

論文の内容の要旨

論文題目 Wnt シグナルによる大脳皮質神経系前駆細胞の運命制御メカニズムの解明

氏名 桑原 篤

1. 序論

高度な情報統合機能を持つ大脳新皮質の発達は、動物が哺乳類へ、さらにヒトへと進化する過程で特徴的な現象である。この大脳新皮質の発達の基盤として、ニューロンの数が増えたことが重要である。本研究では、大脳新皮質のニューロンの数を増やすメカニズムを解析した。大脳新皮質のニューロンは、胎生期に存在する神経系前駆細胞から生み出される。脳発生において、神経系前駆細胞はまず増殖してその数を増やし、その後ニューロンまたはグリアへと分化する。それゆえ、ニューロンの数を増やすための作用点としては、この増殖の促進と、ニューロンへの分化の促進の2つが少なくとも挙げられる。私は、この増殖とニューロン分化の両方ともを制御するシグナル伝達経路である Wnt-beta-catenin シグナルに注目して、その大脳新皮質発生における役割を検討した。

Wnt シグナルの役割としては、当研究室を含むいくつかのグループは、これまで Wnt シグナルが神経系前駆細胞のニューロン分化を促進することを報告している (Hirabayashi, Y. et al. 2004 など)。一方、Wnt シグナルが神経系前駆細胞の増殖を促進し、脳を肥大させることも報告されている。Wnt シグナルの効果を媒介する下流の標的遺伝子に関しては、当研究室ではニューロン分化を促進する転写因子 Neurogenin (Ngn) 1 と 2 を Wnt シグナルが直接制御することを見いだしている。一方、Wnt シグナルによる神経系前駆細胞の増殖促進を媒介する標的遺伝子はわかっていなかった。本研究では、まず(1) Wnt シグナルによる神経系前駆細胞の増殖促進を、転写因子 N-Myc が媒介することを明らかにした。さらに、N-Myc が分化に与える影響を調べたところ、意外なことに (2) N-Myc が Wnt による神経系前駆細胞のニューロン分化促進をも媒介することがわかった。

本研究の後半では、Wnt-N-Myc シグナルの大脳新皮質発生における役割を in vivo で解析した。胎生期大脳の神経系前駆細胞は、細胞分裂の位置と遺伝子発現の違いなどに応じて、Ventricular zone (VZ、脳室帯)前駆細胞と Subventricular zone (SVZ、脳室下帯)前駆細胞に分類できる。そしてこれまでこの SVZ 前駆細胞がニューロンの数を決定する作用点として重要であるという仮説が提唱されてきた。特に、動物進化に伴うニューロン数の増加は、SVZ 前駆細胞の増加とよく相関することが示されている。それゆえ、SVZ 前駆細胞の制御機構は、「なぜ哺乳類の脳はこのように発達したのか」、ひいては「なぜヒトはヒトになれたのか」という問いに対する1つの答えを提供する可能性がある。しかし、これまで SVZ 前駆細胞を制御するシグナル伝達経路はほとんどわかっていなかった。そこで Wnt-N-Myc シグナルが in vivo のどの前駆細胞に作用するか検討したところ、(3) Wnt-N-Myc 経路は SVZ 前駆細胞を増やし、大脳新皮質のニューロンの増加に貢献することを示した。

2. 結果と考察

2-1 N-Myc は Wnt による神経系前駆細胞の増殖促進効果を媒介する

これまで Wnt シグナルが胎生期大脳新皮質神経系前駆細胞の増殖を促進する際の標的遺伝子はわかっていなかったのでもまずこれを調べた。Wnt シグナルを活性化する方法としては、精製したリコンビナント Wnt3a (以下 Wnt) を用いた。胎生 10 日目 (E10) マウス大脳新皮質から採取した神経系前駆細胞の初代培養系を、Wnt 刺激して RNA を抽出した。そして、他の系で Wnt による増殖促進の標的遺伝子として知られている Myc ファミリーおよび Cyclin D ファミリーの転写量を定量 PCR で

調べた。その結果、Wnt 刺激により N-Myc の転写量が増加することがわかった。

N-Myc は、ガン遺伝子として知られる Myc 転写因子ファミリーに属し、脳の神経系前駆細胞の増殖に必要であることが報告されている。そこで N-Myc が Wnt シグナルによる神経系前駆細胞の増殖促進を媒介するかを調べた。*N-myc*^{lox/lox} マウスから採取した神経系前駆細胞に、レトロウイルスベクターをもちいて control または Cre リコンビナーゼを遺伝子導入し、control または N-Myc コンディショナルノックアウト (cKO) 細胞をそれぞれ調整した。すると control の神経系前駆細胞では Wnt の添加により増殖を促進したが、N-Myc-cKO 神経系前駆細胞では Wnt の添加による増殖促進効果が見られなかった。すなわち、N-Myc が Wnt による増殖促進に必要であることがわかった。さらに十分性を調べたところ、N-Myc の発現が神経系前駆細胞の増殖を促進することがわかった。

