

京都大学	博士（薬学）	氏名	松田 賢
論文題目	ミクログリア及び成体神経幹細胞からのニューロン新生を制御する因子に関する研究		
（論文内容の要旨） 難治性の精神・神経変性疾患の根本治療に向けて、中枢神経系に内在する幹細胞を源とした再生医療が注目されている。この戦略は、障害を受けたニューロンや失われた神経回路を非侵襲的かつオンデマンドに構築し、修復する可能性に基づく。ただし、新生したニューロンの生理的役割には未解明の部分が多い上、内在性細胞の賦活を薬剤の適用により実現するには、ニューロン新生の機序を発生学的に明らかにする必要がある。そこで著者は、ミクログリアからニューロン様細胞の誘導およびその機序、さらに成体神経幹細胞からのニューロン新生の機序について研究を進め、以下の新知見を得た。 第一章 ミクログリアから機能的ニューロンへの分化転換 ミクログリアがニューロンへ分化転換する事実は知られていたが、転換したニューロン様細胞の生理的機能については全く不明であった。そこでまずラット大脳皮質由来ミクログリアを高濃度の血清に曝露させて分化転換の事実を確認した後、神経伝達物質の生成能の獲得について調べた。その結果、ミクログリアに由来する MAP2 陽性ニューロン様細胞の約 50%が神経伝達物質の GABA、およびその合成酵素である glutamate decarboxylase^{65/67} を有することが明らかとなった。次に、分化転換後の細胞の電気生理学的性質について検討した。分化転換後の細胞は脱分極刺激を受けると電位依存性 Ca²⁺チャネルを介した Ca²⁺流入応答を示し、さらに電位依存性 Na⁺チャネルによる活動電位が誘発され、その波形は通常のニューロンによるものと類似していた。以上の結果より、分化転換後のミクログリアは GABA 作動性であり、電気生理学的にもニューロンとしての機能を十分に有していることを明らかにした。 第二章 ミクログリアからニューロンへの分化転換の機序 続いてミクログリアの分化転換を制御する分子機序について検討を行った。bone morphogenetic protein (BMP) アンタゴニストである noggin の添加により、血清による分化転換の誘導は抑制され、一方、BMP-2,4 の適用により血清の作用が再現された。さらに、血清やBMPの処置により、一過性の Smad シグナリングの活性化およびInhibitor of DNA binding 2 (Id2) の発現上昇が確認された。Smad4、Id2 のノックダウンによって分化転換がほぼ完全に抑制された。以上から、血清中の BMP が Smad シグナリングを活性化し、Id2 の発現を誘導することでミクログリアの分化転換を惹起することが明らかになった。 第三章 成体マウス海馬におけるニューロン新生の機序 成体神経幹細胞の増殖や分化を制御する機序については未だ深く知られていない。そこで、ニワトリ胎仔脊髄でニューロン新生を誘導すると報告されている転写因子の			

SRY-box containing gene 21 (Sox21) に注目し、成体マウス海馬・歯状回におけるニューロン新生への関与を *in vivo* で検討した。Sox21 ノックアウトマウスでは野生型と比較して有意に成体ニューロン新生の効率が低下しており、また、fatty acid binding protein 7 陽性の神経前駆細胞数が異常に増加していた。一方で、歯状回に存在する神経前駆細胞への Sox21 の強制発現はニューロンへの分化を亢進した。従って、Sox21 は成体マウス海馬でニューロン新生を促進する役割を担うことが示唆された。

次に、分化促進に関わる Sox21 の下流メカニズムを検討するため、全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンスを行い、神経前駆細胞における Sox21 の標的遺伝子を網羅的に調べた。その結果、Notch シグナリングの下流因子である *Hairy and enhancer of split 5 (Hes5)* が Sox21 の標的遺伝子の一つである事を見出した。レポーター実験によって、Sox21 が Hes5 遺伝子の発現を転写レベルで抑制する事が明らかとなった。また、成体マウス歯状回での Hes5 の強制発現は Sox21 によるニューロン分化亢進作用を抑制し、Hes5 のノックダウンはニューロン分化を誘導した。以上の結果から、Sox21 は Hes5 の発現を抑制することにより前駆細胞からニューロンへの分化を促し、成体マウス歯状回での恒常的なニューロン新生に貢献していることが見出された。

以上、著者はミクログリアから誘導した細胞のニューロンとしての機能、BMP によるミクログリアの分化転換作用、および Sox21 による成体神経前駆細胞からニューロンへの分化制御機構を明らかにした。本研究の成果は、神経発生の研究に強く貢献するだけでなく、将来的に神経再生治療の臨床応用、薬剤開発への道を拓く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)

