

審査の結果の要旨

氏名 杉森道也

本研究は、神経発生において神経幹細胞から多様な細胞が生まれるという現象に関わる分子機構を明らかにしようと試みた。発生期脊髄神経管をモデルに、時間・空間特異的なニューロン・グリア分化における、転写因子の発現と機能を詳細に解析したものであり、下記の結果を得ている。

主に3つの実験が行われた。まず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・グリア産生との関わりが示された。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が調べられた。最後に *mutant mice* を用いてニューロンおよびグリア分化における表現型が調べられた。

- 1) 脊髄神経管腹側能室層における領域が同定された。Pax6、Olig2、Nkx2.2 (patterning factor) が発現し3つの領域に分けられていた。重要な事には、グリア分化が始まる時期まで、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た。
- 2) HLH 型転写因子の発現と *neurogenesis* との関わりを調べたところ、Ngn1/2/3 および Mash1 が領域特異的に発現しており、それらの *neurogenesis* への関与を示唆した。
- 3) 各領域において、いつ *oligodendrogenesis* が生じるのかを調べたところ、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。
- 4) oligodendrocyte の分化時期と相関のある分子の発現を調べたところ、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、oligodendrocyte の分化時期に関わっている事を示した。
- 5) astrocyte の分化領域、および開始時期が調べたところ、S100 β 、glutamine synthase (GS) 陽性 astrocyte は、Pax6、Olig2、Nkx2.2 各領域において E16.5 から出現した。また Hes1/Id1 が astrocyte に発現している事を見いだした。Hes1/Id1 の発現開始は *astrogenesis* の分化開始時期と一致しなかったが、Hes1/Id1 陽性細胞

胞における *patterning factor* の発現消退と相関していた。

6) 上記の転写因子が多能性神経前駆細胞において、単独または組み合わせ発現により、どのようにニューロン・グリア産生を調節するかを解析した。Ngns は、単独で neuron への分化を促進した。しかし *patterning factor* と Ngns の組み合わせにより、Ngns の非常に強い neuron への分化促進は部分的に抑制された。

7) Mash1 は neuron、oligodendrocyte 両者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。これらの結果は *in vivo* の oligodendrocyte 分化パターンを説明し得た。

8) Hes1/Id1 は、astrogenesis を促進する活性を有していたが、*patterning factor* との組み合わせにより未分化細胞の維持に働いた。この結果は *in vivo* の Hes1/Id1 陽性細胞における、*patterning factor* の発現消退が astrogenesis の開始を決定するという考えを支持した。

9) 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。Mash1^{-/-} では、oligodendrocyte の数が wild type に比較して減少し、Mash1 は oligodendrocyte の発生に必要であることが示された。また Ngn2 と Mash1 が共発現する mutant mouse (Mash1^{KINgn2/+})、さらに Ngn2 のかわりに Mash1 が発現する mutant mouse (Ngn2^{KIMash1/Mash1})を用いた解析によって、Ngn2 から Mash1 への発現の switch が、Olig2 domain における 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ことが示された。

10) Pax6 が、*in vivo* において oligodendrogenesis と astrogenesis の開始時期を調節しているのか調べた。Pax6^{-/-}では oligodendrocyte と astrocyte の早期分化を認めた。これらの結果は、Pax6 の発現消失が oligodendrogenesis、astrogenesis の開始を決定している、という考えを支持した。

以上、本論文は、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る事を明らかにした。本研究は、神経発生における時間・空間特異的な細胞分化に関する分子機構の詳細を、はじめて示した研究の一つと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。