

論文内容の要旨

申請者氏名 浅野 弘嗣

哺乳類中枢神経系を構成する主要な細胞種であるニューロン・アストロサイト・オリゴデンドロサイトは共通の神経幹細胞から分化・産生される。神経幹細胞の分化はサイトカイン等の細胞外因子と、エピジェネティクス機構等の細胞内在性プログラムの協調的作用により制御されていることが明らかにされつつある。しかし、これらがどのように関連し中枢神経系の発生・分化を制御しているのかについては未だ不明な点が多い。近年、核内受容体の一つであるレチノイン酸 (RA) 受容体を介した RA によるクロマチン構造変換が報告されているが、その中枢神経系の発生における神経幹細胞の分化制御機構メカニズムへの関与についてはほとんどわかっていない。そこで我々は、胎生期神経幹細胞の分化制御における RA の関与について検討した。

マウス胎仔終脳由来神経上皮細胞を、RA 及びアストロサイト分化誘導性サイトカイン (LIF) との共存下で培養し、免疫染色により分化傾向を観察した。その結果、RA 単独添加ではアストロサイト特異的蛋白質 GFAP 陽性細胞は確認されなかった。しかしながら、LIF 単独添加と比較し、RA と LIF の同時添加において GFAP 陽性細胞の劇的な増加が観察された。さらに、*gfap* 発現制御機構を解析するために、*gfap* プロモーターを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、RA と LIF を同時に添加した細胞群では、単独添加群と比較し、相乗的な *gfap* プロモーターの活性化が見られた。また、*gfap* プロモーター上に RA 受容体応答配列の存在が確認され、その配列への点変異の導入により RA と LIF による相乗的な *gfap* プロモーターの活性化は認められなくなった。次に、*gfap* プロモーター上のヒストン修飾状態を解析するために、アセチル化ヒストンを特異的に認識する抗体を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法を行った。その結果、RA は、*gfap* プロモーターのヒストンアセチル化を亢進することがわかった。さらに、*gfap* プロモーターへの STAT3 の結合の変化を検討したところ、RA と LIF の同時添加は、LIF 単独添加に比べ *gfap* プロモーターへの STAT3 結合の増強が確認された。また、ヒストン脱アセチル化酵素を阻害し、ヒストンアセチル化を亢進することが知られているバルプロ酸 (VPA) を神経上皮細胞へ添加することにより、RA 添加と同様に、LIF による神経幹細胞のアストロサイト分化を促進した。さらに、VPA により *gfap* プロモーター上のヒストンアセチル化が亢進していることを確認するために、アセチル化ヒストンを特異的に認識する抗体を用いて ChIP 法を行った。その結果、VPA により *gfap* プロモーター上のヒストンアセチル化も亢進していることが確認された。さらに、VPA と LIF を同時に添加した場合、RA と LIF の同時添加の場合と同様に、LIF 単独添加に比べ *gfap* プロモーターへの STAT3 結合の増強が確認された。これらの結果は、RA によるヒストンアセチル化の亢進が神経幹細胞のアストロサイト分化を促進していることを示唆する結果となった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 浅野 弘嗣

哺乳類中枢神経系は、ニューロンとその細胞を支持するアストロサイトやオリゴデンドロサイトといったグリア細胞が巨大な神経ネットワークを構築することで高度な情報処理を行っている。これらニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトは共通の神経幹細胞から分化・産生される。神経幹細胞の細胞系譜の決定は、サイトカイン等の細胞外因子と、エピジェネティクス機構等の細胞内在性プログラムの協調的作用により制御されていることが知られつつあるが完全には明らかにされていない。

DNA メチル化やヒストン修飾によるクロマチン構造変換等のエピジェネティクス機構は、細胞・組織特異的な遺伝子発現を制御していると言われていた。これらクロマチン構造変換を伴う転写制御因子としてレチノイン酸 (RA) が挙げられる。RA は細胞内の多くの遺伝子のヒストンアセチル化を亢進すると共に、神経発生を含む様々な発生過程で重要な役割を果たしている事が分かっている。そこで本研究課題は、神経幹細胞の分化制御機構への RA の関与と、そのヒストンアセチル化の亢進による遺伝子転写促進作用の分子基盤の解明を目的としている。

申請者は、胎生期神経幹細胞のアストロサイト分化への RA の関与を検討するために、RA 及びアストロサイト分化誘導因子 LIF 存在下で培養を行った後、アストロサイト特異的タンパク質 GFAP の特異的抗体を用いた免疫染色法により分化傾向を観察した。その結果、RA は LIF 誘導性アストロサイト分化の促進作用が観察された。また、RA と LIF は *gfap* プロモーターを相乗的に活性化し、その相乗効果には、LIF の下流転写因子 STAT3 の活性化及び、認識配列への結合が必須であることを明らかにした。次に、RA 受容体 (RAR) を介した RA シグナルが、この相乗効果へのどのように関与しているかを検討した。申請者は、*gfap* プロモーター上の RA 受容体応答配列 (RARE) を発見すると共に、この RARE が *gfap* プロモーターの相乗的活性化に関与していることを明らかにした。さらに ChIP 法による結果から、RA は *gfap* プロモーターのヒストンアセチル化が亢進すると共に、STAT3 の認識配列への結合を増強させることを示した。また、HDAC 阻害剤によるヒストンアセチル化の亢進も RA と同様に、STAT3 の認識配列への結合を増強させると共に、LIF による GFAP 陽性アストロサイト分化を促進することを明らかにした。これらの結果は、RA によるヒストンアセチル化の亢進が神経幹細胞のアストロサイト分化を促進していることを示唆する結果となった。

以上のように、本論文は RA の神経発生での作用機序の一部を解明しただけではなく、全細胞で普遍的機構であるエピジェネティクスによる転写制御機構の解明につながるもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。