

博士論文審査報告書

論文題目

小脳顆粒細胞前駆体の増殖と分化に関わる
細胞生物学的及び分子生物学的
メカニズムの解析

The cellular and molecular mechanisms of
proliferation and differentiation
of cerebellar granule cell progenitors

申請者

宮下	聡
Satoshi	MIYASHITA

電気・情報生命専攻 光物性工学研究

2018年4月

小脳において、顆粒細胞前駆体(Granule Cell Precursors; GCPs)の増殖が著しく阻害されると小脳組織に異常をきたすこと、逆に GCPs の増殖が過剰に起こると小脳組織が肥大化し小脳髄芽腫という GCPs 由来の神経腫瘍発生の原因となることが知られている。これらは、中枢神経系において、神経前駆細胞の増殖が適切に維持され、適切なタイミングで増殖が停止した神経細胞に分化するという過程が重要な発生過程であることを例示している。この過程の分子機構を解明することは発生生物学における中心的課題の一つであるだけでなく再生医療への応用や悪性腫瘍の病態解明などへの発展可能性のある課題であるが、小脳の神経前駆細胞である GCPs の増殖と分化を制御する分子機構については未だ十分に理解されていない。

小脳の発生において、GCPs は胎生期に発生、増殖した後一時増殖を止めることで胎生後期には極めて少数の集団に留まるが、胎生後期から生後にかけて爆発的に増殖、分化して顆粒細胞(Granule Cells; GCs)となり、発生が完了した全小脳神経細胞の 9 割を占めるまでになることが知られている。また、GCPs は遺伝子工学的・分子生物学的常套手法を駆使することができる実験系であることから、小脳 GCPs は神経前駆細胞の増殖と分化を研究する良いモデルであると考えられる。

本論文は、筆者が、神経前駆細胞の増殖と分化の制御機構解明を目指し、上記理由から小脳 GCPs を研究モデルとして実施した研究の成果をまとめたものである。本論文は 6 章から構成されている。以下に各章ごとに評価を加える。

第 1 章「研究背景」では、先行研究をまとめたうえで本研究の必要性と目的、モデルとして採用した GCPs の研究遂行上の合目的性と意義を明示している。

第 2 章「小脳顆粒細胞における分裂軸の解析」では、GCPs の増殖、停止機構に対する形態学的見地からの知見を得るため、外顆粒層(External Granular cell Layer; EGL)が形成されているマウスの胎生後期から生後の様々な発生段階(E16.5 - P15)において、軟膜面から引いた垂線に対する細胞分裂面の角度について調べた結果をまとめている。分裂中 GCPs の可視化の良いマーカーである Phospho-Histone H3 抗体による免疫染色を用い、分裂面角度が 0-30° を Vertical Division(VD)、30-60° を Oblique Division(OD)、60-90° を Horizontal Division(HD)に分類して、発生段階における分裂面角度分布の推移を統計的に解析している。矢状断面と冠状断面いずれでも、すべての発生時期を通じて OD が少ないことから、GCPs の分裂はランダムではなく、VD または HD を能動的に選択していることが明らかになった。また、VD と HD の選択についても発生途上でその傾向が変化し、発生初期には HD が後期には VD がより選択される傾向があるという知見を得ている。この知見と、EGL の形成と消失の時期を照合することで、HD 分裂は主とし

て非対称分裂(GCP→GC+GCP)であり、逆に VD 分裂は対称分裂ではあるが EGL 拡張期には GCP→2GCP、一方消失期には GCP→2GC なる分裂様式を持つというモデルを提唱している。このモデルは EGL の形態学的変化を現象論的に説明できることから、十分に妥当であると評価できる。

第 3 章「SHH シグナルが分裂面角度の決定に与える影響の解析」においては、増殖期 GCPs の分裂面角度選択性の背後にある分子機構解明へ踏み込む一歩として、GCPs 増殖促進の主要シグナル経路と考えられる Sonic hedgehog (SHH)シグナルが分裂面角度に及ぼす影響を調べている。筆者は、小脳スライス培養時の SHH シグナル阻害剤(SANT-1: SHH シグナルのレセプターである Smoothened(Smo)に作用してシグナル伝達を阻害)投与が GCPs 分裂面の偏向性消失を導くことを見出だしている。SHH シグナルが GCPs の分裂方向を制御する役割も担っていることを示唆する新しい知見を得たことは評価すべきである。

