

論文内容の要旨

論文題目：

Molecular Code for Spatio-Temporal Control of Cell Genesis from Multipotent Stem Cells in the Developing Spinal Cord

発生期脊髄神経管における時間・空間特異的なニューロンおよびグリア産生を調節する分子機構に関する研究

指導教官 井原康夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成12年4月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 杉森道也

研究背景と目的

中枢神経の発生過程において、多能性神経幹細胞から、ほ乳動物中枢神経系の主要細胞であるニューロン (neuron)、オリゴデンドロサイト (oligodendrocyte)、アストロサイト (astrocyte) が分化する。しかしながらどのような分子機構が、多能性幹細胞からの多様な細胞産生を調節しているのかは解明されていない。

一般的には、胎児期早期にニューロン産生 (neurogenesis) が起こり、対してグリアであるオリゴデンドロサイトとアストロサイトの産生 (oligodendrogenesis and astrogenesis) は胎児期後期に起こる。このように多能性神経幹細胞からの細胞系譜決定は「ニューロンかグリアか」のような単純な過程が考えられていた。しかし、実際のニューロン・グリア産生は、時間・空間特異的に生じ、より複雑である事が明らかにされて来た。最近の報告では、oligodendrogenesis が、異なった領域で、異なった時期に起こることが示されて来ている。ある領域では neurogenesis と、また別の領域では astrogenesis と平行しているようである。このように各々の細胞系譜を決定する分子機構は、細胞分化の時間と場所を正確に協調させていると考えられた。

最近の研究により、神経幹細胞、神経前駆細胞の内在性質が時間特異的細胞

分化制御に関わっていることが明らかとなった。また発生早期に神経管は様々な細胞外シグナル分子と細胞内分子らによって、場所情報を獲得し、その情報が多様なニューロン分化を制御する事が示された。特に、これらの場所情報を与える内在性分子として、転写因子が重要な役割を果たしている事が明らかになって来た。一方、ニューロン・グリアへの分化に関わる転写因子として、プロニューラル (proneural) 型、抑制型 (inhibitory) helix-loop-helix (HLH) 型転写因子が注目されていた。しかし、それらがどのようにニューロン・グリア産生時期を決定しているのかは明らかでない。例えば抑制型 HLH 型転写因子である Hes1 は astrogenesis に関わっている事が示唆されているが、同時に神経幹細胞の維持および分化抑制についての役割も示唆されている。また同様に Olig2 は、脊髄において早期に motoneuron、後期に oligodendrocyte 両方の分化に必須である事が示されたが、その分化時期の制御機構は明らかではない。

これらの分子機構を解明するにあたり、私はニューロン・グリア産生が比較的良好に理解されて来ている発生期脊髄腹側神経管をモデルとして選択した。私は、転写因子 Pax6、Olig2、Nkx2.2 が領域特異化 (patterning) のみならずニューロン・グリア産生の時間調節に関わっている事を見いだした。またこれら patterning を行う因子 (patterning factor) は、Neurogenin1/2/3 (Ngn1/2/3)、Mash1、Hes1、Id1 といった proneural/inhibitory HLH 型転写因子の細胞分化を促進する活性を変化させた。私は、patterning factor と Ngn1/2/3、Mash1、Hes1、Id1 の共発現が領域・時期特異的に変化し、その組み合わせが neuron、oligodendrocyte、astrocyte の産生に深く関わっている事を示した。Ngn2、Mash1、Pax6 の遺伝子改変マウス (mutant mice) の表現型は、これらの遺伝子らが共同して細胞系譜決定とその時期を調節している事を支持した。このように発生期脊髄神経管においては、patterning factor と proneural/inhibitory HLH 型転写因子の組み合わせが協調的にニューロンおよびグリア分化の、細胞系譜の決定・時間・場所を調節している、というモデルを提唱する。

結果と考察

私は主に3つの実験を行った。まず上記転写因子の発現パターンをラット (rat) 脊髄神経管において解析し、領域・時期特異的ニューロン・グリア産生のパターンとの関わりを調べた。続いて多能性神経前駆細胞培養系である neurosphere culture において、転写因子の単独および組み合わせでのニューロンおよびグリ

