

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	中島 輝恵
論文題目	小脳顆粒細胞前駆細胞の神経産生における分裂様式と細胞周期の解析		
(論文内容の要旨)			
<p>脳の正常発生過程でおこる神経幹細胞の分裂は厳密に制御されており、一定数のニューロンとグリア細胞を産生する。哺乳類の脳と脊髄のニューロンの多くは、神経幹細胞が分裂により神経幹細胞とニューロン (またはグリア細胞) を一つずつ産生する非対称分裂で誕生することが明らかにされている。一方、脳の全ニューロンの過半数を占めると云われる小脳顆粒細胞の分裂制御については不明な点が多く残されていた。顆粒細胞は生後対称分裂を繰り返して爆発的に数を増やす顆粒細胞前駆細胞 (GCP) から誕生する。GCPが如何なる機構で増殖期からニューロン産生期に切り替わるのか、脳と同様に非対称分裂により顆粒細胞を産生するのかが明らかでなかった。本研究では、長期ライブイメージングによりGCPの分裂後の運命を追跡することでこれらの問題に取り組んだ。</p> <p>生後発生中の小脳においてGCPに緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現させて形態を観察したところ、一部軟膜に接着した上皮様の頂端-基底極性をもつ細胞が存在した。GCPが極性を持ち、分裂軸により運命決定因子が (不) 均等に分配される可能性を検証するため、GCPの分裂極性を染色体マーカーのリン酸化ヒストンの免疫蛍光により解析した。観察像の定量的解析から分裂軸は不規則で、上皮様細胞に限らず軟膜から離れた多極性細胞でも起こることが分かり、GCPが分裂極性により対称・非対称分裂を制御している可能性には否定的な結果を得た。</p> <p>次に、GCPの細胞分裂後の運命をライブイメージングで追跡する観察系を確立した。染色体分裂を可視化するHistone 2BとGFPの融合分子と、分化したニューロンで赤色蛍光タンパク質の発現を開始するDcx-DsRed expressをGCPに導入し、分散培養下または小脳組織片培養下でGCPの分裂を複数回追跡した。その結果、いずれの条件においても9割以上のGCPは対称分裂により2つの顆粒細胞を産生することが明らかになった。さらにGCPが分裂を繰り返す増殖期から2つの分化した顆粒細胞を生む最終分裂へ移行する機構に、細胞周期の変化が関与する可能性を検証した。分散培養下で検出した分裂周期の統計解析の結果、増殖期において細胞周期の変化に定向性はなく、増殖期の分裂とニューロンを産生する最終分裂でも細胞周期に有意な違いは見られなかった。一方で、同一の母GCPから産生された姉妹細胞では、次の細胞分裂に至るまでの細胞周期がほとんど同期していることを見出した。</p> <p>以上の結果から、GCPは自己増幅からニューロン分化まで一貫して対称分裂を行うことが明らかになり、細胞内因子を均等に受け継ぐことで細胞周期と細胞運命が制御されることが示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

神経幹細胞の分裂・分化制御は様々な動物種で解析され理解が進んでいるが、哺乳類脳の構成ニューロンの過半数を占める顆粒細胞が前駆細胞から分化する機構については未知の問題が多く残されていた。申請者はライブイメージングにより細胞系譜の運命を直接追跡する方法を主に用いて、顆粒細胞前駆細胞の分裂・分化制御を解析した。

まず、分子解剖学的手法により分裂する顆粒細胞前駆細胞の形態と位置を観察し、細胞内因子の(不)等分配により娘細胞の運命を決定する上皮性神経幹細胞に見られる明確な細胞極性と分裂面の制御がないことを見出した。顆粒細胞前駆細胞の分裂制御を直接解析するため、精製後ガラス皿に播種した顆粒細胞前駆細胞に増殖制御因子のSonic hedgehogを添加し、数回の分裂を経て顆粒細胞に分化する過程を培養下で再構成し、長期間ライブイメージングする観察系を確立した。この系を用い、細胞分裂とニューロン分化を可視化できる蛍光分子を培養下の前駆細胞に導入してライブ観察し、非対称分裂して1個の前駆細胞と1個の神経細胞を産生するのか、対称分裂により2個の神経細胞を産生のかを検証した。その結果、顆粒細胞前駆細胞は増殖期から最終分裂まで一貫して対称分裂を行い、9割以上の顆粒細胞が対称分裂により産生されることを証明した。また、2つの前駆細胞を生む増殖期の分裂と神経細胞を生む分裂の間で細胞周期に有意な差はなく、同一細胞系譜で複数回の分裂を追跡しても周期に一定方向の変化は認められなかった。一方、同じ母細胞から誕生した姉妹の顆粒細胞前駆細胞では細胞周期の有意な同調が認められ、姉妹細胞が母細胞から分裂制御因子を均等に受け継ぐと考察した。

申請者はさらに、より生体に近い組織内での分裂・分化制御を観察するため、小脳小葉の組織培養を行い、蛍光分子を導入した顆粒細胞前駆細胞のライブイメージングを行った。その結果、組織内においても9割以上の前駆細胞が対称分裂により分化した神経細胞を産生することが明らかになった。

これらの結果より申請者は、顆粒細胞前駆細胞は非上皮性の分裂細胞で、細胞内の分裂・分化制御因子を娘細胞に均等に引き継ぎ、対称分裂で神経細胞を産生すると結論した。これまでの研究で脳室帯の神経幹細胞は主に非対称分裂で神経細胞産生することが明らかになっており、本研究成果は哺乳類脳の神経産生機構の多様性を示す重要な知見である。また、顆粒細胞前駆細胞の分裂制御の破綻は小児脳腫瘍で最も多い髄芽腫の原因になることが知られており、その病因・病態解明にも繋がりうる発見である。

本論文では、申請者の神経発生学に関する高度で幅広い学識と優れた研究遂行能力により、独創的・統合的に精緻な研究が展開されており、生命科学の理解と発展に寄与する発見が論理的に一貫性をもって記述されている。従って博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。平成27年7月9日に、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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日