

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	前田 勇樹
論文題目	Hes1による発現動態依存的な細胞増殖制御機構の解明		
(論文内容の要旨)			
<p>胎仔期の神経幹細胞は対数分裂や非対称分裂によって活発に分裂することで、その数を保ちながら、適切なタイミングで多様な神経細胞やグリア細胞を産生する一方で、一部の神経細胞は増殖と分化を行わない休眠状態になる。このような細胞の増殖と休眠の制御に転写抑制因子 Hairy enhancer of split 1 (Hes1)が重要であることが知られている。Hes1の振動発現は細胞の増殖を促進する一方で、Hes1の持続的な高発現は増殖を抑制し、休眠状態を誘導する。しかし、Hes1が発現動態依存的に細胞増殖を制御するメカニズムはいまだ不明な点が多く残されている。そこで申請者は、このメカニズムの解明を目指した。</p> <p>はじめに培養神経幹細胞を用いて、RNA sequencing解析によって <i>Hes1</i> と <i>Hes</i> 関連遺伝子群 (<i>Hes3</i>, <i>Hes5</i>, <i>Hey1</i>) の欠損、及び <i>Hes1</i> の持続的な高発現による遺伝子発現の変化を網羅的に調べた。その結果、Cyclin-dependent kinase inhibitor である p21 の発現がどちらの条件でも上昇した。また、<i>Hes1</i> の持続的な高発現に加えて、p21 の発現をロックダウンすると、<i>Hes1</i> の持続的な高発現によって抑制された細胞増殖が改善された。以上の結果より、p21 の発現を上昇させることで、<i>Hes1</i> の持続的な高発現は細胞増殖を抑制することが示唆された。</p> <p>次に <i>Hes1</i> の振動発現が p21 の発現を抑制するか調べるために、光応答性遺伝子発現システムを用いて、<i>Hes1</i> の振動発現を誘導し、p21 の発現への影響を調べた。その結果、<i>Hes1</i> の振動発現によって p21 の発現が抑制された。加えて、クロマチン免疫沈降アッセイにより、<i>Hes1</i> が p21 プロモーターに直接結合することが分かった。以上の結果より、<i>Hes1</i> の振動発現は直接 p21 の発現を抑制することが示唆された。</p> <p>次に <i>Hes1</i> の持続的な高発現によって p21 の発現を上昇させるメカニズムを調べた。<i>Hes1</i> の持続的な高発現によって、Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (Erk1/2) のリン酸化が上昇し、また Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) 阻害剤を加えたところ、<i>Hes1</i> の持続的な高発現によって上昇した p21 の発現が低下し、加えて <i>Hes1</i> の持続的な高発現によって抑制された細胞増殖が改善された。以上の結果より、<i>Hes1</i> の持続的な高発現は Erk1/2 のリン酸化を介して p21 の発現を促進することが示唆された。</p> <p>次に <i>Hes1</i> の持続的な高発現が Erk1/2 のリン酸化を誘導するメカニズムを調べた。その結果、Erk1/2 の脱リン酸化酵素である Dual-specificity phosphatases 7 (Dusp7) の発現が <i>Hes1</i> の持続的な高発現によって抑制されることが明らかになった。そこで <i>Hes1</i> と Dusp7 の持続的な高発現を誘導したところ、<i>Hes1</i> の持続的な高発現によって促進された Erk1/2 のリン酸化と p21 の発現が抑制され、<i>Hes1</i> の持続的な高発現によって誘導される細胞増殖低下も改善された。以上の結果より <i>Hes1</i> の持続的な高発現は Dusp7 の発現を抑制することによって Erk1/2 のリン酸化を促進し、その結果 p21 の発現を促進することが示唆された。</p> <p>本研究によって、<i>Hes1</i> は発現動態に応じて直接、もしくは Dusp7-Erk1/2 を介して間接的に p21 の発現を制御し、培養神経幹細胞の増殖を制御していることが示された。これらの研究成果は、神経幹細胞の増殖と休眠の制御機構を理解する一助になることが期待される。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

神経幹細胞においてHes1の振動発現が細胞増殖を促進し、一方で、持続的な高発現が細胞増殖の抑制に寄与することは示されていたが、その分子メカニズムは解明されていなかった。先行研究の多くは、マウス個体を用いた実験が多く、培養神経幹細胞を用いた研究は少なかった。そのため、適応できる実験系に制限があり、詳細な分子メカニズムの解明に繋がらなかった。これは、以前は、培養神経幹細胞の遺伝子操作の手法が十分に確立されていなかったことが一因であると考えられる。しかし、近年では、様々な遺伝子操作 (CRISPR/Cas9を使った遺伝子の欠損、Tet-Onシステムなどを使用した遺伝子の発現誘導、光応答性遺伝子発現システムを用いた遺伝子の振動発現の誘導など) が可能になった。申請者は培養神経幹細胞において様々な遺伝子操作技術を適応することで、神経幹細胞の細胞増殖制御に関わる分子メカニズムを解明した。

申請者は培養神経幹細胞を用いて、Hes1が発現動態に応じて直接、もしくはDusp7-*Erk1/2*を介して間接的に*p21*の発現を制御し、培養神経幹細胞の増殖を制御していることを明らかにした。胎児や成体の脳における神経幹細胞の増殖と休眠の制御機構を理解する一助になることが期待される。また、他の細胞種においてもHes1によって細胞増殖が制御されていることが知られている。例えば、マウス線維芽細胞では、Hes1の発現は振動しており、Hes1の抑制、またはHes1の持続的な高発現の誘導により細胞増殖は抑制される。他にもラット褐色細胞腫由来の細胞株PC12において、Hes1の持続的な高発現は*p21*の発現を抑制することで増殖と分化を抑制する。このように、本論文で明らかになった*p21*を介したHes1の細胞増殖の制御は神経幹細胞だけでなく、様々な細胞で共通のメカニズムであることが期待される。

Hes1 以外の遺伝子においても、その発現動態に応じて機能が異なることが知られている。例えば、ラットの腎臓上皮細胞において、*Erk1/2* の活性化の動態に応じて誘導される遺伝子発現が異なる。*Erk1/2* が周期的に活性化される場合、血清応答因子に制御される遺伝子の発現が誘導される一方で、*Erk1/2* が持続的に活性化される場合、AP1やTEF1に制御される遺伝子の発現が誘導される。このように多くの生命現象において一つの因子がその発現動態に応じて異なる結果を誘導するという興味深い共通の特徴を示す。申請者の研究は、細胞内のシグナル伝達因子の活性化や、その下流の転写因子の発現ダイナミクスの変化が、異なる細胞表現型の表出に寄与するという制御機構において、そのメカニズムの一端を明らかにしたものであり、細胞生物学全般にとどまらず、発生学・再生学・幹細胞生物学の発展と、その再生医学応用への貢献も期待されるものである。

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、神経発生学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技術が示されており、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5年10月11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