

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 16 年度博士課程進学
氏名 笠井 真菜
指導教員名 秋山 徹

論文題目 Wnt シグナル伝達経路による神経分化制御

序論

生物の発生過程における遺伝子発現は、さまざまなシグナルが時間的、空間的制御をうけて伝達されることにより調節されている。このようなシグナル伝達経路の 1 として Wnt シグナルがあげられる。Wnt シグナルは、線虫からヒトに至るまで広く保存され、個体の発生形態形成、癌の発症機構に関与することが明らかとなっている。

Wnt が作用していない細胞では、Wnt シグナル伝達因子 β -catenin は GSK-3 β によりリン酸化を受け、プロテアソーム依存的に分解されている。一方、Wnt が 7 回膜貫通型受容体 Frizzled に結合すると、細胞質タンパク質 Dishevelled が活性化され、GSK-3 β の不活化を引き起こす。その結果、 β -catenin は安定化して核内に移行し、DNA 結合タンパク質 TCF/LEF と結合することにより、CyclinD1 などのターゲット因子の転写活性化を引き起こす。

発生過程における Wnt シグナルの機能は、各々の Wnt 因子のノックアウトマウスを作製することにより解析が進められている。例えば Wnt3a のノックアウトマウスでは中胚葉の発生が正常に起こらず、後部体幹が欠失する。原因遺伝子として、そのターゲ

ット因子である *Brachyury* があげられており、*Brachyury* 遺伝子に変異がある T の mutant では同様な表現型を呈する。また、*Wnt1* ノックアウトマウスでは小脳および中脳後部が正常に形成されない。逆に、*Wnt* シグナルを負に制御する因子である *Dkk-1* のノックアウトマウスでは前脳部が欠失する。このように、発生過程における、さまざまな部位での *Wnt* シグナルの機能解析が行われている。

脳神経系の発生過程における *Wnt* シグナルの役割についても、近年活発に研究が行われており、これまでに、大別して下記の3つの知見が得られている。

- 1 *Wnt* シグナルによって、神経細胞の後方化が促進される
- 2 *Wnt* シグナルが神経幹細胞に働きかけることで、神経幹細胞の増殖を促進し、皮質の肥厚化を引き起こす
- 3 *Wnt* シグナルが神経幹細胞からニューロンへの分化を促進する

これらは、異なる発生段階における機能を示しており、各々の発生過程における *Wnt* シグナルの機能の一部をあらわしているに過ぎないと考えられる。本研究では、*Wnt* シグナルの脳神経発生過程における分化誘導機構の解析を目的とした。

本研究では、大脳の発生異常が認められた *ICAT* ノックアウトマウスの解析、そして、神経前駆細胞のニューロン、グリア分化過程における *Wnt* シグナルの機能解析、さらに、*Wnt* シグナルのターゲット因子として見出された *Sp5* について、細胞周期と神経前駆細胞での機能に焦点をあて解析を行った。

第一章

「*ICAT-1* ノックアウトマウスの解析」

ICAT-1 (以後 *ICAT*) は *Wnt* シグナルを負に制御する因子として当研究室で単離同定、解析されてきた。*ICAT* は β -catenin に結合し、*Wnt* シグナルによる *TCF* と β -catenin を介した転写活性化を抑制する。*ICAT* は *Xenopus* の胚発生において体軸形成に重要な役割を果たすこと、またヒト大腸癌細胞において *Wnt* シグナルを抑制する活性をもつことが確認されていることから、哺乳類の発生過程における解析のために *ICAT* ノックアウトマウスが作製された。作製された *ICAT* ノックアウトマウスは、そのほとんどが腸管破裂により生後1日で死亡する他、前頭部形成不全が観察された。

本研究では、*ICAT* ノックアウトマウスの、組織学的、解剖学的解析を行った。特に、最も重篤な表現型であった前頭部欠失の原因を明らかにするために、脳神経系の発生に焦点を絞り解析を行った。発生中期から発生後期における各種神経系細胞マーカー遺伝子の発現を *Western blotting*、*in situ hybridization* により検討した結果、ニューロンや神経幹細胞の

マーカー遺伝子の発現に変化は見られなかったが、前方化マーカーの発現抑制及び後方化マーカーの発現亢進が観察された。これより、ICAT ノックアウトマウスの大脳発生異常の原因が、脳発生における領域化異常であることが示され、ICAT による Wnt シグナルの抑制は、正常な脳の領域化制御に必要であることが明らかになった。