次に、Wnt-beta-catenin による神経系前駆細胞の増殖促進を、N-Myc が *in vivo* でも媒介するか検討した。まず神経系前駆細胞で CRE を発現させるマウス (*nestin*-CRE マウス) と、CRE 依存的に活性型 beta-catenin の発現が誘導されるマウス (*beta-catenin*^{lox(ex3)/+}) を交配させたところ、過去の報告と同様に、活性型 beta-catenin の発現は神経系前駆細胞の増殖を亢進して脳を肥大させた。この活性型 beta-catenin 誘導マウスにおいて、さらに N-Myc をコンディショナルノックアウトすると、活性型 beta-catenin の発現による脳の肥大が緩和されることがわかった。これらの結果から、Wnt-beta-catenin シグナルによる神経系前駆細胞の増殖促進を媒介する標的遺伝子として、N-Myc が重要であることがわかった。

2-2 N-Myc は Wnt による神経系前駆細胞のニューロン分化促進を媒介する

N-Myc は c-Myc と代替可能な機能をもつことが報告されており、c-Myc は幹細胞の分化を抑制し自己複製を促進することが ES 細胞などで示されている。そこで、神経系で N-Myc が分化を抑制するか検討した。

まず、Wnt によるニューロン分化促進に N-Myc が与える影響を検討した。*N-myc*^{lox/lox} マウスから調整した control または N-Myc-cKO 神経系前駆細胞に Wnt を作用させ、ニューロンマーカー bIII-tubulin 陽性細胞の割合を調べた。control では Wnt により bIII-tubulin 陽性細胞の割合が増加し、ニューロン分化の促進効果がみられた。一方、N-Myc-cKO 神経系前駆細胞では Wnt によるニューロン分化の促進が阻害されることがわかった。すなわち、意外なことに、Wnt によるニューロン分化促進に N-Myc が必要であることがわかった。

細胞増殖を制御することがよく知られている N-Myc がニューロン分化を促進する方向で働くという新しい知見が得られたので、さらに N-Myc がニューロン分化を促進するか、十分性を検討したところ、N-Myc の発現がニューロン分化を促進することがわかった。

2-3 Wnt-N-Myc シグナルは SVZ 前駆細胞を増やす

次に、Wnt-N-Myc シグナルが、*in vivo* でどの前駆細胞を制御するか、すなわち VZ 前駆細胞を制御するか、それとも SVZ 前駆細胞を制御するか、もしくはその両方を制御するか検討した。発生中の大脳の神経系前駆細胞にレトロウイルスを用いて活性型 beta-catenin を発現したところ、VZ 前駆細胞マーカー Pax6 陽性細胞が減少し、SVZ 前駆細胞マーカー Tbr2 陽性細胞が増加した。同様に、N-Myc を発生中の大脳で発現したところ、VZ 前駆細胞を減らし、SVZ 前駆細胞を増やすことがわかった。これらの結果から、Wnt-N-Myc シグナルの活性化は SVZ 前駆細胞を増やすことがわかった。

次に、N-Myc が SVZ 前駆細胞の産生に必要なか調べた。*nestin*-CRE マウスと *N-myc*^{lox/lox} を交配して N-Myc-cKO マウスを作成して解析したところ、N-Myc-cKO マウスでは、SVZ 前駆細胞マーカー Tbr2

陽性細胞が顕著に減少することがわかった。この結果から、N-Myc が SVZ 前駆細胞の産生に必要であることがわかった。

SVZ 前駆細胞は、動物の進化の過程でその数が増えたことがわかっており、ニューロンの数を増やすのに貢献すると考えられている。そこで N-Myc がニューロンの産生に与える効果を検討するため、先ほどと同じ N-Myc-cKO マウスについて、大脳ニューロンの配置が終わる生後 5 日目で解析した。その結果、N-Myc-cKO マウスにおいてニューロンの数が減少していた。この結果から、N-Myc がニューロン産生に貢献することがわかった。

3. 結論

本研究では、N-Myc が Wnt シグナルの増殖促進とニューロン分化促進の両方の効果を媒介する重要な標的遺伝子であることを明らかにした。さらに、Wnt-N-Myc シグナルが SVZ 前駆細胞の産生を制御しニューロン産生に貢献することを示し、大脳新皮質のニューロンの数を決める重要な因子の 1 つが初めて明らかにされた。動物進化による大脳新皮質のニューロンの数の増加に、この Wnt-N-Myc シグナルによる SVZ 前駆細胞の制御が貢献した可能性があると考えられる。