

論 文 要 旨

bFGF endows dorsal telencephalic neural progenitors with ability to differentiate into oligodendrocytes but not GABAergic neurons

bFGF による胎生期神経上皮細胞の背腹軸運命決定機構

～bFGF は終脳背側神経前駆細胞のオリゴデンドロサイトへの分化を促進するが、GABA 作働性ニューロンへの分化は促進しない～

精 松 昌 彦

【序論および目的】

中枢神経系における前後・左右・背腹の軸に沿った生物の発生過程は、それぞれの領域特異的な転写因子が発現することによって制御されている。オリゴデンドロサイトの発生に重要な bHLH 型転写因子である Olig2 はマウス胎生 14 日目の終脳において腹側（基底核 Ganglionic eminence）のみに発現しており、背側（皮質 Cortex）では発現していない。しかし今回我々は終脳皮質由来神経上皮細胞を、一般的に中枢神経細胞培養時に用いられている栄養因子である bFGF 存在下で培養することで、元々 Olig2 を発現していないこの細胞群において約 70%もの Olig2 陽性細胞が出現することを発見した。この論文では終脳の腹側と背側の細胞を bFGF 存在下で別々に培養することによって領域特異的な細胞の性質がどのように変化するか検証した。

【材料および方法】

1. E14 終脳における Olig2 遺伝子の発現パターンを In situ hybridization 法で確認した。
2. E14 終脳の腹側（Ganglionic eminence を含む領域）と背側（Cortex 部分）の細胞を bFGF 存在下で培養して Olig2 の発現を検証した。
3. 腹側由来・背側由来の細胞群間で増殖している細胞の割合、アポトーシスを起こしている細胞の割合に違いがないか調べた。
4. 背側由来の細胞群からも腹側同様にオリゴデンドロサイトへの分化が見られるかを調べた。
5. Olig2 以外のエリア特異的に発現している遺伝子の発現パターンがどのように変化するかを調べた。
6. Olig2 同様に胎生中期に腹側に発現している GABA 作働性ニューロンの割合が背側由来の細胞群において増加するかどうかを調べた。

【結果】

1. E14 終脳において Olig2 は、そのほとんどが腹側（Ganglionic eminence）に発現していた。
2. E14 終脳の腹側（Ganglionic eminence を含む領域）と背側（Cortex 部分）の細胞をそ

れぞれ bFGF 存在下で4日間培養すると、元々Olig2を発現していない背側由来の細胞群において約70%ものOlig2陽性細胞が出現した。

3. BrdUを用いてS期の細胞をラベリングしたが、E14終脳腹側・背側由来の細胞群間でBrdU陽性細胞の割合はOlig2陽性細胞、陰性細胞いずれにおいても明らかな差はなかった。また、TUNEL染色にてアポトーシスを起こしている細胞の有無を評価したが、腹側・背側由来の細胞群間でTUNEL陽性細胞の割合はOlig2陽性細胞、陰性細胞いずれにおいても明らかな差はなかった。これらのことから、元々Olig2を発現していなかった背側由来の神経幹細胞の多くがOlig2の発現を獲得したことが考えられる。

4. 背側由来の細胞群からも腹側由来の細胞群と同程度にO4陽性のオリゴデンドロサイトが出現した。このことから、本来発現していないOlig2の発現を獲得した背側由来の細胞はオリゴデンドロサイトへの分化能も持っていることが示された。

5. 上記結果はbFGFに背側の神経上皮細胞の性質を腹側化させる働きがある可能性を示唆していると思われる。そこで、神経上皮細胞におけるOlig2以外のエリア特異的マーカー遺伝子についても、その発現パターンについて調べてみた。腹側の神経上皮細胞のマーカーであるMash1もOlig2と同様にbFGF存在下の培養で誘導された。驚いたことに背側の神経上皮マーカーであるNeurogenin1、Neurogenin2、Pax6、Emx2の発現は、bFGF存在下で培養すると低下していることが確認され、このことからbFGFに腹側化させる働きがある可能性が示唆された。

6. 上記結果同様に腹側由来のニューロンであるGABA作働性ニューロンやその前駆細胞も、bFGF存在下で培養することにより誘導されるかを試みた。しかしながらGABAニューロン特異的なマーカー遺伝子の発現パターンに変化はなく、皮質由来の細胞群から基底核由来の細胞群と同程度のGABA作働性ニューロンが出現することはなかった。このことからニューロンとグリア細胞では背腹の性質決定のメカニズムに違いがあることが考えられた。

【結論および考察】

1. bFGFを含む培養条件下では元々Olig2を発現していない背側由来の細胞群においてOlig2陽性細胞が高頻度に出現した。

2. 上記培養条件により腹側同様、背側由来の細胞群から高頻度にオリゴデンドロサイトへの分化が見られた。

3. 他のエリア特異的マーカー遺伝子の発現パターンの変化からも、bFGFに腹側化させる働きがある可能性が示唆された。

4. ニューロンとグリア細胞では背腹の性質決定のメカニズムに違いがあると考えられる。

論文審査の要旨

報告番号	医研第 613 号	氏名	精松 昌彦
審査委員	主査	納 光弘	
	副査	亀山 正樹	宮田 篤郎

bFGF endows dorsal telencephalic neural progenitors with ability to differentiate into oligodendrocytes but not GABAergic neurons