第二章

「Wnt シグナルによる、BMPs の誘導を介した時間的なニューロン及びグリアの分化制御」

神経の発生分化過程では、ニューロンの分化がグリアの分化に先行する。ニューロン分化は、発生中期から起きるのに対し、グリアの分化はそのほとんどが、発生後期及び出生後に起こる。しかし、その分化順序を規定する機構は明らかにされていない。そこで、本研究では、神経前駆細胞がニューロン及びグリアに分化する過程における Wnt シグナルの機能を明らかにしようと試みた。

神経前駆細胞にレトロウイルスにて Wnt シグナル伝達因子である \square -catenin を導入し、細胞染色、RT-PCR 法により各種神経系分化マーカーの発現を検討した。その結果、ニューロン、アストロサイトの分化誘導、オリゴデンドロサイトの分化抑制を確認した。 \square -catenin が導入された細胞はニューロンに分化し、その細胞の周囲でアストロサイトの分化誘導が起きていることを見出した。

また、神経分化の進行とともに、アストロサイト誘導能が報告されている骨形成因子 (BMPs)、BMP2、BMP4、BMP7 の発現が誘導され、 \square -catenin の強制発現によりその発現誘導が亢進することを確認した。この結果から、 \square -catenin により誘導された BMP によってアストロサイトの分化誘導が起こる可能性があると考えられた。そこで、BMP の阻害因子である Noggin を添加し、各種分化マーカーの発現を検討したところ、 β -catenin の導入によるアストロサイトの分化が抑制され、また、部分的にオリゴデンドロサイトの分化が回復することが明らかとなった。これより、 \square -catenin によって誘導された BMPs がパラクライ因子としてグリアの分化制御に関わっていることが明らかになった。

つまり、神経前駆細胞において Wnt シグナルによりニューロンが誘導され、誘導されたニューロンにおいて BMPs が発現し、アストロサイトを誘導するとともにオリゴデンドロサイトの分化を抑制するという時間的な分化制御を行っていることが示唆された。この、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトという分化順序は、発生過程における分化の進行状態をよく反映しており、Wnt—BMP シグナルが生体内でも同様な機構として働いていると考えられる。

第三章

「Wnt シグナルのターゲット因子、Sp5 の機能解析」

Sp5 は神経幹細胞における Wnt シグナルのターゲット因子としてマイクロアレイ解析により当研究室で見出された。Sp5 は Sp1 ファミリーに属し、Zn フィンガードメインを持つ転写因子である。Sp5 のノックアウトマウスでは特異な表現型は報告されていないが、詳細な解析は行われていない。当研究では、Wnt シグナルのターゲット因子としての Sp5 の機能解明を目的として研究を行った。

Sp5 は、MG1.19 ES 細胞において、Wnt3a 添加により、添加後 2 時間から発現誘導が認められた。また、ルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイにより Sp5 が Wnt シグナルの直接のターゲットであることを明らかにした。

Sp5 は HCT116 大腸癌細胞への強制発現により、cyclin-dependent kinase inhibitor である p27Kip1 の発現上昇とともに、増殖低下、G1 期細胞群の増加を引き起こした。したがって、Sp5 を shRNA によりノックダウンしたところ、p27 の転写抑制が確認された。これより、HCT116 細胞において、Sp5 は p27 の発現を介して細胞周期を調節していると考えられた。

さらに、神経前駆細胞における Sp5 の機能を明らかにしようと試みた。Sp5 は神経前駆細胞を分化条件で培養することにより発現上昇が認められた。また、 β -catenin の強制発現によって発現が亢進し、神経前駆細胞からニューロンへの分化過程において Sp5 が重要な機能を果たしている可能性が示唆された。

Wnt シグナルは、神経前駆細胞の分化過程で Sp5 の発現を誘導する。その結果 p27 の発現上昇が起こり、細胞周期が G1 で停止すると考えられる。分化誘導時における神経前駆細胞の分化誘導、細胞周期の停止は、Wnt シグナル—Sp5—p27 経路により制御されている可能性が考えられた。

まとめ

発生中期から後期における神経発生過程では、脳の領域化、神経幹細胞の増殖、ニューロンの分化、グリアの分化へと進行する。各過程において、Wnt シグナルは重要な役割を果たしており、いくつかの下流因子を持つことが報告されている。本研究では、脳の領域化と、神経幹細胞の分化過程の Wnt シグナルを介した新たな制御を明らかにした。今回見出された BMPs、Sp5 のように、各々が全く異なる機能を持ち、Wnt シグナルのターゲットとしてその機能の一側面をあらわす未知の因子は多数あると考えられる。今後、各々の発生過程における Wnt シグナルのターゲット因子の選択機構について解析が進むことが期待される。