ア分化への影響を解析した。最後に Ngn2、Mash1、Pax6 mutant mice を用いて oligodendrogenesis、astrogenesis における表現型を解析した。

発生期脊髄神経管における領域特異化

まず私は脊髄神経管腹側における領域を同定した。既に示されていたように脊髄神経管の腹側脳室層には、Pax6、Olig2、Nkx2.2 が発現し3つの領域に分けられていた。領域化はニューロンおよびグリア分化より早期に生じ、相互の位置関係は発生後期まで保たれていた。重要な事には、これら patterning factor は、rat 胎生 16.5 日 (E16.5)まで、それぞれの領域内で脳室層のほぼ全ての細胞に発現されている。

Ngn1/2/3 と Mash1 は neurogenesis に相関がある

まず HLH 型転写因子の発現と neurogenesis との関わりを調べた。rat 脊髄神経管では neurogenesis は E11.5 から E16.5 頃まで生じる。この時期に、Ngn1/2/3 と Mash1 は領域特異的に約半数の細胞に発現しており、neurogenesis への関与を示唆した。また同時期にそれぞれの領域で、Hes1 と Id1 も発現していた。Hes1/Id1 発現細胞は Ngn1/2/3 と Mash1 を発現していなかった。重要な事に、この時期には、いずれの HLH 型転写因子も、patterning factor とともに発現している。これは発生後期のグリア産生時期との大きな違いである。

Neurogenesis から oligodendrogenesis への切り替わり (switch)

各領域において、いつ oligodendrogenesis が生じるのかを調べた。分化直後の oligodendrocyte は、oligodendrocyte 前駆細胞 (OLPs)といわれ、脳室層から離れ移動する Nkx2.2 または Olig2 陽性の細胞として同定される。Oligodendrocyte の分化は、Nkx2.2 領域 (domain) から Pax6 domain にかけて E12.5、E14.5、E16.5 と2日ずつずれて開始していた。Nkx2.2 または Olig2 陽性細胞が OLPs である事は NG2、O4 などのマーカーを用いて確認した。

Mash1 の発現は、oligodendrogenesis と相関する

oligodendrocyte の分化時期と相関のある分子の発現を調べた。Mash1 の発現は、Nkx2.2 および Olig2 domain にて OLPs の出現時期に先立ち、E11.5、E14.5 に開始していた。また Mash1 は、移動開始後の OLPs にも発現をしている。Pax6 domain でも、全ての OLPs は、Mash1 を発現していた。重要な事には、Mash1 の発現は E12.5 から認められたのだが、これらの細胞は E16.5 において Pax6 domain でありながら Pax6 の発現が消失していた。このように Nkx2.2、Olig2 domain では Mash1 の発現開始が、一方 Pax6 domain では Mash1 陽性細胞における Pax6 の発

現消失が、OLPs の分化時期に関わっている事を示唆する。

発生後期に astrogenesis は開始する。

astrogenesis の分化領域、および開始時期を解析した。S100 β 、glutamine synthase (GS)をマーカーとして用いた。Pax6、Olig2、Nkx2.2 各領域において E16.5 から S100 β 、GS 陽性細胞が認められた。また Inhibitory HLH 型転写因子である Hes1/Id1 が S100 β 、GS 陽性細胞に発現している事を見いだした。前述の通り Hes1/Id1 は発生早期から発現が各領域にみとめられる。しかし、私は Hes1/Id1 陽性細胞において、patterning factor の発現消失を見いだした。このように各領域における astrogenesis の開始は、Hes1/Id1 陽性細胞における patterning factor の発現消失と相関している。

上記の転写因子が多能性神経前駆細胞において、どのようにニューロン・グリア産生を調節するかを neurosphere culture を用いて解析した。rat E13.5 脊髄神経管から未分化細胞を分離し、増殖因子存在下で培養した。GFP 発現 retrovirus を用いた目的遺伝子導入を行い、増殖因子を除いた後、分化させた。GFP 陽性細胞を分化細胞のマーカーである TuJ1、NG2、O4、GFAP を用いて染色した。個々の前駆細胞を clone として培養し、分化能を調べる clonal assay、集団からのニューロン・グリア産生比率を調べる population assay という2つの assay 方法を用いた。

