The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Regulatory mechanisms of neural stem cell proliferation in neocortical development
Author(s)	南出, 良平
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34056
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式3

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（南出　良平）	
論文題名	Regulatory mechanisms of neural stem cell proliferation in neocortical development （大脳新皮質発生における神経幹細胞の増殖制御機構）

論文内容の要旨

大脳新皮質における神経幹細胞は脳室帯（ventricular zone, VZ）と呼ばれる領域で、発生初期から活発に増殖を行っている。また、多分化能を有する神経幹細胞は、発生が進むに従って分化刺激を受け、非対称分裂によりニューロンを産生し、産生されたニューロンは中間帯（intermediate zone, IZ）を通って上層の皮質板（cortical plate, CP）へと移動する。また、発生段階において産生されたニューロンのタイプは異なり、発生後期に産生されたニューロンは発生早期に産生されたニューロンを追い越して上層へと配置される。最終的に大脳新皮質において異なるタイプのニューロンによる６層構造を形成することが知られている。しかし、発生初期における神経幹細胞の増殖制御の詳細な分子メカニズムについては明らかにされていない。Necdinはmelanoma antigen（MAGE）ファミリータンパク質の一つであり、様々なタンパク質と相互作用することで細胞の増殖やアポトーシスを抑制する機能を持つ。細胞増殖においては、転写因子であるE2F1と結合することによりE2F1の転写活性を抑制し、E2F1の下流の遺伝子であるサイクリン依存性キナーゼCdk1の発現を抑制することで細胞増殖を負に制御していることがわかっている。Necdinは中枢神経系において強く発現しており、最終分化したニューロンや筋肉においても発現していることが知られているが、近年、造血性幹細胞や脂肪前駆細胞など組織特異的な幹細胞や前駆細胞においても発現し、その増殖を制御していることが報告されている。ここでは、胎児期の大脳新皮質における神経幹細胞の増殖に対するnecdinの機能について報告する。

Necdinは胎生14.5日目胚の大脳新皮質において、ニューロンの多い層であるCP及び神経幹細胞の多い層であるVZにおいて発現が見られた。そこでnecdin欠損マウスを用いて、生体内におけるnecdin の作用を検討した。野生型マウス及びnecdin欠損マウスの胎生14.5日目胚の前脳を用いて、免疫組織化学染色により神経幹細胞の数を検討すると、野生型マウスに比べてnecdin欠損マウスの大脳新皮質において神経幹細胞が有意に増加していることがわかった。また、胎生14.5日目の母親マウスの腹腔内に、細胞周期のS期に核に取り込まれるBrdUを投与し、胎生14.5日目胚の大脳新皮質での細胞増殖を検討した結果、necdin欠損マウスの大脳新皮質においてBrdU陽性細胞数が増加していた。このことから、necdinが大脳新皮質における神経幹細胞の増殖においても機能していることが示唆された。また、胎生14.5日目胚の大脳新皮質において、野生型マウスに比べてnecdin欠損マウスでは、Cdk1の発現が亢進し、反対にサイクリン依存性キナーゼ抑制因子p16の発現が低下していた。さらに野生型マウス及びnecdin欠損マウスのVZにおける神経幹細胞の細胞周期の長さを測定した結果、necdin欠損マウスにおいて細胞周期の長さが短くなっていることがわかった。このことから、生体内におけるnecdin欠損マウスの神経幹細胞は細胞周期に関連した遺伝子であるCdk1やp16の発現の亢進及び低下により細胞周期が短縮され、細胞増殖の亢進を引き起こしていることが示唆された。また、野生型マウス及びnecdin欠損マウスの大脳新皮質から単離した神経幹細胞を培養し、BrdUの取り込みによる増殖及び細胞周期に関連した遺伝子の発現を検討した結果、生体内と同様の表現型を示した。p16は、ポリコーム群転写因子であるBmi1によってその発現を負に制御されていることが知られている。そこで、necdinとBmi1の相互作用について検討した。大腸菌によって発現・精製したタンパク質を用いた*in vitro*結合解析及び遺伝子導入した培養細胞と野生型マウス及びnecdin欠損マウスの神経幹細胞を用いた共免疫沈降法により、necdinとBmi1は直接かつ内在的に相互作用することが示唆された。また遺伝子導入した培養細胞を用いてBrdUの取り込みにより細胞増殖を検討した結果、necdinとBmi1は細胞増殖において各々の機能を抑制し合うことがわかった。さらに遺伝子導入した培養細胞を用いて互いの転写抑制の機能に対する影響を検討した結果、Bmi1はnecdin誘導性のE2F1への転写抑制を解除し、反対にnecdinはBmi1誘導性の転写抑制を解除した。さらに野生型マウス及びnecdin欠損マウスの大脳新皮質由来の神経幹細胞を用いたクロマチン免疫沈降法により、Bmi1のp16プロモーターへの結合能がnecdinの有無によって変化するかを検討したところ、necdin欠損マウスの神経幹細胞においてBmi1のp16プロモーターへの結合能が有意に増加した。よって、necdinとBmi1は結合することで、下流遺伝子の転写に対して互いに抑制を解除し合うことが示唆された。また、大脳新皮質から単離した神経幹細胞に、レンチウイルスを用いて遺伝子導入を行ったところ、necdinを発現させた場合、p16の発現は増加、Cdk1の発現は低下し、神経幹細胞の増殖は低下した。一方Bmi1を発現させた場合、p16の発現は低下、Cdk1の発現は増加し、神経幹細胞の増殖は増加した。以上の結果から、necdinとBmi1は拮抗的に相互作用することにより下流遺伝子の発現を制御し、大脳新皮質の神経幹細胞の増殖を制御していることが明らかとなった。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　南出　良平　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教 授	吉川 和明
	副 査　教 授	関口 清俊
	副 査　教 授	古川 貴久

