

論文内容の要旨

申請者氏名 八 塚 敦 輝

神経管に存在する様々な神経細胞は、発生過程において適切な領域に配置（パターン形成）されることにより機能を発揮する。神経管の背腹軸のパターン形成においては、モルフォゲンと呼ばれる分泌因子が重要な働きをしており、特にソニック・ヘッジホッグ（Sonic Hedgehog Shh）は濃度依存的に腹側神経前駆細胞の分化方向を決定する。Shh が神経前駆細胞に作用すると、細胞内では転写因子 Gli2/3 が活性化され、これが Shh の細胞内シグナルとして反映される。Shh シグナルを受容した神経前駆細胞においては、Shh シグナルの活性は一時的に高まるが、その後経時的に減衰することが報告されており、負のフィードバック制御の存在が示唆されてきたが、その分子基盤は明らかではなかった。

本研究では、Shh シグナルの経時的変化、とりわけ減衰（負のフィードバック）を制御する因子の探索・同定と解析を目的とした。まず、プロテインキナーゼ A（PKA）阻害剤を用いた実験から、神経前駆細胞において Gli 活性が経時的に変化することを見出したため、この活性の上流制御を担う因子の探索を行うこととした。本研究では特に G タンパク質共役受容体に着目し、Shh によって発現誘導されるものを探索して GPR17 を単離した。GPR17 の時間的な発現量の変遷は、Gli 活性の減弱と相補的になっていた。また、ニワトリ胚の神経管腹側において GPR17 は腹側から背側に向かって発現量が勾配を形成していることが明らかになった。この発現パターンはマウス胚においても同様であった。さらに、GPR17 の発現は Shh シグナルによって直接制御されるのではなく、腹側神経管に発現する転写因子 Olig2 を介することも併せて明らかになった。

また強制発現による機能解析により、GPR17 が Shh シグナルのターゲット遺伝子の発現量を減弱し、cAMP の細胞内濃度を上昇することが示された。また、ニワトリ胚神経管において、GPR17 とそのアゴニストである MDL29951 の共役により腹側領域が縮小した。一方、siRNA を用いて GPR17 の発現阻害を行うと腹側神経領域が拡大した。このことから、GPR17 は Shh シグナルに負に働いてパターン形成を調節することが示唆された。さらに、GPR17 が時間依存的に細胞内 Shh シグナルを制御しているかを確認するために、神経前駆細胞における Gli の活性を経時的に測定したところ、siRNA を導入した細胞においては、負のフィードバックにかかる時間が有意に延長しており、GPR17 が Shh シグナルの経時的な活性を制御する因子として重要であることが明らかになった。

以上の結果より、神経管のパターン形成において GPR17 が Shh シグナルに対して時間依存的な負の制御因子として機能することが示された。さらに、この負のフィードバック制御は、パターン形成における各領域の細胞の量的バランスを厳密に制御する上でも重要な役割を持つと考えられた。

やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 八 塚 敦 輝

脊椎動物の中樞神経系の発生は、胚の頭尾軸に沿って形成される神経管と呼ばれる器官が形成されることから開始する。神経管内には運動神経、介在ニューロン、感覚神経とその前駆細胞が順序よく配置されており、その細胞数も種ごとに一定に保たれている。これらの細胞の多様性と整然さを同時に生み出すメカニズムの1つは、モルフォゲンと呼ばれる細胞外シグナル因子である。これらのシグナル因子は器官内で濃度勾配を形成し、その濃度に依存して細胞の運命を決定し、組織内における配置の順序を決定する。

ソニック・ヘッジホッグ (Sonic Hedgehog; Shh) はこのようなモルフォゲンの1つであり、神経管内で主に腹側神経細胞の領域化に必須の役割を担う。これまでの研究から、Shh が濃度勾配を形成して濃度依存的に細胞の分化方向を決定するほか、シグナルの受け手となる前駆細胞において、その細胞内シグナル活性が経時的に変化することが適切な領域化に必要であることが明らかにされてきた。しかし、その経時的な変化を調節する因子は同定されておらず、したがってそのメカニズムについては不明な点が多かった。

本研究においては、申請者は特に G タンパク質共役受容体 (G protein-coupled receptor; GPCR) に着目して Shh シグナルによって発現が誘導される GPCR の探索を行い、GPR17 を候補因子として単離した。

次にマウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞に GPR17 を強制発現したところ、Shh シグナルが減弱することが明らかになり、さらにこれが細胞内 cAMP レベルの上昇を伴っていることが明らかになった。また、GPR17 とそのアゴニストである MDL29951 をニワトリ胚神経管に導入したところ、腹側神経細胞の分化が一部抑制されることが明らかになった。

さらに、siRNA によって GPR17 の発現を阻害したところ、Shh シグナルの負のフィードバック効果が一部抑制され、腹側神経領域が異常拡大する結果となった。これらの結果は、GPR17 が Shh シグナルの下流で発現する一方で、細胞内の cAMP レベルの上昇を促進し、その結果、Shh シグナルの細胞内仲介因子である Gli2/3 の活性を抑制することによって Shh の細胞内シグナルを時間依存的に減弱させる、いわゆる「負のフィードバック効果」を担う必須の因子の1つであることを示したものである。

以上のように、本論文は、シグナル活性の経時的な変化が神経管のパターン形成に及ぼす影響について、そのメカニズムを分子レベルで明らかにしたものであり、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。

やむを得ない事由 [図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()] により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】