

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 鳥 居 正 昭

本研究は、中枢神経系の発生過程における、転写制御因子による神経幹細胞の分化制御および脳の領域特異化の分子機構、さらにはそれに引き続く特異的神経ネットワークの形成機構を解明することを目的としている。ラット前脳の神経幹細胞の初代培養系ならびに不死化細胞株を用いた解析、ミュータントマウスを用いた個体レベルの解析、ニワトリ胚での電気穿孔法を用いた異所発現実験等によって、Mash-1およびProx-1による神経幹細胞の分化過程の制御機構、Pax-6, Nkx-2.1, Nkx-2.2, HNF-3 $\beta$ による神経上皮細胞の領域特異化ならびに、tpoc等の軸索束の走行部位規定の制御機構について解析しており、以下の結果を得ている。

1. 発生初期脳神経系において、Mash-1あるいはProx-1の発現は分化したニューロンが出現する部位および時期と非常に強い相関関係にあることが示された。胎生11.5日あるいは14.5日のラット前脳および脊髄において、Mash-1あるいはProx-1発現細胞は、Nestinを発現している自己複製中の神経幹細胞からMAP2を発現している分化したニューロンへと分化が進行する中間段階において一過的に出現することが示された。
2. 胎生11.5日ラット前脳の神経幹細胞の初代培養系を用いて、分化過程の各段階におけるMash-1およびProx-1の発現について解析した。その結果、Mash-1およびProx-1を発現する細胞は、神経幹細胞が自己複製しながら増殖を続けている段階では現れず、この段階から分化段階に移行する最も初期の段階に一致して一過的に現れることが示された。
3. 胎生11.5日ラットの脳前および中脳領域の神経上皮細胞に由来する不死化細胞株（MNS細胞株）を用いた実験結果から、Nestinを発現し増殖している神経幹細胞は、Nestinの発現の減少と同時にMash-1、Prox-1を一過的に発現し、さらにそれに引き続いてMAP2陽性のニューロンへと分化することが示された。MNS細胞株にMash-1を強制発現させた安定発現株を樹立し、遺伝子発現を解析した結果、Mash-1によってNestinの発現が抑制され、逆にProx-1の発現が誘導されることが観察された。これらの結果から、Mash-1が幹細胞の分化過程を直接に制御していることが示唆された。
4. Mash-1ミュータントマウスを用いた個体レベルの解析から、胎生12.5日のミュータントマウスにおいては、視床および視床下部におけるニューロン分化の消失、および未分化細胞層の肥厚、さらにProx-1の発現の消失、などの特異的な異常が起こっている事を見出した。異常の認められる領域は、全て正常胚においてMash-1を強く発現している部位に一致していた。この結果から、in vivoにおいてもMash-1が神経幹細胞の分化に必須の役割を担っていることが示された。

5. 発生初期のニワトリ胚の前脳、中脳において形成される主要な軸索束である tract of the postoptic commissure (tpoc)の軸索が、homeodomain型転写因子であるNkx-2.2, Nkx-2.1, Pax-6, およびwinged-helix型転写因子HNF-3 $\beta$ の発現ドメインと密接に関連した走行を示すことが観察された。
6. 電気穿孔法を用いた異所発現実験を行い、Nkx-2.2, Nkx-2.1, Pax-6, およびHNF-3 $\beta$ の発現領域の確立に相互の発現制御が関与している可能性について検討した。その結果、Nkx-2.2, Nkx-2.1, Pax-6, およびHNF-3 $\beta$ は、それぞれ相互の遺伝子発現を部位特異的に制御する機能を持つことが明らかになった。この結果から、転写因子間の相互作用が脳の領域特異化・区画化に寄与していることが示唆された。
7. tpoc軸索は異所的なNkx-2.2陽性細胞に向かって誘引され、逆に異所的なPax-6陽性細胞によって走行が妨げられた。さらに、Nkx-2.1あるいはHNF-3 $\beta$ を異所的に発現させた場合、異所発現細胞の周囲に誘導されるNkx-2.2陽性細胞に沿う形で、tpoc軸索が誘引された。これらのことから、転写制御因子による背腹軸に沿った前脳・中脳の区画化が、tpoc軸索の走行に重要な役割を果たしていることが示された。また、なんらかの軸索ガイダンス分子の発現が、これら転写制御因子によって制御されている可能性が示唆された。
8. 各転写因子を異所的に発現させた場合、軸索ガイダンス分子netrin-1の発現がNkx-2.2によって誘導され、逆にPax-6によって抑制された。一方、Nkx-2.1およびHNF-3 $\beta$ を異所的に発現させたところ、netrin-1は異所発現細胞とその周囲の細胞において誘導された。また、異所発現によりnetrin-1がtpoc軸索に対して誘引的に働くことが判明した。これらの結果から、Pax-6, Nkx-2.2などの転写因子は、前脳・中脳領域におけるnetrin-1の発現を制御しており、このnetrin-1の誘引活性によってtpoc軸索の走行が制御されていることが示唆された。
9. Nkx-2.1およびHNF-3 $\beta$ を異所発現させた結果、軸索ガイダンス分子Slit-1およびSlit-2の発現が誘導された。異所発現の効果を検討したところ、Slit-1とSlit-2はいずれも、tpoc軸索への強い反発活性を示した。従って、前脳・中脳の腹側部では、軸索誘引分子であるnetrin-1と反発分子であるSlit-1, Slit-2が一部重複して発現しており、tpocの軸索はこの誘引、反発分子群の勾配を認識して、結果的に限られた部位を選択的に走行するものと考えられた。

以上、本論文は、転写制御因子Mash-1, Prox-1が神経幹細胞のニューロンへの分化過程を制御する重要な分子であることを明らかにした。さらに、転写制御因子Pax-6, Nkx-2.1, Nkx-2.2, HNF-3 $\beta$ が神経上皮細胞の領域特異性の制御とともに、軸索ガイダンス分子netrin-1, Slit-1, Slit-2の部位特異的な発現を制御することによって、分化したニューロンが形成するtpoc等の軸索束の走行部位の規定にも重要な役割を果たしていることを明らかにした。本研究は、脳の形態形成および神経ネットワーク形成の分子基盤の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものであると考えられる。