論文審査の結果の要旨

哺乳類の大脳皮質において高次神経機能を担う神経細胞(ニューロン)は、発生初期に形成される神経管に存在する神経幹細胞から分化する。成体脳における神経細胞の数は、神経幹細胞の増殖度によって決定されるため、神経幹細胞の増殖制御機構は、哺乳類における脳発達の分子的基盤を明らかにする上で重要である。神経幹細胞の増殖は、従来から知られている細胞周期に関連する分子群によって制御されているものと考えられるが、発生初期の神経管中に存在する神経幹細胞に特徴的な細胞増殖制御の分子機構の詳細については明らかにはなっていない。

本論文では、マウス大脳皮質における胎仔期の神経幹細胞の増殖制御に、神経細胞の分化促進に働く necdin が関わっていることを、necdin 遺伝子欠損マウスと、それから調製した神経幹細胞を用いて証明した。necdin は、それ自身でサイクリン依存性キナーゼ cyclin-dependent kinase 1(Cdk1)遺伝子の発現を抑制する作用をもつが、それ以外にも、ポリコームグループ蛋白質 Bmi1 に直接結合して Bmi1 によるサイクリン依存性キナーゼ阻害分子 p16 遺伝子の発現抑制を解除することが明らかになった。細胞周期調節において Cdk1 は促進的、p16 は抑制的に働くことが知られているため、necdin は Cdk1 の発現抑制と p16 の発現増加の両作用によって、神経幹細胞の増殖を強く抑制することが分かった。一方、Bmi1 は necdin による Cdk1 遺伝子発現の抑制を解除することによって、細胞増殖を促進することも明らかになった。また、necdin と Bmi1 の相互作用により、Cdk1 と p16 が遺伝子転写レベルで調節されることを、プロモーター活性測定法やクロマチン免疫沈降法を用いて証明した。さらに、大脳新皮質から調製した初代神経幹細胞にレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行い、necdin と Bmi1 の内在性発現を抑制することによって、両者の拮抗的相互作用が生理的にも大脳皮質の神経幹細胞の増殖を制御していることを実証した。

以上のように、哺乳類の神経管中に存在する神経幹細胞の増殖が、necdin と Bmi1 の拮抗的相互作用によって制御されていることを明らかにした本論文は、哺乳類における神経幹細胞の増殖制御機構の解明に大きく貢献するものと考えられる。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。