

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 笠井 真菜

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、空間的制御を受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一つとして 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。

本研究は、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て行われた。

第一章では、Wnt シグナルを負に制御する因子である ICAT-1 (以後 ICAT) のノックアウトマウスの解析について述べられている。本研究では、ICAT ノックアウトマウスの、組織学的、解剖学的解析が行われた。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、脳神経系の発生について解析された。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 シグナルの新規機能が明らかにされた。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 β -catenin を導入することで、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。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、 β -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。さらに、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、 β -catenin によって誘導された BMPs がパラク

ライン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。

第三章では、Wnt シグナルの新規ターゲット因子として見出された Sp5 の機能解析が述べられている。

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。

また、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。そこで、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ことが示された。

さらに、神経前駆細胞における Sp5 の機能解明が行われた。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。神経前駆細胞の分化過程では、Wnt シグナルが Sp5 の発現を誘導し、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。

以上のとおり、本研究では、脳の領域化と、神経幹細胞の分化過程での Wnt シグナルを介した新たな制御機構が明らかにされた。ノックアウトマウスの解析により脳の領域化決定時における、ICAT の重要性が明らかとなった。また、神経幹細胞のグリア、ニューロンの分化には、BMP、Sp5 と Wnt シグナルの異なる下流因子が制御することが示唆された。これらの報告は、脳の発生過程における Wnt シグナルの新たな機能について示したものであり、学術上応用上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が、博士（農学）の学位論文として価値のあるものと認めた。