

審査の結果の要旨

氏名 桑原 篤

Wnt- β -catenin シグナルは、ES 細胞・組織幹細胞の増殖と分化を制御するシグナル伝達経路である。Wnt- β -catenin シグナルの制御の破綻は、組織の過形成や形成不全を引き起こす。大脳新皮質発生において Wnt- β -catenin シグナルは、神経系前駆細胞の増殖とニューロン分化を制御することが報告されてきた。しかし、増殖と分化の両方を制御する意義がわかっておらず、この経路の *in vivo* での役割は不明な点が多かった。本論文は、Wnt シグナルによる大脳新皮質神経系前駆細胞の運命制御メカニズムを解析したものである。

第1章は緒言であり、研究の背景と本研究の意義を述べている。

第2章では、大脳新皮質ニューロンの数を増やす新しい作用点として、Wnt シグナルがニューロン前駆細胞の産生を促進することを明らかにした。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、神経幹細胞から産生されるニューロン数が増えたことが重要である。最近、神経幹細胞がニューロンへと分化する中間段階として、ニューロンへと分化決定し1-2回増殖する前駆細胞（ニューロン前駆細胞）を介する場合があることが報告された。そして動物進化に伴うニューロン数の増加は、胎生期のニューロン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、ニューロン前駆細胞を増やす機構は、「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。これまでニューロン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が、第2章で Wnt- β -catenin シグナルの大脳新皮質発生における役割を調べた結果、Wnt シグナルがニューロン前駆細胞の制御において重要な役割を果たすことを明らかにした。まず Wnt シグナルの下流の標的遺伝子を検討している。精製したリコンビナント Wnt3a をマウス胎生期大脳新皮質神経系前駆細胞に作用させ、下流の標的遺伝子を検討したところ、Wnt が転写因子 N-Myc の発現を亢進することを示した。そして次にこの N-Myc が、Wnt シグナルによる神経系前駆細胞の増殖促進効果またはニューロン分化促進効果を媒介するかを、N-Myc コンディショナルノックアウトマウスをもちいて解析し、N-Myc が Wnt による増殖とニューロン分化の両方を媒介することを明らかにした。さらに、Wnt-N-Myc 経路の *in vivo* における役割を調べるため、発生中の大脳の神経系前駆細胞において活性型 β -catenin または N-Myc をレトロウィルスベクターをもちいて発現させたところ、活性型 β -catenin または N-Myc の発現が Subventricular zone (SVZ)

領域のニューロン前駆細胞（SVZ-ニューロン前駆細胞）を増やすことを明らかにした。逆に、N-Myc をコンディショナルノックアウトすると SVZ-ニューロン前駆細胞が減少し、ニューロンの数が減少することを示した。以上の結果から、大脳新皮質ニューロンの数を増やす新しい作用点として、Wnt-N-Myc 経路による SVZ-ニューロン前駆細胞産生の促進という機構を明らかにした。

第3章では、Wnt- β -catenin シグナル経路のシグナルの入りやすさを制御する転写因子 TCF3 の大脳発生における役割を解析した。適切な数のニューロンを生み出すためには、発生の過程で神経幹細胞の数を維持することが重要である。そのメカニズムとして神経幹細胞では、なんらかの因子によって Wnt- β -catenin シグナルに対して抵抗性をもっている可能性に着目し、その候補として Wnt- β -catenin シグナル経路の構成因子の1つ TCF3 に注目した。TCF3 は転写因子 TCF/LEF ファミリーの一員であり、Wnt- β -catenin シグナルに対して抑制的に働くことが示唆されているが、大脳新皮質発生における TCF3 の機能はわかっていなかった。そこで第3章では、大脳新皮質発生における TCF3 の機能を、特に神経幹細胞のニューロン分化抑制機構に注目して検討している。まず胎生期大脳における TCF3 の発現を免疫染色で調べ、TCF3 は未分化な神経系前駆細胞で限局して発現していることを示した。さらに、TCF3 の発現が、Wnt- β -catenin シグナル活性を抑制し、神経系前駆細胞のニューロン分化を抑制することを見いだした。さらに、TCF3 を RNAi によりノックダウンすると神経系前駆細胞の分化が促進されることがわかった。これらの結果から、胎生期大脳において TCF3 が Wnt- β -catenin シグナルに対して抑制的に働き、神経幹細胞の未分化性を維持することがわかった。

第4章は結言であり、本論文の総括と将来への展望を述べている。

以上のように、本論文では、Wnt- β -catenin シグナルによる胎生期大脳皮質神経系前駆細胞の運命制御について解析している。まず、Wnt シグナルの下流の制御因子として N-Myc が重要であることを明らかにした。さらに Wnt-N-Myc 経路の *in vivo* での役割を解析し、この経路が SVZ-ニューロン前駆細胞の産生を制御することを示した。第2章の考察で申請者が言及したように、SVZ-ニューロン前駆細胞数は動物進化における大脳皮質の発達と相関することが示されており、Wnt-N-Myc 経路が進化における大脳の発達に貢献した可能性も考えられる。次に、第3章の研究では、神経幹細胞の枯渇を防ぐ因子の一つとして TCF3 が重要である事が明らかになった。本研究により示された Wnt-N-Myc 経路による SVZ-ニューロン前駆細胞の制御と、TCF3 による神経幹細胞の未分化性の維持は、アルツハイマー病などの中枢神経疾患をターゲットとした再生医工学・創薬研究に応用できることが期待される。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。