難治性の精神・神経変性疾患の根本治療に向けて、中枢神経系に内在する幹細胞を源とした再生医療が注目されている。この戦略は、障害を受けたニューロンや失われた神経回路を非侵襲的かつオンデマンドに構築し、修復する可能性に基づく。ただし、新生したニューロンの生理的役割には未解明の部分が多いうえに、内在性細胞の賦活を薬剤の適用により実現するにはニューロン新生の機序を発生学的に明らかにする必要がある。そこで申請者は、ミクログリアからニューロン様細胞の誘導およびその機序、さらに成体神経幹細胞からのニューロン新生の機序について研究を進め、以下の新知見を得た。

第一章 ミクログリアから機能的ニューロンへの分化転換

ミクログリアがニューロンへ分化転換する事実は知られていたが、転換したニューロン様細胞の生理的機能については全く不明であった。そこでまずラット大脳皮質由来ミクログリアを高濃度の血清に曝露させて分化転換の事実を確認した後、神経伝達物質の生成能の獲得について調べた。その結果、ミクログリアに由来する MAP2 陽性ニューロン様細胞の約 50%が神経伝達物質の GABA およびその合成酵素である glutamate decarboxylase_{65/67} を有することが明らかとなった。次いで、分化転換後の細胞の電気生理学的性質について検討した。分化転換後の細胞は脱分極刺激を受けると電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介した Ca^{2+} 流入応答を示し、さらに電位依存性 Na^{+} チャネルによる活動電位が誘発され、その波形は通常のニューロンによるものと類似していた。以上の結果より、分化転換後のミクログリアは GABA 作動性であり、電気生理学的にもニューロンとしての機能を十分に有していることを明らかにした。

第二章 ミクログリアからニューロンへの分化転換の機序

ミクログリアの分化転換を制御する分子機序について検討を行った。bone morphogenetic protein (BMP) アンタゴニストである noggin の添加により、血清による分化転換の誘導は抑制され、一方、BMP-2,4 の適用により血清の作用が再現された。さらに、血清や BMP の処置により、一過性の Smad シグナリングの活性化および Inhibitor of DNA binding 2 (Id2) の発現上昇が確認された。Smad4、Id2 のノックダウンによっては分化転換がほぼ完全に抑制された。以上の結果から、血清中の BMP が Smad シグナリングを活性化し、Id2 の発現を誘導することでミクログリアの分化転換を惹起することが明らかになった。

第三章 成体マウス海馬におけるニューロン新生の機序

成体神経幹細胞の増殖や分化を制御する機序については未だ深く知られていない。そこで、ニワトリ胎仔脊髄でニューロン新生を誘導すると報告されている転写因子の SRY-box containing gene 21 (Sox21) に注目し、成体マウス海馬・歯状回におけるニューロン新生への関与を *in vivo* で検討した。Sox21 ノックアウトマウスでは野生型と比較して有意に成体ニューロン新生の効率が低下しており、fatty acid binding protein 7 陽性の神経前駆細胞数が異常に増加していた。一方で、歯状回に存在する神経前駆細胞への

Sox21 の強制発現はニューロンへの分化を亢進した。従って、Sox21 は成体マウス海馬でニューロン新生を促進する役割を担うことが示唆された。

分化促進に関わる Sox21 の下流メカニズムを検討するため、全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンスを行い、神経前駆細胞における Sox21 の標的遺伝子を網羅的に調べた。その結果、Notch シグナリングの下流因子である *Hairy and enhancer of split 5 (Hes5)* が Sox21 の標的遺伝子の一つである事を見出した。レポーター実験によって、Sox21 が *Hes5* 遺伝子の発現を転写レベルで抑制する事が明らかとなった。また、成体マウス歯状回での Hes5 の強制発現は Sox21 によるニューロン分化亢進作用を抑制し、Hes5 のノックダウンはニューロン分化を誘導した。以上の結果から、Sox21 は *Hes5* の発現を抑制することにより前駆細胞からニューロンへの分化を促し、成体マウス歯状回での恒常的なニューロン新生に貢献することが見出された。

以上、申請者はミクログリアから誘導した細胞のニューロンとしての機能、BMP によるミクログリアの分化転換作用、および Sox21 による成体神経前駆細胞からニューロンへの分化制御機構を明らかにした。本研究の成果は、神経発生の研究に強く貢献するだけでなく、将来的に神経再生治療の臨床応用、薬剤開発への道を拓く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 22 年 2 月 23 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