはHES-1及びMASH-1の発現が抑えられる必要があり、NeuroD及びNDRFが最終分化を制御する過程に関与している可能性が示唆された。また、HC2S2細胞は

既に神経に運命決定されていると考えられ、v-mycがこれら神経特異的basic helix-loop-helix型転写因子の機能を制御して最終分化のプログラムを抑制している可能性が示唆された。v-myc発現が一旦抑制されると、これら神経特異的転写因子による最終分化のプログラムが、神経栄養因子等の細胞外因子の関与なしに速やかに進行すると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

中枢神経前駆細胞由来の不死化細胞株HC2S2細胞はテトラサイクリン投与によりv-mycの発現を抑制することで神経特異的因子の発現を伴う神経最終分化を誘導することが可能である。この分化過程における経時的な神経特異的basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子の発現を解析した。

Northern blotにより発現を検討した9種の神経特異的bHLH型転写因子のうち、MASH-1、NeuroD、NeuroD-relatedfactor (NDRF) 及びHES-1 mRNAの発現がHC2S2細胞の分化過程を通じて認められた。テトラサイクリン投与後、HES-1 mRNAはv-mycの抑制に伴い一過性に増加し、神経最終分化に伴い再び減少した。v-mycによる転写抑制consensus配列がHES-1転写開始領域に存在することから、v-mycの抑制解除により発現が誘導された可能性がある。

MASH-1 mRNAは分裂増殖中のHC2S2細胞において著明な発現を認めたが、3日後より発現が減少した。MASH-1が神経特異的因子に先行して発現し、神経特異的因子の発現を促進する分化因子として働き、神経最終分化後に減少することを示唆している。

NeuroD、NDRF mRNAは分裂増殖中のHC2S2細胞にも発現を認め、その発現は少なくともテトラサイクリン投与5日後まで減少せず持続した。

これらの結果よりHC2S2細胞が成熟ニューロンに神経最終分化を遂げるためにはHES-1及びMASH-1の発現が抑えられる必要があり、NeuroD及びNDRFが最終分化を制御する過程に関与している可能性が示唆された。

以上の研究は哺乳類中枢神経分化過程の解明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10年4月14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。