

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	木下 晃
論文題目	マウス側脳室脈絡叢からの Sonic hedgehog の分泌が側脳室脈絡叢の肥大と大脳新皮質表面積の拡大をもたらす		
(論文内容の要旨)			
<p>哺乳類の大脳新皮質の発生は、単層の神経幹細胞のシートから始まり、神経幹細胞が細胞分裂と分化を繰り返すことで最終的に 6 層からなる神経回路を形成する。この大脳新皮質発生のプロセスは哺乳類間でほとんど共通と考えられている。ヒトやサルといった霊長類の脳は、齧歯類と比べると非常に拡大した、しわのある大脳新皮質をもち、より高い知能と認知能力の獲得につながったと考えられている。しかし大脳新皮質の拡大を生むメカニズムについては未だ明らかになっていない。これまで霊長類の大脳新皮質拡大について神経幹細胞の内的因子に着目した研究が多数報告されているが、申請者は神経幹細胞の外的因子である脳脊髄液と、その分泌源である脈絡叢に着目した。脈絡叢は脳脊髄液の約 8 割を分泌する組織であり、成体脳の恒常性の維持に寄与している。加えて近年では、脈絡叢より分泌される様々なシグナル分子が脳発生過程の神経幹細胞の制御に関与していることが明らかになっている。また、脳脊髄液によって形成される脳室内の圧力も、大脳の形態形成や神経幹細胞の分裂に影響を与えることが知られている。興味深いことに、霊長類と齧歯類の脳の発生過程を比較すると、霊長類胎仔の脳では側脳室脈絡叢がより顕著に発達していることが報告されている。脈絡叢の発達は、脳脊髄液分泌量の増加による脳室内圧の増加や、シグナル分子の分泌量の増加を起し得ることから、大脳新皮質の拡大に関与する可能性が考えられた。しかし、大脳の発生過程における、脈絡叢分泌因子の機能解析や、側脳室脈絡叢肥大を誘導する分子については、未だ十分に調べられていない。</p> <p>そこで申請者は、側脳室脈絡叢の拡大やシグナル分子分泌の人為的改変を目的として、脈絡叢前駆細胞や脈絡叢上皮細胞に特異的に遺伝子発現操作を可能にする遺伝子組換えマウス (pTtr-rtTA と pFuguOtx2-rtTA) を作製した。これらの Tet-on システムを用いた遺伝子改変モデルマウスにおいて、発生過程の脈絡叢より <i>Sonic hedgehog</i> (<i>Shh</i>) を強制発現させた。<i>Shh</i> はマウスの脳の発生過程において、第四脳室脈絡叢で発現しており、第四脳室脈絡叢の伸長や血管新生に重要であることが知られているが、マウス側脳室脈絡叢では <i>Shh</i> の発現が報告されていない。また、ヒト胎児側脳室脈絡叢では <i>Shh</i> の発現と分泌が報告されている。pTtr-rtTA を用いて <i>Shh</i> を側脳室脈絡叢で強制発現させることにより、マウス胎仔脳で脈絡叢前駆細胞の分裂の増加や、脈絡叢の拡大、分枝数の顕著な増加を観察できた。また脈絡叢から分泌された <i>Shh</i> が大脳新皮質の神経幹細胞の分化を抑制し、増殖を促進したことで、脳室および脳室帯の拡大とともに大脳表面積の拡大及び、しわの形成が認められた。これらの結果は発生過程の脈絡叢からの <i>Shh</i> の分泌増加が、霊長類特有の側脳室脈絡叢の肥大化や大脳新皮質の拡大といった、哺乳類大脳の進化に関与している可能性が示唆される。また近年では、成体脳における脈絡叢による成体神経幹細胞や神経活動の制御にも注目が集まっている。しかし pTtr-rtTA は他の臓器での非特異的な発現や、発達が進むごとに発現が低下する特性などから、成体脳での遺伝子発現の誘導には適さない。そこで申請者はフグ (学名 <i>Fugu rubripes</i> ; トラフグ) の <i>Otx2</i> 遺伝子発現調節領域 (pFugu) を用いて、pFuguOtx2-rtTA 遺伝子組換えマウスを作製し、成体脳での側脳室脈絡叢のシグナル分子分泌の人為的操作を試みた。pFuguOtx2-rtTA 遺伝子組換えマウスを用いて成体脳で <i>Shh</i> を強制発現させたところ、脳室下帯における神経幹細胞の分裂と神経新生の増加や、嗅球での新生神経細胞の組み込みの増加が観察された。pFuguOtx2-rtTA 遺伝子組換えマウスは成体脳における脈絡叢分泌因子の機能解析に用いることができると考えられる。</p> <p>本研究により、脳発生過程における側脳室脈絡叢での <i>Shh</i> の発現・分泌が、哺乳類大脳の進化において重要な役割を果たした可能性が示された。また、申請者の開発した pFuguOtx2-rtTA 遺伝子組換えマウスを用いることで、脈絡叢分泌因子が成体脳の構造機能に及ぼす影響の解析や、脈絡叢機能の改変の研究などの応用展開が期待できる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

霊長類の大脳新皮質は、進化の過程で肥大化し、高次脳機能を発現するための神経回路を獲得していったと考えられている。しかし、霊長類特異的な大脳新皮質の発生機構は未だ不明な点が多い。本研究では、ヒト胎児脳の脳発生過程においては、側脳室の脈絡叢上皮細胞においてソニックヘッジホッグ分泌因子(Shh)が特異的に発現していることに着目し、遺伝子改変マウスモデルを新規に樹立し、側脳室の脈絡叢上皮細胞における Shh の異所的発現が、マウスの脳発生過程に与える影響について解析を行った。

Tet システムを用いたトランスジェニックマウス(pTtr-rtTA;TRE-Shh)を新規に樹立し、脳発生の中期から Shh を脈絡叢上皮細胞において強制発現させた場合には、脈絡叢の過形成が認められた。また、大脳新皮質領域では、Shh シグナル経路の異所的な活性化が認められ、神経幹細胞の分化抑制を伴う対称分裂の増加や、脳表面のしわの形成が観察された。これらの表現型は、脈絡叢の過形成そのものの影響と、Shh シグナル経路の異所的な活性化の両方が寄与していると考えられ、それらの切り分けについては不明な点が残されているが、ヒト胎児脳の脳発生過程において、Shh が側脳室の脈絡叢上皮細胞において発現することが、霊長類特異的な大脳新皮質の発生様式にとって、重要な役割を担っていることが示唆された。

加えて、別のトランスジェニックマウスモデル(pFuguOtx2-rtTA; TRE-Shh)を樹立し、生後脳の側脳室脈絡叢における Shh 発現誘導の機能解析を行なった。マウスの生後脳の側脳室では、神経幹細胞が残存しており、嗅球の抑制性ニューロンに分化する新生ニューロンを産生することが知られている。このトランスジェニックマウスでは、Shh の側脳室脈絡叢における異所的発現により、側脳室周囲でのニューロン新生の亢進が確認された。本研究では Shh に着目して評価を行なったが、この研究成果により、生後脳において、様々な脈絡叢分泌因子の機能解析が可能な遺伝子改変モデル動物を樹立できたことが示された。

以上のように、本論文は生命科学に関する高度で幅広い学識、および、神経発生や生後脳の可塑性発現についての研究分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見もしくは概念等が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。更に、令和4年1月31日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