(bFGF は終脳背側神経前駆細胞のオリゴデンドロサイトへの分化を促進するが、GABA 作働性ニューロンへの分化は促進しない)

中枢神経系における前後・左右・背腹の軸に沿った生物の発生過程は、それぞれの領域特異的な転写因子が発現することによって制御されている。オリゴデンドロサイトの発生に重要な転写因子である *olig2* はマウス胎生 14.5 日目の終脳において腹側（基底核原基 ganglionic eminence (GE)）のみに発現しており、背側（皮質 cortex）では発現していない。しかし今回我々は終脳皮質由来神経上皮細胞を、一般的に中枢神経細胞培養時に用いられている栄養因子である basic fibroblast growth factor (bFGF) 存在下で培養することで、元々 *olig2* を発現していないこの細胞群から約 70%もの *olig2* 陽性細胞が出現することを発見した。本研究では終脳の腹側と背側の細胞を bFGF 存在下で別々に培養することによって領域特異的な細胞の性質がどのように変化するか検証し、以下の結果が得られた。

1. 胎生 14.5 日目(E14.5)終脳において *olig2* は、そのほとんどが腹側（GE）に発現していた。
2. E14.5 終脳の腹側（GE を含む領域）と背側（cortex 部分）の細胞をそれぞれ bFGF 存在下で 4 日間培養すると、元々 *olig2* を発現していない背側由来の細胞群において約 70%もの *olig2* 陽性細胞が出現した。
3. BrdU を用いて S 期の細胞をラベリングしたが、終脳腹側・背側由来の細胞群間で BrdU 陽性細胞の割合は *olig2* 陽性細胞、陰性細胞いずれにおいても明らかな差はなかった。また、TUNEL 染色にてアポトーシスを起こしている細胞の有無を評価したが、腹側・背側由来の細胞群間で TUNEL 陽性細胞の割合は *olig2* 陽性細胞、陰性細胞いずれにおいても明らかな差はなかった。これらのことから、元々 *olig2* を発現していなかった背側由来の神経幹細胞の多くが *olig2* の発現を獲得したことが考えられる。
4. 背側由来の細胞群からも腹側由来の細胞群と同程度にオリゴデンドロサイトのマーカーである O4 染色陽性細胞が出現した。このことから、本来発現していない *olig2* の発現を獲得した背側由来の細胞はオリゴデンドロサイトへの分化能も持っていることが示された。
5. 上記結果は bFGF に背側の神経上皮細胞の性質を腹側化させる働きがある可能性を示唆していると思われる。そこで、神経上皮細胞における *olig2* 以外のエリア特異的マーカー遺伝子についても、その発現パターンについて調べてみた。腹側の神経上皮細胞のマーカーである *mash1* も *olig2* と同様に bFGF 存在下の培養で誘導された。驚いたことに背側の神経上皮マーカーである *neurogenin1*、*neurogenin2*、*pax6*、*emx2* の発現は、bFGF 存在下で培養すると低下していることが確認され、このことから bFGF に腹側化させる働きがある可能性が示唆された。
6. 上記結果同様に腹側由来のニューロンである GABA 作働性ニューロンやその前駆細胞も、bFGF 存在下で培養することにより誘導されるかを試みた。しかしながら GABA ニューロン特異的なマーカー遺伝子の発現パターンに変化はなく、皮質由来の細胞群から基底核由来の細胞群と同程度の GABA 作働性ニューロンが出現することはなかった。このことからニューロンとグリア細胞では背腹の性質決定のメカニズムに違いがあることが考えられた。

