

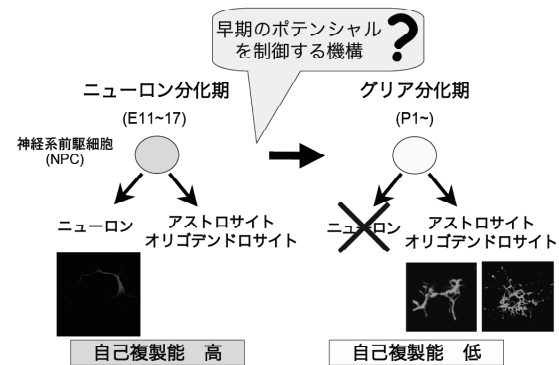
## 論文の内容の要旨

論文題目 大脳皮質神経系前駆細胞における  
ニューロン分化能を制御する因子の探索

氏名 藤井 佑紀

### 序論

組織幹細胞のうちの一つである神経系前駆細胞は神経系を構成する様々なニューロン・アストロサイト・オリゴデンドロサイトを生み出す多分化能を持つ。しかし、神経発生において時期を経るにつれて生み出せる細胞の種類は限られ、特定の領域を除いて神経系前駆細胞のニューロン分化能は失われて行く。また、未分化のまま増殖する能力（自己複製能）も低下して行く（図1）。神経系前駆細胞がニューロン分化能や自己複製能といったポテンシャルを失う際、どのようなメカニズムによって制御されているのかはほとんど明らかになっていない。



幹細胞がそのポテンシャルを失う過程においては、遺伝子の転写パターンが大きく変化する。遺伝子の発現にはクロマチンの凝集状態が深く関係している。クロマチンが凝集していない領域にある遺伝子では、転写因子が接近しやすいために転写が活性化され、逆に凝集した領域では転写が抑制されている。これまで、幹細胞が分化ポテンシャルを失う過程におけるクロマチ

ン状態の変化については、ある特定の遺伝子座における“local”な変化について研究されてきた。一方で近年、クロマチン状態の核全体での“global”な変化についても報告がなされている。ES 細胞では、神経誘導の過程においてクロマチンの凝集状態が核全体で“global”にゆるい状態から凝集した状態へ変化することが観察されている。だが、その分子的基盤は明らかではない。そして、クロマチン状態のゆるさがES細胞の万能性に寄与していると考えられているが、その意義について明らかにはなっていない。また生体内においても global なクロマチン状態の変化が存在するかについては全く分かっていない。

そこで本研究ではまず、発生に従って神経系前駆細胞がニューロン分化能を失って行く時、細胞内でどのような変化が起こっているのか、核内のクロマチンの凝集状態に着目し、これを調べることを目標とした。そして、クロマチンの凝集状態を制御する因子を同定し、この因子が神経系前駆細胞のポテンシャルに与える影響について調べることで、神経系前駆細胞のポテンシャルを規定するメカニズムの一端を明らかにしようと考えた。その結果、神経系前駆細胞がポテンシャルを失うにつれてクロマチン状態が核全体で凝集することを見出した。また、早期のゆるいクロマチンの凝集状態を担う分子としてクロマチン構造タンパク HMGA を同定し、HMGA がニューロン分化能・自己複製能を促進する働きを持つ事を示唆する結果を得た。さらに、HMGA の下流でニューロン分化能を制御する実行分子の候補として IMP2 を同定した。

## 結果

### 1 神経系前駆細胞におけるクロマチン状態の変化

神経系前駆細胞がニューロン分化能を失う際の核全体でのクロマチン状態の変化について調べた。胎生 11 日目マウス大脳新皮質から神経系前駆細胞を採取し、3 日間培養した早期神経系前駆細胞と 9 日間培養した後期神経系前駆細胞を得た。そして、核全体でのクロマチン状態を調べるために細胞のクロマチン画分を micrococcal

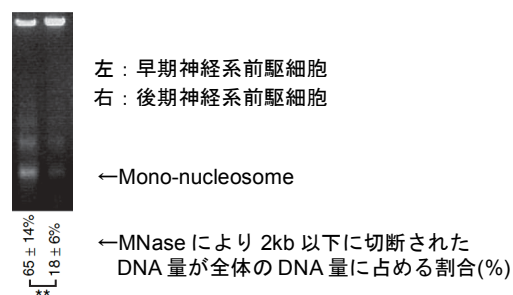


図 2 早期神経系前駆細胞でより多くの DNA が切断され global にゆるいクロマチン状態であることが示唆された

nuclease (MNase) 処理し、切断された DNA の量を比較した。クロマチン状態がゆるければ、MNase がクロマチンに接近しやすく、切断される DNA の量が多いことが予想される。その結果、早期神経系前駆細胞は後期に比べて切断された DNA の量が多く、より“ゆるい”クロマチン状態にあることが示唆された。さらに、ある条件で切断された DNA 量の全体の DNA 量に占める割合が、早期と後期でそれぞれ 65%、18%と大きく異なった(図 2)。ゲノム上で遺伝子コード領域の占める割合が約 2%であることを考えると非常に大きな変化であり、ここで観察したクロマチン状態

の変化が、ある特定の遺伝子座のみでなく核全体で global に起こっていることを示唆している。この結果および他の生化学的解析の結果も併せ、神経系前駆細胞では早期の方が後期に比べクロマチンの凝集状態が核全体でゆるい状態であることが示唆された。

