

論文の内容の要旨

論文題目 bHLH型転写因子 *Ascl1* によるオリゴデンドロサイト
分化制御機構の解析

指導教員 中村 耕三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

上野 高明

オリゴデンドロサイトはニューロン、アストロサイトと共に中枢神経系を構成する主要な細胞種の1つで、中枢神経の髄鞘（ミエリン）を形成する機能を持った細胞である。軸索周囲の髄鞘は軸索を伝わる跳躍伝導に寄与することによって神経細胞における活動電位の伝達速度を飛躍的に向上させている。このため、その障害は多発性硬化症などの脱髄疾患、脳血管障害や脊髄損傷後の脱髄病変として臨床的にも大きな影響を及ぼす。

近年、脊髄損傷治療において、その治療ソースとしてオリゴデンドロサイトの前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cell : OPC) が注目されている。このうち多くは移植による臨床応用を念頭に置いたもので、脊髄損傷モデル動物への移植で運動機能・脊髄機能の回復が得られたと報告されている。これらの移植実験では運動機能などの行動学的な評価はなされているものの、損傷脊髄内での各

細胞の挙動・変化などについての情報は少なく、移植した細胞が損傷修復にどのように働いているかなどのメカニズムについては未知な点が多い。

さらに損傷脊髄において損傷に反応して増殖する内在性のグリア前駆細胞が存在すること、さらにその多くが OPC であることも明らかにされてきた。しかし、損傷後に生じたこれらの内在性 OPC もそのままでは成熟・再髄鞘化には至らず、前駆細胞のまま細胞死へと進むことが明らかとなっている。

このため、移植によって補充された細胞でも反応性に増殖した内在性 OPC でも、細胞を組織修復に誘導するためには損傷脊髄内における OPC の挙動やそれを制御する因子についての基礎的知見を積み重ねることが必要であり、OPC の増殖・分化のメカニズムを明らかにし、細胞数・局在・分化のタイミングを制御することが、より安全で効果的な脊髄損傷に対する細胞補充療法の実現につながると考えられる。

オリゴデンドロサイトの分化制御については、これまでに basic Helix-Loop-Helix (bHLH) 型転写因子を中心にした種々の転写因子の関与が報告されており、それらが時間的・空間的に組み合わせを変えることで分化を制御していると考えられている。このうち bHLH 型転写因子 *Ascl1* は脳および脊髄に広く分布し Neuron 分化を促進する pro-neural 遺伝子として知られていたが、最近の報告ではグリア発生時期 (gliogenesis) の前駆細胞にも発現し、OPC への運命決定 (commitment) や OPC から成熟オリゴデンドロサイトへの最終分化 (maturation) などいくつかのステップで転写制御に働いていると考えられている。しかし、OPC における *Ascl1* の転写ターゲットについては未だ不明な点が多い。

筆者は、*Ascl1* をはじめとするこれらの転写因子のターゲットを明らかにすることがオリゴデンドロサイトの分化メカニズム全般の解明につながり、その知

見はさらに脊髄損傷への治療応用に向けた OPC 制御の基礎となると考え、本研究においてオリゴデンドロサイト分化における *Ascl1* の機能解析を試みた。

最初に OPC の株化細胞 CG4-16 cell を用いて *Ascl1* 過剰発現および発現抑制実験を行い、定量 RT-PCR でオリゴデンドロサイトの分化マーカーの発現を調べると、*Ascl1* がオリゴデンドロサイトの分化に抑制的に働くことが示唆された。しかし、これまでに *Ascl1* がオリゴデンドロサイト分化を抑制するという報告はなく、筆者はそのメカニズムおよび転写ターゲットに注目した。そこで cDNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析と定量 RT-PCR による OPC 関連因子の解析を行い、*Ascl1* の転写ターゲット候補として *Hes5* を同定した。*Hes5* は抑制型 bHLH 転写因子の 1 つで、オリゴデンドロサイト分化にも抑制的に働くことが知られているため、*Ascl1* が *Hes5* を誘導することで、オリゴデンドロサイト分化を抑制していると考えられた。*Hes5* は神経発生過程における未分化細胞の増殖や分化抑制に重要な Notch シグナルの下流分子としても知られており、マイクロアレイの結果では *Hes5* とともに、Notch のリガンドとして知られる *Dll3* の発現増加も認めていた。このため *Ascl1* の *Hes5* に対する作用が直接的なものか、Notch シグナルを介した間接的なものか、を調べるため *Hes5* プロモーター解析を行った。プロモーター活性は Notch ICD (Intracellular domain) 過剰発現で著しく活性化され、*Ascl1* 過剰発現においても活性化が確認できた。この *Ascl1* 過剰発現時の *Hes5* プロモーター活性は γ -セクレターゼ阻害剤を添加し Notch シグナル系を遮断しても低下しなかったことから *Ascl1* の直接的な作用が示唆された。さらに *Ascl1* によるプロモーター活性に重要な領域を特定するためプロモーターの deletion を行いその活性変化を調べたところ、5'-側から 7 個の E-box (E1~E7) を削っても活性は変化しないものの、8 個目の E-box(E8) を削ると活性が大きく低下することが示された。一方、Notch シグナルの結合配列である RBP-J

の前後では活性に変化がなかったことから、Ascl1 が Notch シグナルを介さず E-box (E8) に直接結合することでプロモーターの活性を上げ、Hes5 の発現を制御していると考えられた。さらに ChIP アッセイを行い、Ascl1 の E-box (E8)領域への結合を証明した。

これら *in vitro* の結果から、Ascl1 は抑制型 bHLH 転写因子 Hes5 のプロモーター領域に結合することで Hes5 の発現を誘導し、その Hes5 が OPC の分化を抑制していることが明らかになった。

さらに *in vivo* においても遺伝子改変マウスを用いて、オリゴデンドロサイト発生における Ascl1 と Hes5 の解析を行った。オリゴデンドロサイト発生において Ascl1 が分化の初期と後期で発現を認めるのに対し、Hes5 はオリゴデンドロサイト分化の初期でのみ発現し分化が進むにつれ漸減する。このため Hes5 の発現がみられる胎生 12.5 日のマウスで脳および脊髄の組織学的評価を行ったところ、early stage OPC で Ascl1 と Hes5 が共発現していること、Ascl1 のノックアウトにより OPC における Hes5 の発現が減少する事を明らかにした。これは *in vitro* で示した Ascl1 と Hes5 の関係を支持する結果で、Ascl1 が Hes5 を細胞自律的(*cell autonomous*)に誘導していることを示している。

今回明らかとなった Ascl1-Hes5 のシグナル系は、オリゴデンドロサイト分化の初期に未分化維持の役割を果たしていると考えられる。OPC の脊髄損傷への治療応用を考えたときに、反応性に増殖する内在性 OPC を組織修復に誘導するためには損傷部を充填する十分な量の細胞を確保することが課題となる。このため OPC の転写制御としては然るべき時期まで未分化に維持し増殖を促進することが必要と考えられ、今回明らかになった Ascl1-Hes5 というシグナル経路は OPC の未分化維持機構と捉えることができることから、脊髄損傷治療に向けた OPC 分化制御メカニズム解明の一端を担うと期待される。