

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬学)	氏名	藤村 一彦
論文題目	神経幹/前駆細胞の分化制御における integrin-associated protein の役割に関する研究		

(論文内容の要旨)

神経幹/前駆細胞 (neural stem/progenitor cell: NSPC) は未分化状態を保持したまま増殖することができる自己複製能および中枢神経系を構成する細胞であるニューロンとグリア細胞に分化することのできる多分化能を併せ持つ細胞であり、NSPC を用いた中枢神経系再生医療への取り組みが注目されている。NSPC を再生医療に応用するには、NSPC が適切な割合でニューロンおよびグリア細胞に分化することが重要であるが、その分化制御機構は未だ不明な点が多い。NSPC の生存・増殖・分化は、サイトカイン等の細胞外環境因子および転写因子やエピジェネティクスといった細胞内在性のプログラムによって制御されることが知られているが、両者のクロストークはほとんど明らかになっていない。したがって、NSPC の分化制御機構を解明することは、NSPC の再生医療への応用に重要であると考えられる。本研究において著者は、NSPC の新規分化制御因子を探索し、ついで、integrin-associated protein form 2 (IAP2) による NSPC の分化制御機構の検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章 NSPC の分化制御因子の探索

NSPC は EGF, bFGF 存在下で浮遊細胞塊 (ニューロスフェア) として培養した。中枢神経系発生過程において NSPC は時間依存的に分化能が変化し、発生中期にはニューロンへ、後期にはグリア細胞に分化することが報告されている。その点に注目して、分化制御因子の探索を行うことを目的とし、13 days in vitro (DIV) と 20 DIV という培養期間の異なるニューロスフェアをシングルセル化して NSPC を調製し、それぞれのニューロンへの分化能を評価した。13 DIV ニューロスフェア由来 NSPC は、20 DIV ニューロスフェア由来 NSPC と比較してニューロンに分化する割合が高く、培養期間の違いで NSPC のニューロン分化能が異なることが示された。ディファレンシャルディスプレイ法を用いて 13 DIV ニューロスフェアと 20 DIV ニューロスフェアとの間で発現差のある mRNA を探索したところ、13 DIV ニューロスフェアにおいて高い発現レベルを示す mRNA として integrin-associated protein form 2 (IAP2) を同定した。レトロウイルス過剰発現系による IAP2 過剰発現により、13 DIV ニューロスフェア由来 NSPC がニューロンへ分化する割合が上昇した。以上の結果より、IAP2 は NSPC のニューロンへの分化促進において重要な役割を果たすことが示唆された。

第二章 IAP2 による NSPC の分化制御機構の解明

IAP は signal-regulatory protein alpha (SIRP α) のリガンドとして働き、隣接細胞の膜貫通型タンパク質である SIRP α をリン酸化することにより隣接細胞にシグナルを伝達することが報告されている。そこで、IAP2 の SIRP α リン酸化に対する影響を検討したところ、IAP2 過剰発現により NSPC における SIRP α のリン酸化レベルが上昇した。さらに、RNAi の手法を用いた SIRP α のノックダウンは、IAP2 過剰発現による NSPC のニューロンへの分化促進作用を抑制した。IAP による SIRP α のリン酸化によって活性化されるチロシンホスファターゼである src homology-2-domain containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP2) の阻害薬 NSC-87877 は、IAP2 過剰発現による NSPC のニューロンへの分化促進作用を抑制した。以上の結果より、SIRP α のリン酸化を介した SHP2 の活性化が、IAP2 による NSPC のニューロン分化促進機構に重要な役割を果たすことが示唆された。Janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT) 経路は、NSPC のアストロサイトへの分化を促進し、ニューロンへの分化を抑制することが知られており、COS-7 細胞株において SIRP α が、JAK-STAT 経路を負に制御することが報告されている。そこで、SIRP α および SHP2 の下流の経路を検討する目的で、IAP2 による NSPC のニューロン分化促進機構における JAK-STAT 経路の関与について検討した。IAP2 を NSPC に過剰発現させた後、NSPC における STAT3 のリン酸化レベルを検討したところ、IAP2 過剰発現により STAT3 リン酸化レベルが低下したが、SIRP α をノックダウンした NSPC および NSC-87877 処置した NSPC では、IAP2 過剰発現による STAT3 リン酸化レベルの低下は認められなかった。さらに、NSPC の JAK-STAT 経路の制御における IAP2 の役割を明らかにする目的で、JAK-STAT 経路を活性化する IL-6 ファミリーの一つである leukemia inhibitory factor (LIF) による JAK-STAT 経路の活性化に IAP2 過剰発現が与える影響を検討した。NSPC 分化培地への LIF 添加により、NSPC における STAT3 のリン酸化レベルが上昇し、NSPC がニューロンへ分化する割合が減少したが、IAP2 を過剰発現した NSPC において、LIF による STAT3 リン酸化レベルの上昇およびニューロン分化抑制作用が抑制された。以上の結果より、IAP2 は、SIRP α のリン酸化による SHP2 の活性化を介して JAK-STAT 経路を抑制することで NSPC のニューロン分化を促進することが示唆された。

以上、著者は、IAP2 が NSPC のニューロン分化を促進する新規分化制御機構を明らかにし、その機序として SIRP α および SHP2 を介する JAK-STAT 経路の抑制が重要な役割を果たすことを示した。本研究の成果は、NSPC の分化制御機構の解明に寄与するものであり、NSPC の再生医療への応用に向けた基礎的知見を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

