

氏 名	さか もと まさ み 阪 本 昌 美
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2716 号
学位授与の日付	平 成 16 年 3 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 病 理 系 専 攻
学位論文題目	The Basic Helix-Loop-Helix Genes Hesr1/Hey1 and Hesr2/Hey2 Regulate Maintenance of Neural Precursor Cells in the Brain (塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス型転写因子 Hesr1/Hey1とHesr2/ Hey2は脳の発生において神経前駆細胞の維持を制御する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 金 子 武 嗣 教 授 井 出 千 東 教 授 影 山 龍 一 郎

論 文 内 容 の 要 旨

脊椎動物の神経系は、ニューロンとその活動を助けるグリアから構成されているが、どちらの細胞も、自己複製能・多分化能を備えた神経前駆細胞から分化することが知られている。近年、この神経前駆細胞の増殖、ニューロンあるいはグリアへの運命決定や分化のタイミングが、様々な塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス (basic helix-loop-helix; bHLH) 型転写因子により制御されていることが明らかになってきた。そこで神経前駆細胞の増殖・分化を制御するメカニズムを解明するため、bHLH型転写因子である Hesr (Hes-related)1と Hesr2に着目し脳の発生における機能の解析を行った。

in situ hybridization 法により胎児の脳における Hesr1と Hesr2の発現を調べたところ、どちらも脳の脳室周囲層にシグナルが見られ、未分化な細胞に発現していた。次に、Hesr1と Hesr2の機能を調べるため、*in utero* エレクトロポレーション法により脳で強制発現させてその影響を検討した。胎生13日目の脳室周囲層の細胞に強制発現させて3日後に解析したところ、EGFPのみを強制発現させたコントロールでは多くの細胞が皮質板へと遊走し、ニューロンのマーカーである MAP2が陽性であった。それに対して、Hesr1あるいは Hesr2を強制発現させた細胞は、ほとんどが脳室周囲層に留まっており、未分化な細胞のマーカーである nestinが陽性であった。このとき Hesrの強制発現によって細胞死は引き起こされておらず、Hesrによって未分化に維持されたと考えられる。次いで胎生13日目に強制発現させて7日後に解析したところ、コントロールでは皮質板に存在する細胞は MAP2および、より成熟したニューロンのマーカーである NeuNが陽性であった。Hesrを強制発現させた細胞では、この時期には Hesr 自身の発現はなくなっており、皮質板へ遊走した細胞は MAP2 陽性のニューロンへと分化していた。しかし、NeuN陰性の細胞がより表層に存在し、より遅くに分裂を終えたニューロンが生じていた。このことから、一時的にニューロンへの分化が抑制され神経前駆細胞が維持された結果、遅生まれのニューロンが生じたと考えられる。さらに、胎生15日目に強制発現させて生後5日目に解析すると、コントロールでは外側へ遊走し、NeuN陽性のニューロンへ分化していたのに対し、Hesr1あるいは Hesr2を強制発現させた細胞ではほとんどが脳室周囲層に留まり、アストロサイトのマーカーである GFAPが陽性であった。このことから、Hesr1と Hesr2によって神経前駆細胞が維持された結果、アストロサイトが増加したと考えられる。次に、ニューロジェニックな bHLH 型転写因子である Mash1あるいは Mash3に対する Hesr1と Hesr2の影響を調べた。Mash1あるいは Mash3はコファクターである E47 とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子のプロモーターにある Eボックス配列に結合して転写を活性化することが知られている。そこで Hesr1あるいは Hesr2を Mash1あるいは Mash3と共発現させたところ、Mash1や Mash3によって活性化された転写が抑制された。このことから Hesr1と Hesr2はニューロジェニックな bHLH 型転写因子を負に調節することが示された。

以上の結果、Hesr1と Hesr2はニューロジェニックな bHLH 型転写因子を負に制御し、神経前駆細胞の維持に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

申請者は、神経前駆細胞の増殖・分化を制御するメカニズムを解明するため、塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス (basic helix-loop-helix; bHLH) 型転写因子である Hesr (Hes-related) 1 と Hesr2 に着目し脳の発生における機能の解析を行った。

Hesr1 と Hesr2 はともに脳の脳室周囲層に存在する未分化な神経前駆細胞に発現していた。次に脳の脳室周囲層に強制発現させて機能解析を行った。胎生13日目において GFP のみを強制発現させたコントロール細胞は皮質板へ遊走し、NeuN 陽性のニューロンとなっていた。一方、Hesr1, Hesr2 を強制発現させた細胞は、脳室周囲層に留まり未分化に維持された後、Hesr の発現がなくなると皮質板へ遊走してより遅くに分化したニューロンとなっていた。胎生15日目に強制発現させると、コントロールの細胞は外側へ遊走し、NeuN 陽性のニューロンへ分化していたが、Hesr1, Hesr2 を強制発現させた細胞は脳室周囲層に留まり、GFAP 陽性のアストロサイトへ分化していた。また、Hesr1, Hesr2 はニューロジェニックな bHLH 型転写因子 Mash1 や Mash3 の転写活性を抑制した。

以上の結果から、Hesr1 と Hesr2 はニューロジェニックな bHLH 型転写因子を負に制御し、神経前駆細胞の維持に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

以上の結果は、bHLH 型転写因子による神経発生の制御機構の解明に貢献し、神経発生学の発展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16年2月5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。