以上のように、本研究は bFGF の背側由来細胞の腹側化という新規な機能を明らかにしたことから、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 613 号	氏名	精松 昌彦
審査委員	主 査	納 光弘	
	副 査	亀山 正樹	宮田 篤郎
<p>主査および副査の3名は、平成18年2月2日、学位請求者 精松昌彦君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問 1) 発生過程における終脳背側・腹側に存在するオリゴデンドロサイトの性質に違いはあるのか。</p> <p>(回答) オリゴデンドロサイトは終脳背側・腹側いずれの部位でも典型的な形態を示し、神経軸索を取り巻くように髄鞘を形成するといわれており、終脳背側と腹側で明らかな性質の違いはないといわれている。</p> <p>質問 2) なぜ bFGF (basic fibroblast growth factor)に着目してその分化に対する影響を調べてみようと思ったのか。</p> <p>(回答) 一般的に神経幹細胞の分化制御機構について調べるとき、材料としてマウス胎児の脳を取り出し、bFGF を含む培養液を用いて単層培養を行う。この一般的な培養条件下で驚いたことに、ごく限られた細胞でしか発現していないはずの Olig2 が約 90%の細胞で発現していることを見出し、より詳細な bFGF の効果を検討しようと考えた。</p> <p>質問 3) bFGF に加え bone morphogenetic protein (BMP) 2 を添加すると cortex 由来の細胞群における dlx2 の発現が上昇しているが、BMP2 を単独投与するとどうなるか。</p> <p>(回答) 非常に興味深い事項である。BMP2 の単独投与実験を行ったことがあるが、BMP2 は bFGF に比べマイトーゲンとしての活性が低く、この培養系では残念ながら細胞の生存能力が極端に低下したため解析不可能だった。</p> <p>質問 4) 神経発生過程における脳内で、bFGF は生理的にどのようなはたらきをしているのか。</p> <p>(回答) bFGF は神経幹細胞の未分化状態を維持しながらマイトーゲンとしてののはたらきを担っているといわれている。bFGF ノックアウトマウスでは神経幹細胞が多く存在する脳室周囲の脳室下層の細胞数が著明に減少し、cortex におけるニューロン・グリア細胞の数が減少したという報告がある。これらのことから、bFGF は発生過程における神経幹細胞の増殖と成長に重要な役割を果たしていると考えられる。</p> <p>質問 5) 今回の培養実験では正常発生と比べ、オリゴデンドロサイトの発現の分布が異なるが、どのような理由が考えられるか。</p> <p>(回答) 正常発生において bFGF は脳脊髄液中に比較的高い濃度で存在しているといわれている。脳室内脈絡叢から産生される脳脊髄液中には bFGF をはじめ様々な因子が分泌されているが、それらの因子は脳脊髄液の流れに沿って脈絡叢付近から前方の嗅球に向かって濃度勾配を形成し、神経発生に重要な役割を果たしているという報告がある。olig2 は ganglionic eminence (GE) の他に嗅球にも発現が見られることから、bFGF の濃度勾配に依存して発現部位が決定されている可能性が考えられる。また、脳内には bFGF のみならず、</p>			

腹側の脊索から分泌される sonic hedgehog や背側に発現の多い BMP や dorsalin も背側・腹側の性質決定に重要な役割を果たしているといわれており、それらの濃度勾配に応じて精密に分化制御されている。今回の実験では bFGF の作用を単独で評価するためにあえて他の因子を添加せずに実験を展開した。

質問 6) 細胞同士の接着は神経分化に影響を与えないか。

(回答) 細胞接着が分化に与える影響については様々な報告がある。今回の実験では比較的粗な細胞密度で培養したり、また逆に非常に密に培養して検証したが、いずれの方法でも olig2 が著明に誘導された。Sphere culture (3次元培養) にて olig2 の誘導を評価した報告では olig2 陽性細胞の出現率が 18.5~35.1%と比較的低いが、bFGF 存在下では非存在下と比較して olig2 陽性細胞が多く誘導されている。これらのことにより今回の実験で得られた bFGF の効果は細胞密度にかかわらず、観察されることが分かる。

質問 7) Fig. 7 で、bFGF 処理をすると GE における γ -aminobutyric acid (GABA) 作働性ニューロンの割合が減少しているがその理由としてどのようなことが考えられるか。

(回答) 二つの可能性が考えられる。一つは bFGF に GABA 作働性ニューロンへの分化を抑制するはたらきがある可能性が考えられる。もう一つは bFGF の影響で細胞がより未分化な状態を維持し、GABA 作働性ニューロンへと分化しきれなかった可能性が考えられる。

質問 8) この実験結果から再生治療への応用としてどんなことが考えられるか。

(回答) 脊髄損傷や脳梗塞などの疾患では損傷部位の脱髄・変性ととともにグリア性瘢痕(アストロサイト)の著明な増殖が見られ、これが新生ニューロン・オリゴデンドロサイトの増殖や損傷脊髄の修復を妨げることが知られている。この実験では olig2 を発現した細胞群からオリゴデンドロサイトへの分化が多く見られ、他の報告では運動ニューロンへの分化も促進し、アストロサイトへの分化を抑制することが指摘されている。このことから、olig2 を発現した神経幹細胞を損傷脊髄に移植したときにそれらの細胞がアストロサイトへの分化を抑制しつつ、オリゴデンドロサイトやニューロンによる修復を促進し、運動機能の改善が見られる可能性が考えられる。

さらに、アストロサイトへの分化を促進することで知られる BMP2 のインヒビターである noggin やアストロサイトへの分化を抑制することで知られる smad6, smad7 を用いて実験を行っている。生体内での効率的な分化を実現するために、テトラサイクリン存在下では遺伝子は発現せず、非存在下では遺伝子が発現する、tet off system を併用したレトロウイルスベクターを用いている。このシステムを用いて noggin, smad6, smad7 をテトラサイクリン存在下で神経幹細胞に発現させ、損傷脊髄への移植に利用している。移植された細胞はテトラサイクリンが存在しない生体内に移植されると、その瞬間からこれらの遺伝子を発現し始め、グリア性瘢痕の原因となるアストロサイトへの分化を抑制しつつ、新生ニューロン・オリゴデンドロサイトへの分化を促進させることが期待できる。その結果、より大きな下肢機能の改善が見られる可能性があり、現在詳細に検討中である。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。