

論文内容の要旨

申請者氏名 野口浩史

哺乳類の脳形成は、ニューロン産生、次いでアストロサイト、オリゴデンドロサイト産生が発生段階依存的に進行することで行われる。また、脳形成終了後の成体脳においても神経幹細胞は消失することなく維持され、胎生期とは異なる成体独自の分化・増殖能を以て、脳高次機能の発揮に貢献する。このような発生進行に伴う神経幹細胞の性質変化には、エピジェネティクス機構の寄与が示唆されているが、その作用機序には不明な点が多い。本稿では、発生に必須なエピジェネティクス機構の一つである DNA メチル化を制御する因子、維持型 DNA メチル化酵素 DNA methyltransferase 1 (DNMT1) に着目し、発生期から成体まで通して、各時期の神経幹細胞における機能解析を行い、それらの性質を制御する機構の解明を目指した。

脳形成過程の神経幹細胞における DNMT1 の機能解析を行った結果、DNMT1 はこれまでに明らかにされていたニューロン産生期におけるアストロサイト分化抑制作用に加えて、アストロサイト産生期である発生後期では、ニューロン分化を抑制することが明らかになった。また、このニューロン分化抑制作用は、DNA メチル化活性非依存的に行われていることが示唆された。質量分析装置を用いて DNMT1 の相互作用因子を同定した結果、DNMT1 は発生後期特異的にニューロン分化抑制因子である RE1-Silencing Transcription factor (REST) と相互作用することが認められた。発生後期神経幹細胞において DNMT1 が制御している遺伝子群には REST の標的遺伝子が多く含まれていたことから、DNMT1 は REST との相互作用を介して DNA メチル化活性非依存的にニューロン分化を抑制していることが示唆された。

神経幹細胞は発生期から成体へと維持されていく過程で増殖能が低下し、静止状態を形成する。そこで次に、神経幹細胞が生涯を通して維持されている海馬歯状回に着目し、その領域に維持されていく神経幹細胞における DNMT1 の機能解析を行った。*Dnmt1* の欠損を海馬歯状回発生開始時の神経幹細胞に誘導したところ、神経幹細胞の遊走と、突起形成が損なわれ、結果として海馬歯状回の形成不全が引き起こされた。また、このような発生過程を経て成体へと維持された神経幹細胞は、著しく増殖能が低下し、過剰に静止状態が形成されていた。*Dnmt1* の欠損により、細胞増殖を抑制するサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21、p57 の発現上昇が認められたことから、発生過程の神経幹細胞において DNMT1 はこれらの発現を抑制することで、神経幹細胞の過度な静止状態の形成を抑制していることが示唆された。次に、成体へと維持された神経幹細胞における DNMT1 の機能解析を行った結果、その増殖や分化には影響が及ばされなかったが、分化後のニューロンの生存に重要であることが示された。

以上の結果より、神経発生過程において DNMT1 は多面的な役割を担っており、脳形成過程では神経幹細胞示す発生過程依存的な分化性質の制御に、そして、成体へと維持されていく過程では神経幹細胞の増殖性質の制御に貢献して、静止状態の形成に寄与していることが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 野口浩史

神経幹細胞は発生期のみならず、成体においても失われることなく維持されている。しかし、各発生段階の神経幹細胞や、成体において維持されている神経幹細胞が呈する分化・増殖における性質は互いに異なり、中枢神経系の構築過程には発生依存的な分化性質の変化を、成体へと維持されていく過程では、増殖能の変化が引き起こされる。これは、神経幹細胞の性質が各発生段階で厳密な制御を受けていることを示しているが、その制御機構には未だ不明な点が多い。その解明に向けて申請者は、幹細胞の分化・増殖制御に重要な役割を担っているエピジェネティクス機構に着目して研究を展開し、DNAメチル化を制御し、神経発生に必須な因子として知られる維持型 DNAメチル化酵素 DNA methyltransferase 1 (DNMT1) の各発生段階の神経幹細胞における機能解析を行った。

発生過程において神経幹細胞の分化性質は、発生段階依存的に変化し、発生の進行とともにニューロン産生からアストロサイト産生へと進行していく。これまでに、DNMT1 がニューロン産生期において神経幹細胞のアストロサイトへの早期分化を DNA のメチル化を介して抑制していることが明らかとなっていたが、申請者はこれに加えてアストロサイト産生期ではニューロンへの分化を抑制していることを明らかにした。また、この際に DNMT1 が DNAメチル化活性非依存的な機構でニューロン分化を抑制していることを示唆する結果も得ており、その作用機序として、DNMT1 がアストロサイト産生時期特異的にニューロン分化抑制因子である RE1-Silencing Transcription factor (REST) と相互作用することで、協調して REST の標的遺伝子の発現を抑制するという可能性を示した。

これに加えて、申請者は神経幹細胞が成体においても維持されている海馬歯状回の発生過程に着目して、その過程の神経幹細胞における DNMT1 の機能解析を行い、DNMT1 がその発生過程と、神経幹細胞の増殖能の制御に DNAメチル化活性依存的な機構と、非依存的な機構を介して貢献していることを明らかにした。成体へと神経幹細胞が維持されていく過程で、神経幹細胞は増殖能を低下させて行く。申請者は、DNMT1 がこの過程の神経幹細胞において、細胞増殖を抑制する p21、p57 の発現を抑制しており、成体へと維持されていく過程でそれらが過剰に発現されることで、過度に増殖能が失われないように神経幹細胞の増殖を制御していることを見出した。一方、成体へと維持された神経幹細胞では、DNMT1 は増殖能や、分化能の制御ではなく、ニューロンへと分化した際の生存に重要であることを明らかにしている。

以上のように、本論文は神経発生過程の神経幹細胞における DNMT1 の機能解析を行い、各発生時期の神経幹細胞の分化・増殖能を制御する分子メカニズムにおける DNMT1 及びエピジェネティクス機構の重要性を示唆したものであり、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。