

Title	多能性幹細胞からの誘導系を用いたセロトニン神経細胞分化に関する分子薬理的検討
Author(s)	山崎, 淳史
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/34398">https://hdl.handle.net/11094/34398</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏名 ( 山崎 淳史 )

## 論文題名

多能性幹細胞からの誘導系を用いたセロトニン神経細胞分化に関する分子薬理的検討

## 論文内容の要旨

セロトニン (5-hydroxytryptamine: 5-HT) 神経は、睡眠や摂食行動などの脳機能から、情動や認知機能などの高次脳機能まで多岐にわたる機能を調節している。脳神経発達期においては、5-HT神経が各種神経系の中で最も早期に分化・成熟し、神経新生や神経回路形成を制御しており、成体の脳機能だけではなく脳神経発達を調節する重要な神経系である。また、5-HT神経系の変調によって、様々な疾患、特にうつ病などの精神疾患が発症することが明らかにされている。さらに最近、これら精神疾患の病態に、出生後早期の5-HT神経系の機能異常も関与する可能性が示されている。これらのことから、未だ不明な点の多い精神疾患の発症メカニズムを解明するためには、5-HT神経系の成体における機能研究に加えて、発達機構の研究も重要であると考えられている。

神経細胞の分化・発達研究の研究手法の一つとして、多能性幹細胞からの分化誘導系が用いられており、当研究室では、マウス胚性幹 (ES) 細胞/人工多能性幹 (iPS) 細胞からの5-HT神経分化誘導法 (マトリゲル-noggin法) の構築に成功している。本誘導法は、分化誘導因子としてnogginのみを使用し、細胞塊の解離や播き直しのプロトコルを含まない、シンプルで再現性の高い誘導法であるため、分子機構の解明に適した手法であると考えられる。また、5-HT神経マーカーや転写因子の発現パターンが、生体の5-HT神経細胞の発達のものと同様であることから、本誘導法でみられる5-HT神経細胞の分化機構を解明することは、生体の5-HT神経系の発達機構を解明する手がかりになると考えられる。そこで本検討では、マトリゲル-noggin法を用いて5-HT神経細胞の分化機構の解明を試み、さらに本誘導法を利用して、神経機能を調節する分子の一つであるmicroRNA (miRNA) の5-HT神経細胞における発現および機能解析を行った。

5-HT神経細胞の詳細な分化機構の解明には、様々な薬理的検討を行う必要があるが、従来の実験手法では、5-HT神経分化の誘導効率の評価に多大な手間と時間がかかっており、詳細な検討が滞っていた。そこで、まず5-HT神経分化誘導効率を簡便に評価できる実験系の構築を試みた。5-HT神経特異的なプロモーターと分泌型ルシフェラーゼを用い、5-HT神経に分化すると分泌型ルシフェラーゼを発現する組換えES細胞を作製し、新たな実験系とした。本細胞を培養すると、5-HT神経分化に従い培養上清のルシフェラーゼ活性が上昇し、培養上清を回収するのみで5-HT神経分化の評価が可能であることが明らかになった。また、本実験系は、継時的かつ高効率な5-HT神経分化の評価が可能であり、ハイスループットスクリーニングへの応用も可能であることから、5-HT神経細胞の詳細な分化機構の解明に貢献できるものであると考えられた。次に、この実験系を用いてマトリゲル-noggin法の分子基盤解析を行った。候補化合物の5-HT神経分化誘導作用を評価したところ、nogginとは異なる作用点により、直接bone morphogenetic protein (BMP) シグナルの阻害を引き起こすI型BMP受容体キナーゼ阻害剤が、5-HT神経分化誘導作用を示すことを見出した。また、同じtransforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) スーパーファミリーに属するTGF- $\beta$ シグナルが制御する遺伝子の発現解析により、nogginやI型BMP受容体キナーゼ阻害剤はBMPシグナルの阻害と同時に、TGF- $\beta$ シグナルの活性化を引き起こす可能性を明らかにした。さらに、TGF- $\beta$ シグナルの活性化を阻害することで、nogginの5-HT神経分化誘導作用が抑制されることを見出した。これらのことから、ES細胞からの5-HT神経分化には、培養初期におけるBMPシグナルの遮断とTGF- $\beta$ シグナルの活性化が重要であることが明らかになった。

次に、5-HT神経の分化や機能調節に関わる分子メカニズムを解明することを目的に、miRNAの5-HT神経細胞における発現と機能解析を行った。miRNAは、mRNAの3' 非翻訳領域にある相補的な配列と結合し、遺伝子の翻訳阻害やmRNAの分解を促進することが知られている。神経細胞の分化や機能維持に関与することが最近明らかにされており、5-HT神経の形質獲得や機能維持に対しても、重要な役割を果たしている可能性が考えられる。そこで、マトリゲル-noggin法を用いて誘導した5-HT神経細胞から抽出したmiRNAを次世代シーケンサーにより解析し、5-HT神経細胞で特異的な発現を示すmiRNAの同定を試みた。その結果、5-HT神経細胞に高発現するmiRNAの同定に成功し、3つの条件から特に強く発現している6種類のmiRNAを選出した。次に、選出したmiRNAの*in vivo*における発現を解析するため、

