The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The bHLH Gene Hes 1 as a Repressor of the Neuronal Commitment of CNS Stem Cells
Author(s)	中村, 由紀
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41839
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【16】

氏　　名	中村由紀（なかむら ゆき）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　15221　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	The bHLH Gene *Hes 1* as a Repressor of the Neuronal Commitment of CNS Stem Cells （中枢神経系幹細胞からニューロンへの運命決定抑制因子としてのbHLH遺伝子 *Hes 1*）
論文審査委員	（主査） 教　授　岡野　栄之 （副査） 教　授　近藤　寿人　　教　授　仲野　　徹

論文内容の要旨

【目的】

哺乳類の中枢神経系はその細胞数および機能において他の生物に比べて高度に発達している。神経発生のメカニズムの一端を明らかにするため、bHLH型転写因子群のひとつ、*Hes* 1に注目した。*Hes* 1はニューロン分化を抑制的に制御することが報告されている。しかしながら、ニューロン分化過程は最も未分化な神経幹細胞から成熟ニューロンに至るまでの多段階にわたり、そのどの段階において*Hes* 1が機能しているかは明らかではなかった。我々は*Hes* 1がニューロン分化のどの段階において機能しているかを明らかにするために、*Hes* 1遺伝子欠失変異マウスの中枢神経発生過程を細胞レベルで検討した。

【方法ならびに成績】

用語については一般的な定義が確立されていないため、本論文での用語について以下のように定義する。

神経幹細胞：自己複製能および多分化能を有する神経系のもっとも未分化な前駆細胞。

ニューロン前駆細胞：神経幹細胞に由来し、ニューロンのみに分化する単一分化能と分裂能を有する中間型前駆細胞。

神経系前駆細胞：神経幹細胞、ニューロン前駆細胞等を含めた神経系の前駆細胞の総称。

1）*Hes* 1－／－マウス中枢神経発生異常の概要をつかむため、胎生10.5日および12.5日の凍結切片および分散培養細胞において神経前駆細胞群のマーカー（nestin, PCNA, Musashi 1, Ki67）およびニューロンのマーカー（MAP 2, Neurofilament, TuJ 1, Hu）を用いて免疫染色を行った。*Hes* 1－／－マウス終脳ではニューロンが野生型マウスの約2倍存在し、ニューロンの成熟が亢進していたことから、ニューロンの細胞系譜において分裂中のニューロン前駆細胞あるいはそれ以前の段階から*Hes* 1欠損による異常が起きていることが示唆された。しかし現存のマーカーで神経幹細胞とニューロン前駆細胞を区別できるものはなく、神経系前駆細胞での変化を検出することはできなかった。

2）神経幹細胞の*Hes* 1欠損による性質変化を検出するため、neurosphere assay法を応用した。神経幹細胞は浮遊培養系においてneurosphereと呼ばれる単一細胞由来の細胞塊を形成することが知られている。*Hes* 1－／－マウスでは一定数の終脳細胞から形成されるneurosphereの数が野生型に比べ減少していることから終脳に存在する神経幹細胞の数が減少していると考えられた。またこのneurosphereを継代しsecondary neurosphere数を検討した結果、

Hes 1 －／－神経幹細胞の自己複製能は野生型のものに比べ低下していた。

3）*Hes* 1 －／－マウス神経幹細胞の性質をさらに検討するため、neurosphere differentiation assay を行った。正常の neurosphere は 1 %血清入培地中で接着培養するとニューロン、グリアを含む様々な細胞種に分化する。*Hes* 1 －／－neurosphere はニューロンのみに分化したものが野生型に比べ有意に増加していた（1.9%→20.8%）。すなわち、*Hes* 1 －／－マウスでは神経幹細胞は早期に多分化能を失って減少し、一方ニューロンへの運命決定が亢進した結果ニューロン前駆細胞の過剰産生が起こっていると考えられた。

4）次に *Hes* 1 欠損によるニューロン前駆細胞の性質変化を検討するため、共培養アストロサイト存在下でニューロン前駆細胞を単一細胞が識別可能な程度の低い細胞密度で接着培養し、これを追跡観察することによりニューロン前駆細胞の細胞系譜を調べた。*Hes* 1 －／－マウスではひとつのニューロン前駆細胞が生むニューロンの数が野生型に比べ減少しており、また多くのものが早期に最終分裂を終えてしまったり、細胞死を起こすことが観察された。

5）凍結切片、培養細胞での TUNEL 染色、および神経栄養因子を用いた細胞死阻害実験により *Hes* 1 －／－マウスでは細胞死が亢進しており、死んでいく細胞はNT 3 反応性のニューロン前駆細胞および幼若なニューロンである可能性が高いと考えられた。

【総括】

以上の結果より *Hes* 1 は、神経幹細胞がニューロンの細胞系譜へとその細胞運命を決定する段階において、抑制的に機能していることが明らかとなった。*Hes* 1 がニューロンへの運命決定を抑制することにより、神経幹細胞は自己複製能および多分化能を保ち、中枢神経細胞の供給源として充分な数と機能を確保している、と考えられている。また *Hes* 1 によるコントロールが失われると、機能的な異常を伴うニューロン前駆細胞が過剰に産生されてしまい、これらの多くは細胞死により排除されることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は哺乳類神経発生制御機構の一端をあきらかにするため、bHLH 型転写因子のひとつ *Hes* 1 のノックアウトマウスの神経発生を細胞レベルで詳細に解析し、下記の結果を得ている。

1）*Hes* 1 は神経幹細胞からニューロンへの運命決定を抑制的に制御する。

2）*Hes* 1 は神経幹細胞の自己複製能および多分化能を維持するのに不可欠である。

3）*Hes* 1 機能欠失による神経発生異常はニューロン前駆細胞の細胞死につながる。

本研究は組織化学による解析のうえに、neurosphere 法、低密度培養法といった最近開発された特殊培養技術を駆使することにより、マーカーによる全容把握が困難な哺乳類神経細胞の発生過程を細胞機能的に評価し、ひとつの遺伝子が神経発生のどの過程に必要であるかを明らかにしており、今後様々な遺伝子の機能を解析するにあたり有効な方法を提示したといえる。また神経幹細胞の自己複製能や多分化能の維持機構とニューロンの運命決定制御機構が *Hes* 1 というひとつの遺伝子の表裏一体の作用であるという示唆は、幹細胞からの神経細胞発生機構を理解するうえで大きな貢献をなすと考えられ、学位論文に値する。