

論文内容の要旨

申請者氏名 Agnes Ong Lee Chen

神経誘導は、未分化細胞が神経の特徴を持った細胞に不可逆的に変化する現象をいい、初期の胚発生における重要なプロセスの 1 つである。このプロセスには、神経誘導因子などの細胞外シグナル因子が関与している。神経誘導因子は Bone Morphogenetic Protein (BMP)シグナル伝達経路を阻害することにより、未分化な細胞に神経細胞としての運命を与えることが知られている。これと並行して、ポリコーム型転写抑制複合体 (PRC) と呼ばれるエピジェネティック制御因子が神経分化に関与することが示唆されてきた。PRC は PRC1 および PRC2 と呼ばれる 2 種類のクロマチン修飾複合体の動的な制御によって達成されるが、この機能的役割はまだ完全には解明されていない。本研究は、神経誘導における BMP シグナルの役割と、初期神経分化における PRC のクロマチン制御との関係を明らかにすることを目的とした。

まず、マウス ES 細胞の神経分化の実験系を利用し、BMP シグナルがいくつかの PRC 遺伝子の発現を抑制することを明らかにした。次にこれらの遺伝子について、CRISPR/Cas9 システムを使用してノックアウト (KO) ES 細胞を樹立し、神経分化に対する影響を確認した。これらのノックアウト細胞のうち、Polyhomeotic Homolog 1 (Phc1)-KO 細胞は、Sox1 や Pax6 などの神経マーカーを発現することができず、未分化性遺伝子の Nanog や BMP4 遺伝子発現が残存したままだったため、Phc1 は神経分化の促進に必須の遺伝子であることが示唆された。また、Phc1-KO 細胞に Phc1 を再導入すると神経分化能が復活しただけでなく、Phc2 の再導入でも同様に神経分化能が見られた。したがって、Phc パラログ間で機能が保存されていることが示唆された。Phc1 が神経分化に必要であることは mRNA シーケンス法を用いた網羅的発現解析によっても確認された。

さらに、Phc1-KO 細胞は、中胚葉・内胚葉に問題なく分化した。したがって、Phc1-KO の表現型は神経外胚葉特異的であることが明らかになった。

Phc1 はエピゲノム制御因子であるため、Phc1-KO ではクロマチン状態が変化している可能性が考えられた。そこで、細胞のクロマチンの開閉状態を ATAC シークエンシング法で解析したところ、Phc1-KO 細胞では Nanog などの多能性遺伝子座の周囲で、開いたままになっていることが明らかになった。このことは、Phc1 が多能性遺伝子の調節領域を抑制的に制御し、結果として神経分化に対して許容的な効果を付与することを示唆している。

Phc1 ノックアウトマウス胚では、眼領域の形成が不全になっている表現型が観察され、BMP 遺伝子が異常上昇していたため、胚と ES 細胞では、表現型は完全に一致しないものの、一部共通するメカニズムが存在することが示唆された。

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 Agnes Ong Lee Chen

一般に、未分化細胞から特定の機能性細胞への分化は、誘導因子と呼ばれる細胞外シグナル因子によって制御される。しかし、分化が進行するためには、細胞外部からのシグナル（誘導効果）だけでなく、誘導因子に暴露された細胞がシグナルを受容できる（許容）状態になっており、シグナル因子に対応した遺伝子が発現できる状態になっていることもまた必要である。本研究は、ポリコーム型転写抑制複合体（PRC）の構成因子の1つ Polyhomeotic Homolog 1 (Phc1) が ES 細胞の神経分化の許容効果を付与することを示したものである。

まず、神経の初期分化段階にある細胞の PRC の各遺伝子の発現に着目し、分化培地に BMP を添加して神経分化を阻害することにより、Phc1 の発現量が減少することを明らかにした。次に、Phc1 のノックアウト細胞の作成により、幹細胞が神経化できなくなっていることを実験的に示した。さらに、RNA シーケンス法による網羅的な遺伝子発現解析から、Phc1 変異細胞では Nanog、BMP4 などの全能性遺伝子の発現量が減弱しておらず、逆に Pax6 や Sox1 などの初期神経細胞に発現する遺伝子が惹起されていないことを示した。

また、このノックアウト細胞は神経分化はしないが、中胚葉・内胚葉といった別の系譜の細胞には分化することが示されており、上記の表現型が神経外胚葉特異的であることが示唆された。

さらにクロマチン状態の解析（ATAC シーケンス）から、Phc1 ノックアウト細胞では多能性遺伝子座が開放状態になったままになっており、結果として遺伝子発現が持続し、幹細胞が神経分化状態へと転換できなくなっていることがゲノム構造の面からも証明された。またこの表現型は初期神経遺伝子 Pax6 の導入によって回復された。これらの知見は、Phc1 がクロマチン状態の制御を通して、神経誘導効果に対する許容状態を作り出すために必須の役割を果たすことを分子メカニズムの面から示唆したものである。

本研究では Phc1 ノックアウト胚の解析も行った。Phc1 ノックアウト胚では ES 細胞の解析とは異なり、神経分化の初期には表現型は見られなかったが、大脳腹側部の分化において、網膜の分化ならびに眼球の形成が不全になっており、BMP シグナルの異常惹起が見られていた。このことから、ES 細胞の神経分化と胚発生では、Phc1 の機能が完全に一致するわけではないが、一部共通の制御機構が存在すると考えられた。

以上のように、本論文は胚発生における分化過程に Phc1 が必須の役割を果たすことを ES 細胞、遺伝子変異マウスの両方から示したもので、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。

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】