神経幹/前駆細胞 (neural stem/progenitor cell: NSPC) は未分化状態を保持したまま増殖することができる自己複製能および中枢神経系を構成する細胞であるニューロンとグリア細胞に分化することのできる多分化能を併せ持つ細胞であり、NSPC を用いた中枢神経系再生医療への取り組みが注目されている。NSPC を再生医療に応用するには、NSPC が適切な割合でニューロンおよびグリア細胞に分化することが重要であるが、その分化制御機構は未だ不明な点が多い。NSPC の生存・増殖・分化は、サイトカイン等の細胞外環境因子および転写因子やエピジェネティクスといった細胞内在性のプログラムによって制御されることが知られているが、両者のクロストークはほとんど明らかになっていない。本研究において、NSPC の新規分化制御因子を探索し、ついで、integrin-associated protein form 2 (IAP2) による NSPC の分化制御機構の検討を行った。

NSPC は EGF, bFGF 存在下で浮遊細胞塊 (ニューロスフェア) として培養した。中枢神経系発生過程において NSPC は時間依存的に分化能が変化し、発生中期にはニューロンへ、後期にはグリア細胞に分化することが報告されている。その点に注目して、分化制御因子の探索を行うことを目的とし、13 days in vitro (DIV) と 20 DIV という培養期間の異なるニューロスフェアをシングルセル化して NSPC を調製し、それぞれのニューロンへの分化能を評価した。13 DIV ニューロスフェア由来 NSPC は、20 DIV ニューロスフェア由来 NSPC と比較してニューロンに分化する割合が高く、培養期間の違いで NSPC のニューロン分化能が異なることが示された。ディファレンシャルディスプレイ法を用いて 13 DIV ニューロスフェアと 20 DIV ニューロスフェアとの間で発現差のある mRNA を探索したところ、13 DIV ニューロスフェアにおいて高い発現レベルを示す mRNA として integrin-associated protein form 2 (IAP2) を同定した。レトロウイルス過剰発現系による IAP2 過剰発現により、13 DIV ニューロスフェア由来 NSPC がニューロンへ分化する割合が上昇した。以上の結果より、IAP2 は NSPC のニューロンへの分化促進において重要な役割を果たすことが示唆された。

IAP は signal-regulatory protein alpha (SIRP α) のリガンドとして働き、隣接細胞の膜貫通型タンパク質である SIRP α をリン酸化することにより隣接細胞にシグナルを伝達することが報告されている。そこで、IAP2 の SIRP α リン酸化に対する影響を検討したところ、IAP2 過剰発現により NSPC における SIRP α のリン酸化レベルが上昇した。さらに、RNAi の手法を用いた SIRP α のノックダウンは、IAP2 過剰発現による NSPC のニューロンへの分化促進作用を抑制した。IAP による SIRP α のリン酸化によって活性化されるチロシンホスファターゼである src homology-2-domain containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP2) の阻害薬 NSC-87877 は、IAP2 過剰発現による NSPC のニューロンへの分化促進作用を抑制した。以上の結果より、SIRP α のリン酸化を介した SHP2 の活性化が、IAP2 による NSPC のニューロン分化促進機構に重要な役割を果たすことが示唆された。Janus

kinase (JAK)–signal transducer and activator of transcription (STAT) 経路は、NSPC のアストロサイトへの分化を促進し、ニューロンへの分化を抑制することが知られており、COS-7 細胞株において SIRP α が、JAK-STAT 経路を負に制御することが報告されている。そこで、SIRP α および SHP2 の下流の経路を検討する目的で、IAP2 による NSPC のニューロン分化促進機構における JAK-STAT 経路の関与について検討した。IAP2 を NSPC に過剰発現させた後、NSPC における STAT3 のリン酸化レベルを検討したところ、IAP2 過剰発現により STAT3 リン酸化レベルが低下したが、SIRP α をノックダウンした NSPC および NSC-87877 処置した NSPC では、IAP2 過剰発現による STAT3 リン酸化レベルの低下は認められなかった。さらに、NSPC の JAK-STAT 経路の制御における IAP2 の役割を明らかにする目的で、JAK-STAT 経路を活性化する IL-6 ファミリーの一つである leukemia inhibitory factor (LIF) による JAK-STAT 経路の活性化に IAP2 過剰発現が与える影響を検討した。NSPC 分化培地への LIF 添加により、NSPC における STAT3 のリン酸化レベルが上昇し、NSPC がニューロンへ分化する割合が減少したが、IAP2 を過剰発現した NSPC において、LIF による STAT3 リン酸化レベルの上昇およびニューロン分化抑制作用が抑制された。以上の結果より、IAP2 は、SIRP α のリン酸化による SHP2 の活性化を介して JAK-STAT 経路を抑制することで NSPC のニューロン分化を促進することが示唆された。

以上、IAP2 が NSPC のニューロン分化を促進する新規分化制御機構を明らかにし、その機序として SIRP α および SHP2 を介する JAK-STAT 経路の抑制が重要な役割を果たすことを示した。本研究の成果は、NSPC の分化制御機構の解明に寄与するものであり、NSPC の再生医療への応用に向けた基礎的知見を提供するものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成 24 年 2 月 22 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。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降