

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	川地 輝明
論文題目	Secondary neurulationにおける神経系自己増殖性細胞の Sox2による制御機構の解明		
(論文内容の要旨)			
<p>脊椎動物において主な神経系組織は、胚発生初期に出現する神経管と呼ばれる上皮管構造に由来する。神経管形成のプロセスは、からだの頭部側と尾部側で異なり、それぞれprimary neurulation (PN)とsecondary neurulation (SN)と呼ばれる。PNはよく知られたプロセスであり、上皮組織である神経板が胚体内に折りたたまれることで管構造が獲得される。一方でSNは、すでに形成されている神経管の後端とそこに隣接する尾芽との境界部分で起こる現象であり、尾芽の間充織性前駆細胞が上皮転換 (MET) を経ることで、神経管が後方へと伸長する。PNに比べてSNのメカニズムについての理解は大きく遅れていた。その理由として、SNを起こす間充織性の前駆細胞 (SN前駆体) の特異的操作法が無かったことが挙げられる。そのため、神経管を含む体軸伸長に参与する細胞の実体については不明な点が多く、中胚葉-神経系の共通前駆細胞であるneuro-mesodermal progenitors (NMPs)の関与のみがクローズアップされていた。しかし近年、所属研究室の下北らのニワトリ胚を用いた先行研究 (DGD, 2011) によって、SNに優先的に参画する前駆体の存在が示され、またそれらの細胞の予定運命領域 (preSN領域) が同定されたことから、中胚葉には寄与しない神経系特異的なSN前駆体の意義が認識され始めた。そこで本研究では、ニワトリ初期胚を用いて、SN特異的な細胞標識および遺伝子操作技術と細胞移植法とを組合せ、SN前駆体の細胞実体とその制御機構の解明を目的とした。</p> <p>まず、下北らによってすでに同定されているSN前駆体予定領域である菱形エピブラスト (HH8; preSN領域) をさらに詳細に解析したところ、SNのみに参画する神経系の細胞群と、SNと中胚葉 (体節中胚葉など) の両方に参画する細胞群が、それぞれ別の領域に区別して存在することを明らかにした。次に、SNのみに参画する細胞集団 (uni-fated SN) をEGFPで標識し、それらを他の胚に移植するという方法を用いたところ、これらの細胞は、自己増殖と神経管上皮細胞への分化能を有する神経幹細胞様の形質を有することがわかった。さらに詳細に調べたところ、幹細胞様の形質をもつSN前駆体は、尾芽領域の後方に位置していた。一方で前方の細胞は、神経管上皮へと分化しつつある集団であった。そこでこれら二種類の細胞集団の制御機構を知るために、これらの集団で異なる発現レベルを呈する転写調節因子Sox2に注目した。Gain-of-functionやLoss-of-functionアッセイの結果、高レベルのSox2がSN前駆体の神経管分化を促進すること、また低レベルのSox2はSN前駆体の維持に重要な働きを持つことが示された。</p> <p>さらに、初期胚ではuni-fatedであったSN前駆体を、より後期ステージまで追跡したところ、HH17 (後期尾芽ステージの開始期) 以降では、神経系に加えて中胚葉も産生することが観察された。このことから、初期胚ではuni-fatedであったSN前駆体</p>			

が、後期になると bi-fated へと運命を変化させることが示された。これらの結果から、議論が混沌としていた体軸伸長における NMPs 細胞の寄与に関して一定の解決を示すことができ、また神経系の形成における SN 幹細胞様前駆体の重要性が示された。

(論文審査の結果の要旨)

脊椎動物の初期発生過程では、体軸の著しい伸長が認められる。体軸伸長には、胚体後端の細胞制御が重要であると考えられているが、そのしくみはよくわかっていなかった。体軸伸長に関わる細胞群は大きく分けて、神経系と中胚葉系の細胞がある。しかし両者を明瞭に区別する解析系がなかったことから、それぞれの細胞がどのような役割をもつのかについては諸説あり混沌としていた。なかでも近年では、神経系と中胚葉系の両方を生み出す共通の前駆細胞(Neuro-mesodermal progenitors: NMPs)の重要性を強調するモデルが先行し、確固たる実験エビデンスに欠けるにもかかわらず、体軸伸長をNMPで説明する傾向が優勢であった。

これらの背景のなか、本論文では、NMP細胞とは明らかに異なる神経系細胞が体軸伸長に大きく関わることを、実験的に証明した。これらの解析にとって優れた実験動物であるニワトリ胚を用いることにより、胚体後端部に位置する尾芽内において、神経系のみで分化する細胞群が、Secondary Neurulation (SN) と呼ばれる過程をへて体軸伸長に参画することを細胞レベルで示すことに成功した。SNは胚体後方でのみ認められる現象であり、前方におけるよく知られた「神経板の折り畳みによる神経管形成」とは大きく異なる。SN現象は75年前に記載されていたものの、よい解析系がなかったために現代科学的な解析はほとんどなされていなかった。本論文において創出した新しいSN解析系の有用性は高い。

申請者はまず、ニワトリ胚の非常に早い発生ステージを対象にして、オーガナイザーと呼ばれるヘンゼン結節後方のエピブラストを標識し、SN特異的に参画する細胞群を特定した。そしてこれらのSN前駆細胞に由来する細胞が、胚体後端部の尾芽内において中胚葉系の細胞とは明瞭に区別されることを述べている。次に、これらのSN前駆細胞が、さらに2種類の細胞群で構成されていることを示した。1つは前方に位置するSox2「高レベル」発現細胞であり、もう1つは後方に位置するSox2「低レベル」発現細胞である。申請者は洗練された移植技術を駆使して、後方の細胞群(Sox2低レベル発現細胞)が神経幹細胞様であることを見出した。このことは、これらの細胞を他の胚に移植した際に、常に自己複製と神経管分化を起こすことから結論づけられた。新しい神経幹細胞の発見と評価される。

また申請者は、Sox2発現レベルの違いがSN前駆細胞の挙動をどのように制御するかを調べるために、Sox2の強制発現や機能抑制などの解析実験を重ねた。その結果として、高発現のSox2がSN幹細胞から神経系への分化を促進すること、またSox2が低レベルで発現することもSN幹細胞の維持に重要であることなどを見出した。これらの発見は、時期特異的にコントロールできる高度な遺伝子操作技術と、洗練された細胞・胚移植技術によってもたらされた。

最後に、神経系に限定されていた初期におけるSN前駆細胞が、後期になるとその運命を変化させて、神経系に加えて中胚葉系をも生み出すようになるという予想外の現象を観察した。これまでの他の研究者によるNMP細胞に注目した研究は、本論

文で用いた「後期胚」の細胞に相当することから、本論文で述べられた「SN前駆細胞は、“uni-fated” から“bi-fated”へとその予定運命を変える」という発見によって、これまでのミッシングリンクに一定の解決がもたらされたといえる。

独自の解析系と洗練された遺伝子・胚操作技術の組合せによってもたらされたこれらの発見は、個体発生過程における体軸伸長、とりわけ長年謎のまま放置されてきたSN現象の分子・細胞レベルでの制御機構に対して、極めて有用な知見を提供した点において高く評価できる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和2年4月13日に論文内容とそれに関連した口頭試問をおこなった結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降