

論文の内容の要旨

論文題目

中枢神経系における血管発生および神経幹細胞の生存・維持に関する FRS2 α 変異体マウスを用いた中枢神経発生の研究

I. 神経幹細胞の生存・維持に関する FRS2 α 変異体マウスを用いた中枢神経発生の研究

II. 中枢神経系における血管発生の研究

指導教員 渋谷正史 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

山本誠士

I. 神経幹細胞の生存・維持に関する FRS2 α 変異体マウスを用いた中枢神経発生の研究

哺乳類の神経発生は非常に複雑な過程を経ておこる。中枢神経系における皮質の層構造形成は、神経幹細胞および神経前駆細胞の増殖、分化、至適な部位への移動によって制御されている。近年、subventricular zone(SVZ)において神経発生が起こることが報告されているが、過去における理解では、SVZ はグリア細胞が増殖する部位であるとされていた。Ventricular zone(VZ)に存在する放射状グリア細胞(神経幹細胞とされている)が非対称分裂を行い 1 個の intermediate progenitor 細胞と自己複製可能な 1 個の放射状グリア細胞を生み出した後、intermediate progenitor 細胞は SVZ に移動し、神経のみを産生することが証明された。しかしながら、放射状グリア細胞、intermediate progenitor 細胞の調節機構や層構造への寄与における分子メカニズムは、いまだ明らかにされていない。

ドッキング蛋白質である FRS2 α は、FGF シグナルまたは neurotrophin シグナルの中心的なメディエーターとして知られている。FGF 等のリガンドからの刺激以降、FRS2 α を介するシグナル伝達は、アダプター蛋白質である Grb2 やチロシンフォスファターゼの Shp2 をリクルートすることによって細胞に増殖、分化などの多面的な作用を及ぼすことが知られている。

本研究では、FRS2 α の Shp2 結合部位に存在するチロシン残基をフェニルアラニン

に置換した *Frs2* $\alpha^{2F/2F}$ 変異体マウスを用い、FRS2 α が中枢神経系の発生過程における神経分化、神経幹細胞維持にどのような役割を果たしているのかを解析した。マウス神経発生過程の分子生物学的手法を用いた解析の結果、神経細胞、グリア細胞の増殖および発達に FRS2 α が強く関与していることが明らかになった。すなわち、*Frs2* $\alpha^{2F/2F}$ 変異体マウスは野生型マウスと比較し、脳の層構造が薄く疎であり、明らかに神経発生に強い障害が認められた。また、*Frs2* $\alpha^{2F/2F}$ 変異体マウスおよび野生型マウスの神経幹細胞および前駆細胞(neural stem/progenitor cells; NSPCs)から primary neurospheres 形成能を解析した結果、*Frs2* $\alpha^{2F/2F}$ 変異体マウスの primary neurospheres 形成能は野生型と比較し有意に低下しており、増殖能も弱いことが明らかになった。Intermediate progenitor 細胞を特異的に検出する抗体を用いた免疫染色の結果、胎生 14.5 日(E14.5)の *Frs2* $\alpha^{2F/2F}$ 変異体マウス脳では野生型マウスと比較して intermediate progenitor 細胞が有意に減少しており、明らかに intermediate progenitor 細胞の維持が正常にできていないことが示された。また、primary neurospheres の分化試験において、*Frs2* $\alpha^{2F/2F}$ 変異体マウスは神経細胞またはグリア細胞への分化は野生型マウスと同様におこるものの、形態の異常や遊走能の異常が観察された。従って、FRS2 α は intermediate progenitor 細胞の維持に不可欠であり、NSPCs の増殖・分化において非常に重要な因子のひとつであることが明らかになった。

II. 中枢神経系の血管発生の研究

血管系は、複数の分子の相互作用が時期特異的または部位特異的に起こり、多段階の過程を経て構築されることが明らかになっている。形態形成初期に、造血系細胞と血管内皮細胞の共通の幹細胞であるヘマンジオブラストが血球および血管内皮細胞に分化して原始血管叢を形成する脈管形成がおこる。次に、VEGF などの血管新生刺激に対して、発芽、分枝、融合、嵌入、退縮などの応答がおこる血管新生という過程を経る。この時期には管径の変化、動静脈分化、壁細胞(血管平滑筋細胞およびペリサイト)のリクルートがはじまり血管系の基本形が完成され、これをリモデリングとよんでいる。

近年、末梢神経の発生と動脈分化が、血管の形成に非常に重要な分子である VEGF のシグナルによって制御されている可能性が報告された。解剖学的にも神経系と血管系は主要な部位で平走しており、互いに密接な関係があると考えられる。従って、血管発生と神経発生は相互作用を及ぼしながら、時に同一の分子群によって制御されて進行していると考えられる。

中枢神経系の血管発生は、脳の層構造が形成される時期とほぼ同時期に開始する。マウスの妊娠 10.5 日の胚(E10.5)から妊娠 12.5 日の胚(E12.5)にかけて脳表面の血管網形成後、脳表面の血管網から垂直に層構造形成中の脳へ血管が進入り、脳のある領域に達したときに血管が分岐を開始し血管網を形成するとされるが、その分子メカニズムに関する知見はごく僅かである。

脳血管は他の組織の血管とは異なり、血液脳関門(BBB)とよばれる特殊な構造を有することが知られている。BBB は血管内皮細胞同士が全周性のタイトジャンクションで緊密に結合し、血液から脳内への物質移行を制限している。近年の理解では、グリア細胞と血管内皮細胞との相互作用によって、血管内皮細胞のタイトジャンクション形成が誘導されると考えられている。一方では、脳血管に存在するペリサイトが、血管内皮細胞のタイトジャンクション形成を促し、微小血管の血圧の制御を行うとされている。また、BBB のバリア形成において、ペリサイト数と血管のカバー率が重要であるとの見解がある。一般的に、ペリサイトは血管周囲の結合組織に存在する未熟な間葉系細胞から発生するとされる。しかしながら、中枢神経系の発生過程におけるペリサイトのリクルートや脳血管への定着過程の詳細は未だ明らかにされていない。そこで、マウス形態形成期中枢神経系における血管発生を詳細に観察し、血管網形成に関与する細胞群の性質を明らかにすることを目的として研究を行った。

本研究によって、脳血管が劇的に形成される E10.5 の脳において、血管の形成領域に偏在して CD31 陽性 F4/80 陽性細胞の存在が確認された。その細胞は、血管形成領域にて、血管の方向性を決定することに関与しているように見え、一部の細胞は血管分岐点などに結合しており、ペリサイトの存在部位に類似していることが明らかになった。より詳細に観察したところ、CD31 陽性 F4/80 陽性細胞は多核または細胞の集合体であることが明らかになった。また、*in vitro* における培養の結果、CD31 陽性 F4/80 陽性細胞はペリサイトのマーカーを発現することが明らかになった。本研究で見出された CD31 陽性 F4/80 陽性細胞が、脳血管のペリサイトの少なくともその一部の起源であるとするれば、*macrophage* 系マーカーを発現し、多核または細胞集団という特徴より、新しい知見であり非常に興味をそそられる内容である。今後更に詳細に検討を重ね、CD31 陽性 F4/80 陽性細胞の性状を明らかにしたい。