Patterning factor は Ngns の活性を変化させる

Ngns は cell cycle exit を促進し、neuron への分化を促進した。clonal assay においては、Ngn2 発現細胞の大部分が、neuron のみを産生する clone (N only)になった。in vivo において関連のある patterning factor と Ngns の組み合わせ発現では、発現細胞の大部分が N only clone となるものの、分化した neuron の比率は減少していた。このように patterning factor は、Ngns の非常に強い neuron への分化促進を部分的に抑制していた。

Mash1 は、neuron と oligodendrocyte 両者の分化を促進する

Mash1 陽性細胞は、その大部分が neuron と oligodendrocyte のみを産生する N/O clone となり neuron、oligodendrocyte の分化を促進していた。Pax6、Olig2 は、Mash1 の neurogenic、oligodendrogenic 活性を、それぞれ選択的に促進した。また Nkx2.2 は Mash1 の neurogenic、oligodendrogenic な活性を抑制しなかった。これらの結果は in vivo の oligodendrocyte 分化パターンに当てあまる。

Hes1 と Id1 は astrogenesis を促進する

Hes1 と Id1 陽性細胞の大部分が、astrocyte のみを産生する細胞 (A only clone) となった。しかし patterning factor と共発現させた場合には、いずれの分化マーカーも発現しない未分化細胞を著しく増加させた。このように Hes1/Id1 は astrogenesis を促進する活性を有するが、patterning factor の組み合わせにより協調的に未分化細胞の維持に働く。この結果は in vivo の Hes1/Id1 陽性細胞における、Pax6、Olig2、Nkx2.2 の発現消失が astrogenesis の開始を決定しているという考えを支持する。

Ngn2 と Mash1 の in vivo での oligodendrogenesis での役割

Ngn2 と Mash1 の mutant mouse を用いて表現型を解析し、それらが oligodendrocyte の分化とその時期をどのように制御しているか、調べた。Olig2 domain で OLPs が出現し始める mouse E12.5 にて数種類のマーカーを用いて解析した。Mash1^{-/-}では OLPs の数が wild type に比較して減少していた。このように Mash1 は oligodendrocyte の発生に必要である。また Ngn2 と Mash1 が共発現する mutant mouse (Mash1^{KINgn2/+})では oligodendrogenesis が阻害された。これは Ngn2 が in vivo においても OLPs の産生を抑制する事を示している。さらに Ngn2 のかわりに Mash1 が発現する mutant mouse (Ngn2^{KIMash1/Mash1})においては OLPs の数が wild type に比較して 50%増えた。これは OLPs の早期分化と考えられた。Olig2 domain では、Ngn2 は motoneuron の分化時期に発現し、Ngn2 の発現消失後、Mash1 の発現が開始する。上記の表現型は Ngn2 から Mash1 への発現の switch が、neurogenesis から oligodendrogenesis への switch に決定的な役割を果たしている事を示している。

Pax6 は in vivo での oligodendrogenesis と astrogenesis を阻害する

最後に Pax6^{-/-} mouse を用いて、Pax6 が oligodendrogenesis と astrogenesis の開始時期を調節しているのか解析した。Pax6^{-/-}では E13.5 において、Pax6 domain に相当する領域に OLPs の早期出現を認めた。また E15.5 においては、GS 陽性細胞 astrocyte が、著名に増加し astrocyte の早期分化と考えられた。これらの結果は Pax6 の発現消失が in vivo において oligodendrogenesis、astrogenesis の開始を決定している、という考えを支持する。

結論

- 1) Patterning factor は Ngns のニューロン分化促進活性を、部分的に抑制し、

未分化細胞を保持する役割を果たす。

- 2) Nkx2.2 および Olig2 domain では Mash1 の発現開始が、Pax6 domain では Mash1 陽性細胞での Pax6 の発現消失が、オリゴデンドロサイト分化の開始時期を決定する。
- 3) Pax6/Olig2/Nkx2.2いずれの領域においてもアストロサイト分化の開始は、Hes1/Id1 陽性細胞における **patterning factor** の発現消失が決定する。
- 3) 発生期脊髄腹側におけるニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトの分化においては、2種類の転写因子群 (**patterning factor** と HLH 型転写因子)の組み合わせにより、細胞分化の3つの側面 (時期、場所、細胞系譜の決定) が協調的に制御されている。