成体マウスの様々な脳領域でのmiRNAの発現をリアルタイムRT-PCR法を用いて定量したところ、定量したmiRNAの一つが、5-HT神経細胞の細胞体が局在する縫線核において特異的に発現していることを明らかにした。また、miRNAが発現する細胞種を特定するため、miRNAの*in situ* hybridizationと5-HT合成酵素（Tph2）に対する抗体を用いた免疫染色の二重染色を行った。その結果、染色を行ったmiRNAはいずれも、縫線核に存在するTph2陽性細胞の一部に発現していることが明らかになり、これらのmiRNAは5-HT神経細胞で発現し機能を有している可能性が示された。

以上の検討から、今回、これまで明らかにされていなかった5-HT神経への運命決定に関わる重要な初期シグナルの特定、および5-HT神経機能に関与するmiRNAの同定に成功した。本検討で得られたこれらの成果は、5-HT神経系の発生・機能調節機構の解明に貢献するものであると考えられ、さらには未だ不明な点の多い精神疾患の病態解明の手がかりとなることが期待できるものである。今後、本検討により見出したシグナルやmiRNAの機能解析を、*in vitro*ではマウスES細胞に加えて5-HT神経細胞株RN46Aや精神疾患患者由来のiPS細胞を、*in vivo*では胎児期マウスや精神疾患のモデルマウスを用いて進めることで、精神疾患の病態基盤の解明に一層近付くことができると期待される。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 山 崎 淳 史 )	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教 授 橋本 均
	副 査 教 授 堤 康央
	副 査 教 授 土井 健史
	副 査 教 授 水口 裕之

## 論文審査の結果の要旨

セロトニン (5-HT) 神経は、その機能の変調によって、不安障害、うつ病などの様々な精神疾患が発症し得ることが明らかにされており、本神経系を標的とした治療薬が汎用されている。最近、これら精神疾患の病態には、成体における5-HT神経系の変調に加えて、出生後早期の5-HT神経系の機能異常が原因となる可能性が示されている。これらのことから、未だ不明な点が多い精神疾患の発症メカニズムを解明するためには、成体5-HT神経系の機能研究に加えて、その発達機構の研究も重要であると考えられている。生体内に、極めて少数しかなく、培養細胞も未だほとんど樹立されていない5-HT神経細胞の発達過程を研究する方法論として、胚性幹 (ES) 細胞からの分化誘導系が有望と考えられている。神経薬理学分野では、最近、ドパミン神経分化には全く影響を与えず、5-HT神経分化を選択的に誘導する独自のマウスES細胞分化誘導系を作製することに成功している。

以上の背景のもと、「多能性幹細胞からの誘導系を用いたセロトニン神経細胞分化に関する分子薬理的検討」と題する学位論文において山崎は、当研究室で開発したES細胞からの5-HT神経分化誘導法を用いて、5-HT神経細胞分化を検出する新たな評価系を構築し、この系を用いて5-HT神経の分化メカニズムに関するいくつかの知見を見出した。また、5-HT神経細胞で発現するmicroRNA (miRNA) も初めて同定した。この研究成果は、これまで明らかにされていなかった5-HT神経系の発生・機能調節機構の一端の解明につながり、精神疾患の病態解明の手がかりとなることが期待されるものである。以下、本学位論文で発表された研究成果を示す。

1. 分泌型ルシフェラーゼを用いて、5-HT神経細胞の分化を検出する実験系を確立した。
2. Nogginおよび複数のI型BMP受容体キナーゼ阻害剤が、BMPシグナル下流遺伝子の発現を抑制するだけではなく、TGF- $\beta$ シグナル下流遺伝子の発現を上昇させ、5-HT神経を分化誘導することを明らかにした。
3. I型TGF- $\beta$ 受容体キナーゼ阻害剤SB-431542は、BMPシグナル下流遺伝子の発現低下およびTGF- $\beta$ シグナル下流遺伝子の発現上昇を阻害し、5-HT神経分化誘導作用を阻害することを明らかにした。
4. 高純度の5-HT神経細胞を用いたプロファイリングにより、6種のmiRNAが、5-HT神経細胞において有意に高発現することを見出した。この中には、最近の統合失調症の大規模ゲノムワイド関連研究で最も関連が強い遺伝子として同定されたmiR-137が含まれており、その病態機序への関与が推定された。
5. *In vivo*解析から、上記のmiRNAのうち1つのmiRNAが5-HT神経細胞の起始核である縫線核を含む脳領域で特異的に強く発現しており、縫線核5-HT神経細胞の一部に発現していることを *in situ* hybridization法と免疫組織化学の同時検出法により明らかにした。

以上のように、本研究はこれまで明らかにされていなかった、5-HT神経への運命決定に関わる可能性がある初期シグナルの同定、および5-HT神経機能に関与し得るmiRNAを同定したものであり、これらの成果は、5-HT神経系の発生・機能調節機構ならびに精神疾患の病態基盤の解明に貢献するものであると考えられる。