次に、早期神経系前駆細胞でクロマチンの凝集状態を核全体でゆるくしている分子の候補としてクロマチン構造因子 high mobility group A (HMGA)に着目した。本研究で用いている系において、HMGA1 及び HMGA2 の発現が早期神経系前駆細胞で高く、時期が経つにつれて減ることが分かった。このことから、HMGA タンパクが早期の神経系前駆細胞において何らかの働きを担っている可能性が考えられる。そこで HMGA タンパクがクロマチンの凝集状態に与える影響について調べる為に MNase アッセイを行った。HMGA1a あるいは、HMGA2 を後期の神経系前駆細胞に過剰発現し、クロマチン画分の MNase 処理を行ったところ、切断される DNA の量が増えた。従って、HMGA がクロマチンの凝集状態を核全体でゆるくする働きがあることが示唆された。

HMGA タンパクの神経系前駆細胞における働きを調べるために、まず、神経系前駆細胞の性質の一つである自己複製能への影響を neurosphere アッセイにより検討した。その結果、HMGA1a あるいは HMGA2 の過剰発現で neurosphere 形成効率が上昇した。この結果から、HMGA タンパクは神経系前駆細胞の自己複製能を亢進する働きがあることが示唆された。

次に、HMGA が神経系前駆細胞のニューロン分化能に影響する可能性について clonal アッセイを用いて検討した。HMGA1a あるいは HMGA2 を、ニューロン分化能を失った後期神経系前駆細胞に過剰発現したところ、ニューロン産生が上昇することが観察された。従って、HMGA タンパクが早期神経系前駆細胞においてニューロン分化能に貢献していることが示唆された。

これらの結果から、組織幹細胞である 神経系前駆細胞のクロマチン状態が時期を経るにつれて、グローバルに“ゆるい”状態から凝集した状態へ変化する事を見出した。さらに、クロマチン構造因子 HMGA が神経系前駆細胞のグローバルなクロマチン状態をゆるくする働きがあることを示す結果を得た。また、神経系前駆細胞において HMGA がニューロン分化能、自己複製能を促進するという結果を得た。よってクロマチンの凝集状態が“ゆるい”ことが神経系前駆細胞のポテンシャルに重要である可能性が考えられる。

## 2 神経系前駆細胞におけるニューロン分化能の制御

次に、HMGA タンパクがどのように神経系前駆細胞のポテンシャルを制御しているのか、詳細なメカニズムを解明しようと考えた。後期神経系前駆細胞に HMGA2 を過剰発現して発現の上昇する遺伝子を、マイクロアレイによって網羅的に解析し、その中で、早期に発現が高く発生時期依存的に発現の下がる因子を探した。その結果、insulin-like growth factor II binding protein 2 (IMP2, Igf2bp2)が得られた。そこで、早期神経系前駆細胞における IMP2 の働きを調べることにした。

IMP2 が早期神経系前駆細胞にニューロン分化能に寄与しているのか調べるために、clonal アッセイを行った。早期神経系前駆細胞において IMP2 をノックダウンしたところ、ニューロン産生が抑制され、アストロサイト産生が促進された。一方で、ニューロン分化能を失った後期神経系前駆細胞に IMP2 を過剰発現したところ、ニューロン産生は亢進し、アストロサイト産生は抑制された。これらの結果から、IMP2 が HMGA タンパクのように早期神経系前駆細胞のニューロン分化能に貢献していることが示唆された。IMP2 の過剰発現によってニューロン分化が促進されるという現象は in vivo においても観察された。

次に、IMP2 が神経系前駆細胞の自己複製能に寄与しているのかを調べた。そのために neurosphere アッセイを行った。早期において IMP2 をノックダウンし、neurosphere アッセイを行ったところ、形成される neurosphere の数に有意な差は見られなかった。一方、後期において IMP2 を過剰発現して neurosphere アッセイを行った場合にも、形成される neurosphere の数には有意な差は見られなかった。したがって、これらの結果から、IMP2 は神経系前駆細胞の自己複製能には寄与していない事が示唆された。

本研究の結果、HMGA2 の下流で神経系前駆細胞のニューロン分化能を制御する因子として IMP2 を見出した。IMP2 は早期神経系前駆細胞のニューロン分化能に寄与しているが、神経系前駆細胞の自己複製能や増殖には影響を与えない事を示唆するデータを得た。従って、HMGA タンパクが担っている早期神経系前駆細胞での性質の一部、すなわちニューロン分化能の制御を IMP2 が担っている可能性が考えられる。

## まとめ

本研究の結果から、発生時期依存的に神経系前駆細胞がポテンシャルを失うメカニズムの一つとして、核全体でのクロマチンの凝集が寄与していることが示唆された。このような現象を組織幹細胞で観察したことは非常に新しい知見である。また、それと同時に、ニューロン分化能を制御する因子として HMGA, IMP2 を見出した。HMGA にはクロマチンを脱凝集させる働きがあることから、広範なゲノム領域の転写に関与しうするため、非常に興味深い。また、IMP2 は mRNA 結合タンパク質であることから、ニューロン分化関連遺伝子の転写以降の制御を担っている可能性が考えられる。

これらの研究の結果から、神経系前駆細胞がニューロン分化能を失うメカニズムの一端を明らかにできたのではないかと考えている。

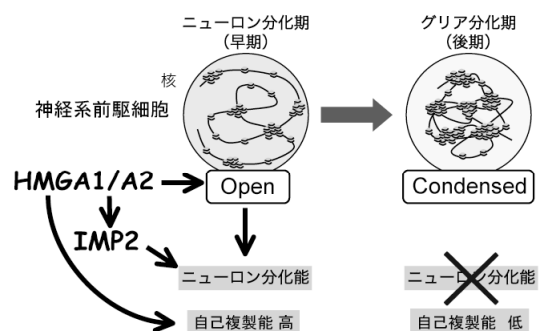


図3 本研究のまとめ