

氏 名	むら ぐち てる ゆき 村 口 輝 行
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3150 号
学位授与の日付	平 成 19 年 7 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 分 子 医 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity (RECK は大脳皮質神経発生において ADAM10 活性を制御することにより Notch シグナルを調節する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 高 橋 良 輔 教 授 瀬 原 淳 子 教 授 影 山 龍 一 郎

論 文 内 容 の 要 旨

胎生期の神経幹細胞は、神経管を構成する神経上皮に存在し、未分化性を維持しながら自己複製を繰り返し、胎生時期に応じて神経細胞やグリア細胞に分化する。このため、神経幹細胞は中枢神経・大脳組織を形成するための起源として考えられているが、その詳細な維持機構は明らかにされていない。Notch は細胞膜貫通型分子であり、そのリガンドである Delta などとの結合により活性化され、標的遺伝子の発現を活性化する。この Notch シグナルは、神経幹細胞だけでなく広汎な幹細胞の未分化性維持機構に貢献していることが、種を超えて保存されている普遍的機構であるが、細胞外において Notch と Delta の相互作用を調節するメカニズムの詳細は明らかにされていない。また、Notch と Delta は細胞外領域をメタロプロテアーゼの一種である a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 17 および ADAM10 によりそれぞれ切断されることが知られているが、その詳細な活性制御機構は不明である。

当研究室において同定された reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) は細胞膜上に glycosylphosphatidylinositol アンカーされる糖タンパク質であり、いくつかのメタロプロテアーゼ [matrix metalloproteinase (MMP) 2、MMP9、membrane type 1 MMP、CD13/aminopeptidase N] を制御する働きをもつことが示されている。RECK 遺伝子欠損マウスは、胎生 10.5 日で致死性を示し、これ以前に、細胞外基質形成異常、血管新生や神経管形成の異常を呈する。胎生期の野生型マウス中枢神経系における RECK の発現部位は、神経幹・前駆細胞とされる Nestin 陽性細胞と一致する。そこで、RECK 欠損マウスの中枢神経系の発生を詳細に解析したところ、神経幹・前駆細胞の早熟分化が起こっており、これに符合して、神経幹細胞数の著しい減少が観察された。これらの表現型は Notch シグナルを構成する遺伝子群が欠損した場合の表現型と酷似しており、実際に RECK 欠損マウスでは活性化 Notch の減少が観察された。RECK 欠損マウスから採取し、培養した神経幹細胞に恒常的活性化型 Notch をレトロウイルスで導入した場合、また培養液中にメタロプロテアーゼ ADAM10 の阻害剤を加えた場合に、その幹細胞能が回復した。また、野生型マウス由来の神経幹細胞を培養し、RECK の発現を shRNA により抑制すると、神経分化の促進ならびに Notch リガンドである Delta の ADAM10 依存的な切断の亢進が認められた。このような表現型は、恒常的活性化型 Notch ならびに ADAM10 shRNA の導入によって回復した。同様に、胎仔脳室内に RECK shRNA を子宮内電気穿孔法を用いて導入すると、導入された神経幹細胞の多くが神経に分化しており、同時に ADAM10 shRNA を導入した際にはこのような神経分化促進はみられなかった。さらに、精製した RECK、ADAM10、Delta を用いた生化学的実験により、RECK が直接 ADAM10 の Delta 切断活性を抑えることが判明した。これらの知見により、RECK が ADAM10 の生理的阻害因子であること、Notch シグナルの上流に存在する制御因子であること、そして大脳・中枢神経発生の重要な制御因子であることが示された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

RECK 欠損マウスは、胎生 10.5 日前後で死亡するが、RECK の発生における役割については不明の点が多い。申請者らは、

胎生期中枢神経系発生における RECK の役割を解析し、以下の知見を得た：

- 1) *RECK* 欠損マウス 10 日胚の中枢神経系において、神経前駆細胞の早熟分化、幹細胞マーカー *nestin* の減弱、活性化 Notch の減少が見られた。
- 2) 培養系およびマウス個体において、*RECK* shRNA は、野生型神経前駆細胞の早熟分化を誘導し、この表現型は、活性化型 Notch や ADAM10 shRNA の導入により抑制された。
- 3) *RECK* shRNA は、Notch リガンド Delta の切断亢進を誘導した。また、この切断は内在性 ADAM10 に依存していた。
- 4) 組換え体 RECK、ADAM10、Delta タンパク質を用いた試験管内実験において、RECK は、ADAM10 による Delta 切断を直接阻害した。
- 5) *RECK* は、Notch リガンドと共に発現させると、細胞間 Notch シグナル伝達を促進した。

これらの結果は、RECK が ADAM10 による Delta 切断を抑制し、Notch の活性化を可能にすること、また、この機構が中枢神経系発生に必須であることを示唆する。

以上の研究は、Notch シグナル伝達系の新たな制御機構を明らかにしたものであり、分子医学の進歩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 19 年 7 月 4 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。