

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 上野 高明

本研究は、脊髄損傷における有力な治療ソースとして期待されているオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) の分化制御メカニズムの一端を明らかにするため、*in vivo* および *in vitro* で OPC 関連転写因子の一つである bHLH 型転写因子 *Ascl1* の転写ターゲットの解析を試みたもので、以下の結果を得ている。

1. OPC の株化細胞である CG-4 cell をクローニングして得た CG4-16 cell を用いて *Ascl1* の過剰発現および発現抑制実験を行い、*Ascl1* がオリゴデンドロサイト分化に抑制的に働くことを示した。さらに、より生理的なマウス OPC 初代培養系を用いた実験でも同様な結果を得られた。

2. *Ascl1* の転写ターゲットを探索するため、CG4-16 cell を用いた *Ascl1* 過剰発現で発現上昇を認める遺伝子群を cDNA マイクロアレイで網羅的に解析したところ、コントロール群の 8 倍以上の発現上昇が見られた 13 遺伝子の中に、*Hes5* が含まれていた。*Hes5* は抑制型 bHLH 転写因子として OPC の分化にも抑制的に働くことが知られており、*Ascl1* の発現抑制実験においてもその発現低下を認め *Ascl1* と一致した発現変化を示したことから、*Ascl1* の転写ターゲットの候補と考えられた。

3. *Ascl1* と *Hes5* の関係を調べるため *Hes5* のプロモーター解析を行い、*Ascl1* により *Hes5* のプロモーター活性が上がることを、さらに deletion 解析で bHLH 型転写因子結合配列である E-box が転写活性に関与していることを示した。さらに ChIP アッセイを行い、*Ascl1* が *Hes5* のプロモーター領域に結合することで *Hes5* の発現を誘導していることを示した。

4. さらに *in vivo* でオリゴデンドロサイト発生における両者の interaction を調べるため、遺伝子改変マウスを用いて *Ascl1* と *Hes5* の発現を解析した。オリゴデンドロサイト発生において *Hes5* の発現が見られる胎生 12.5 日目のマウス脳および脊髄の免疫組織染色を行い、Olig2 陽性 early stage OPC で *Ascl1* と *Hes5* が共発現していることを明らかにした。さらにノックアウトマウスの解析では、*Ascl1* 遺伝子欠損により OPC における *Hes5* の発現が低下することを示した。

以上、本論文では early stage OPC における bHLH 型転写因子 *Ascl1* の転写ターゲットとして抑制型 bHLH 転写因子 *Hes5* を同定した。本研究で明らかとなった *Ascl1*-*Hes5* のシグナル系は、OPC の未分化維持機構として、脊髄損傷治療に向けたオリゴデンドロサイト分化制御メカニズム解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。