

論文内容の要旨

申請者氏名 角谷美典

神経管には様々な機能を持つ細胞が配置されており、それらは位置（パターン）的にも量（細胞数）的にも適切な比率を保ち、全体として統合された機能を発揮する。この比率はモルフォゲンなどによる細胞運命と、前駆細胞の増殖効率の共役により決定される。本研究では、モルフォゲンのうち特にソニック・ヘッジホッグ（Sonic Hedgehog; Shh）による細胞増殖能と、それを領域特異的に抑制する効果について着目し、研究を進めた。

予備的に行った細胞増殖解析から、mTOR シグナルの阻害剤であるラパマイシンを投与した神経管において、細胞増殖の有意な減少がみられたため、Shh と mTOR シグナルの領域特異的な関連を調べることにした。この目的で、mTOR シグナルの下流因子であるリン酸化 p70 (p-p70) やリン酸化リボソームタンパク質 S6 (pS6) の神経管内における局在を調べたところ、底板領域で特異的にこれらのシグナルの減弱が認められ、底板領域特異的な mTOR シグナルの抑制が示唆された。

そこで、領域特異的な増殖効率を調べる上で、特に底板細胞に着目した。神経管内のほとんどの前駆細胞が経時的に細胞数を増加させる中で、底板領域の細胞は増殖効率が低く、発生過程における細胞数の変化がほとんどない。上記の結果から、この増殖抑制が mTOR シグナルの減弱によるものと示唆された。

次に、Shh シグナルの下流で底板領域特異的に発現する転写因子 FoxA2 と細胞増殖ならびに mTOR シグナルの関係を調べたところ、FoxA2 が導入された細胞で、細胞自律的に細胞増殖と mTOR シグナルの活性化の両方が抑制されていた。さらに、FoxA2 の下流因子を探索する目的で、底板領域に分化させた神経前駆細胞において mTOR シグナルの各構成因子の遺伝子を定量 PCR を用いたスクリーニングを行ったところ、FoxA2 によって RNF152 遺伝子が転写誘導されることが明らかになった。

RNF152 は、mTOR シグナルの構成因子である低分子 GTP アーゼ RagA をターゲットとするユビキチンリガーゼをコードし、mTOR シグナルの負の調節因子として働く。RNF152 を神経管内に強制発現することにより細胞増殖が抑制され、さらに RNF152 をターゲットとする siRNA の導入による発現抑制実験により、底板領域細胞の異常な細胞分裂と mTOR シグナルの異所的な活性化が認められる結果となった。これらの結果から、Shh シグナルによって発現誘導される FoxA2 が RNF152 の転写を誘導し、それが RagA を介して mTOR シグナルを抑制することにより、底板領域で特異的に細胞増殖が抑制されるメカニズムが明らかになった。

以上の結果は、神経管において領域特異的な細胞増殖の効率が存在することを明らかにしただけではなく、Shh と mTOR 両者のシグナル経路をリンクさせるメカニズムが存在することを示したものとしても重要である。

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 角谷美典

脊椎動物の中樞神経系原基である神経管内には、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いるだけでなく、その細胞数も領域によって異なる。これらの細胞の多様性と細胞数の定量性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組織内における配置の順序を決定する。さらに、運命決定された各細胞は独自の増殖プログラムを持ち、そのプログラムに従って細胞数を増加させる。本研究は、領域特異的な増殖プログラムの中でも、特に増殖効率が低い底板細胞に着目し、その低増殖性を Shh と mTOR シグナルのクロストークから明らかにしたものである。

本論文ではまず、mTOR シグナルの阻害剤であるラパマイシンを投与した神経管において、神経管の細胞増殖が抑制されることを示した。次に、神経管内における mTOR シグナル活性の局在を抗体染色法によって確認したところ、神経管のほとんどすべての領域で活性化が見られた一方、底板細胞ではその活性が有意に減弱していた。このことから、底板領域の低増殖性と mTOR シグナルの減弱が相関することが示唆された。

本論文では次にこのメカニズムを明らかにするため、底板特異的に発現する転写因子 FoxA2 の機能に着目した。FoxA2 をエレクトロポレーション法によって神経管内に強制発現した結果、神経前駆細胞において細胞増殖と mTOR シグナルの両方が抑制されており、FoxA2 がこれらの表現型を誘導する上流制御因子であることが示された。さらに、FoxA2 の下流に存在する mTOR 関連因子が探索され、RNF152 と呼ばれる mTOR の活性抑制因子が転写誘導されることが明らかになった。また、in situ ハイブリダイゼーションによる解析から、たしかに RNF152 が底板特異的に発現することが示された。さらに、神経管における強制発現並びに発現抑制実験の結果、RNF152 が低分子 GTPアーゼの1つである RagA の上流で働くことにより mTOR シグナルを底板領域特異的にブロックし、底板細胞の細胞増殖を抑制することが明らかになった。また、siRNA を用いた発現阻害実験の結果、底板領域で異所的な mTOR シグナルの活性化と細胞分裂が観察された。これら一連の解析により、領域特異的な増殖効率の制御に関する分子機構が明らかになったばかりでなく、Shh と mTOR シグナルにクロストークが存在すること、さらにそれを架橋する分子も同定された。

以上のように、本論文は、神経管内の領域特異的な細胞増殖と、そのメカニズムの一端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】