第 4 章「転写因子 Atoh1 と NeuroD が小脳顆粒細胞のサブタイプを決定する」では、先に提唱した現象論的モデルを分子レベルで検討した結果をまとめている。通説では EGL 内の増殖性細胞 (Ki67 陽性で標識できる) GCPs は転写因子 Atoh1 を発現する均一細胞集団と考えられていた。筆者は、Ki67 と Atoh1 の二重免疫染色から、GCPs は Atoh1 陽性(AT⁺)と陰性(AT⁻)の細胞群から構成されること、AT⁻の GCPs 群は転写因子 NeuroD を発現(ND⁺)していることを初めて見出だしている。EGL 最表層部に AT⁺GCPs が層構造を作っているという形態学的構造を見出だし、EGL がヒト大脳皮質発生等と同様の 2 段階の増殖細胞層をもつ 3 層構造であることを突き止めている。また、AT⁺GCPs と ND⁺GCPs の遺伝子発現様式と細胞周期の長さの詳細な研究から、前者は活発に増殖している前駆細胞であり、一方後者はより分化の進んだ前駆細胞であると同定している。この過程で、細胞周期の G1 期から S 期への遷移を制御する Cyclin ファミリーである CyclinD1 の細胞周期に依存しない強い発現が AT⁺GCPs のみで見られることも発見している。本章のまとめとして、GCPs が EGL 内でその外側から AT⁺GCPs → ND⁺GCPs → GCs の順で二段階増殖プロセスを経て分化するという新規モデルを提唱している。EGL は 3 層構造であると実験的に明らかにしたこと、Atoh1 と NeuroD のノックダウン実験や強制発現実験からそれら相互の転写抑制が EGL の形成と消失の連続性を担保すると考察したことは秀逸であると評価できる。

第 5 章「CyclinD1 による AT⁺GCPs の維持機構の解明」においては、AT⁺GCPs から ND⁺GCPs への分化の分子機構を調べた結果をまとめている。AT⁺GCPs のみに見られた細胞周期非依存的な強い CyclinD1 の発現に注目して、AT⁺GCPs における Atoh1 発現を維持する分子機構を、CyclinD1 のノックダウン、CyclinD1 のみの過剰発現、CyclinD1 と Cdk4 両方の過剰発現実験によって調べている。CyclinD1 の発現が AT⁺GCPs の維持に重要であり、かつ CyclinD1 と Cdk4 複合体の寄与が支配的であると示唆された。EGL に

存在する GCPs の主要増殖因子は SHH であるので、AT+GCPs が SHH シグナルを受けて CyclinD1 を高発現すると結論付けている。プルキンエ細胞における SHH の発現量は出生後高く 2 週間ほどで減少するが、この変化に連動して CyclinD1 発現量も変化し、それが最終的に Atoh1 発現量の減少・消失を引き起こすことで AT+GCPs→ND+GCPs への連続的な遷移が起こる。この遷移の結果として、EGL は出生後 2 週間ほどで消失する。以上のメカニズムを明らかにしたことは高く評価できる。

第 6 章「総括」では GCPs の発生をモデルとして本論文で得られた神経細胞増殖停止のタイミングを制御する機構についての知見と提言をまとめ、それらに基づいて発生生物学及び臨床応用における今後の研究課題を論じている。

以上を要するに、本論文は EGL の形成と消失過程における GCPs の形態学的変化とその背景にある分子機構を明らかにしている。本論文の成果は、学術面においては神経系の発生生物学の分野で今後広く応用され得る新知見を提供するだけでなく、臨床応用面でも小脳髄芽腫の病態解明や治療法の開発研究への指針を示していると評価できる。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

2018 年 3 月

審査員

(主査) 早稲田大学教授 工学博士 (早稲田大学)

署名日 / /

宗田 孝之

早稲田大学教授 薬学博士 (九州大学)

署名日 / /

柴田 重信

早稲田大学教授 博士 (理学) 京都大学

署名日 / /

岡野 俊行

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

病態生科学研究部長

署名日 / /

星野 幹雄