

論文審査の結果の要旨

氏名 柴寄孝幸

本論文では、RNA 結合蛋白質 PTB(polyypyrimidine tract-binding protein)がマウス大脳皮質の胎生期神経幹細胞において、接着結合の維持に寄与することを明らかにした。また、胎生期の接着結合の破綻が生後の PTB 欠損マウスの水頭症の原因であることを示した。

PTB は mRNA 前駆体の選択的スプライシング制御や成熟 mRNA の安定性、IRES (internal ribosome entry site) 依存的な翻訳、細胞内局在の制御に関与することが知られている。一方で、PTB の発現は多くの組織に見られるものの、それぞれの臓器や組織の発生、恒常性維持における PTB の生理学的役割は不明点が多い。

神経系において、PTB の発現は神経幹細胞に発現しており、分化した神経細胞では消失する。培養細胞を用いた研究によると、未分化な細胞から神経細胞への分化過程では多くのエクソンの選択的スプライシングパターンが変化し、そのうちおよそ 25%が PTB の影響下にあることが示唆されている。また、脳脊髄液の産生や循環に関わり、脳の恒常性維持において中心的な役割を担う細胞である神経上衣細胞や脈策叢の上皮細胞にも PTB の発現が見られる。これらの知見から、本論文では PTB が胎生期の神経発生に加え、その後の脳組織の恒常性維持にも重要な役割を担っていると予想し、神経系特異的ノックアウトマウスを作製・解析することで PTB の生理学的役割の解明を試み、以下の結果を得た。

Ptb^{neo/flox};Nestin-Cre マウスは、およそ 90%が生後 10 週までに水頭症を呈して死亡することが明らかとなった。水頭症の主な原因である脳室の閉塞は *Ptb^{neo/flox};Nestin-Cre* マウスには見られなかったが、脳脊髄液の循環に関わる神経上衣細胞が側脳室背側領域特異的に欠損していることが明らかとなった。そこで、この領域特異的な異常が水頭症の原因であるかを確かめるために、側脳室背側領域特異的に Cre 組換え酵素を発現する *Emx1-Cre* マウスを用いて *Ptb^{neo/flox};Emx1-Cre* マウスを作製した。その結果、生後 10 日 (P10) の *Ptb^{neo/flox};Emx1-Cre* マウスの側脳室背側領域においても *Ptb^{neo/flox};Nestin-Cre* マウスと同様に神経上衣細胞が欠損しており、側脳室が異常に拡張し、水頭症様の表現型を呈していることがわかった。

次に PTB の欠損により神経上衣細胞が欠損する機構を明らかにするため、まず PTB が神経上衣細胞の成熟や生存に必須であるかどうか検討した。そのために時期特異的に組換え誘導可能な *Nestin-Cre^{ERT2}* マウスを用いて *Ptb^{neo/flox};Nestin-Cre^{ERT2}* を作製した。多くの神経上衣細胞が胎生後期に神経幹細胞から分化し、生後 1 週間ほどかけて成熟するこ

とから、P0の時点でPTBの発現を消失させるためにタモキシフェンを胎生16.5日(E16.5)で投与した。P0において、PTBの発現は消失していたが、P10では $Ptb^{+/flox};Nestin^{ERT2}-Cre$ と同様に $Ptb^{neo/flox};Nestin-Cre^{ERT2}$ の側脳室背側領域においても神経上衣細胞が観察された。

そこでPTB欠損神経幹細胞において何らかの異常が生じている可能性を検討するため、胎生14.5日以降の胎仔脳の側脳室背側領域を詳細に解析した。その結果、接着結合がE14.5から徐々に消失し始めることが明らかとなった。胎生期の神経幹細胞の自己複製や正常な分化制御には接着結合が重要であることから、接着結合の消失により神経幹細胞の維持に異常が生じることが予想された。E16.5胎仔脳を解析した結果、接着結合が消失した領域では神経幹細胞からの神経分化が亢進していることが明らかとなった。さらにE18.5胎仔脳を観察した結果、 $Ptb^{neo/flox};Nestin-Cre$ マウスでは側脳室背側領域の神経幹細胞が著しく減少していることが確認された。

以上、本論文はRNA結合蛋白質PTBの胎生期神経幹細胞における重要性を明らかにした。PTBの欠損は生後に水頭症を引き起こし、その原因として胎生期神経幹細胞の早期枯渇を発見した。さらには、幹細胞の早期枯渇の原因として接着結合の破綻とその後の早期神経分化を見出している。また、本研究はRNA結合蛋白質と脳領域特異的な神経幹細胞の性質を関連付けるモデルとしても有用であると考えられる。

なお、本論文は、徳永暁憲、坂本怜子、相良洋、野口茂、笹岡俊邦、吉田進昭との、共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって博士（生命科学）の学位を授与できると認める。

以上 1984 文字