The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	神経細胞の分化におけるSox6の役割に関する研究
Author(s)	金澤, 美知子
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46001
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

【28】

氏　　名	金澤（濱田）美知子（かなざわ はまだ みちこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　19638　号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	**神経細胞の分化におけるSox6の役割に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教授　山元　弘 （副査） 教授　八木　清仁　　教授　田中　慶一　　教授　松田　敏夫

論文内容の要旨

哺乳動物における神経系の発生は、器官発生の中で最も初期に起こる重要で複雑な現象の一つである。その過程にはいくつかの転写因子ファミリーが重要な役割を果たしていると推定されている。このような神経の発生に重要な転写因子の一つにSox蛋白ファミリーがある。Sox蛋白は、HMG（high mobility group1）ドメインと呼ばれる約80個のアミノ酸からなるDNA結合ドメインを持つ約20種の転写因子群である。中枢神経系の発生過程では、Sox1が神経幹細胞から発生した初期の神経前駆細胞に特異的に発現して、早いステージで神経細胞の分化に関与すると考えられている。Sox2、3は胎生期の中枢神経系の広い領域で高発現し、中枢神経系の形態形成に関わっていることが示唆されている。また、Sox6は胚発生期の非常に限定した時期に限られた領域でのみ発現している。Connorらのin situ hybridizationの実験によればSox6はマウスの胎生9.5-12.5日の中枢神経、眼胞、耳胞に限局して発現していた。後に軟骨形成に働くことも報告されたが、中枢神経系での役割は不明である。本研究はSox6の中枢神経系や感覚器での限局した発現に注目し、中枢神経系の発生過程でのSox6の役割を検討した。

第一に、中枢神経系の発生とSox6の発現の変動を調べた。まずマウス及びラット脳の発生過程で、Sox6の発現の変動をNorthern blot分析で解析した。Connorらによればマウス脳でのSox6の発現は胎生9.5-12.5日の脳、感覚器でのみ検出されていたが、Sox6が脳で胎生10日以降から出生4日迄継続して高い発現が持続していること、さらにlong formとshort formの両方が発現していることを見いだした。そこでSox6の神経細胞の分化における役割をより詳細に検討するため、胚性腫瘍細胞P19に着目した。P19細胞は、レチノイン酸（以下RA）を加えて凝集培養すると、神経細胞とグリア細胞の両方に分化できることから神経系の分化を研究する上で都合の良いモデルの一つである。P19細胞の各分化段階でのSox6の発現を検討した結果、Sox6はP19細胞がRA及び凝集条件下、いわゆる拘束（commitment）状態の時に増加し、神経細胞の分化とともにむしろその発現が減少した。また、誘導時のSox6の発現量とその後の神経細胞への分化の頻度とほぼパラレルであった。このことはSox6がP19細胞の神経前駆細胞への誘導時に発現して働いていることを示唆している。

第二に、Sox6がP19細胞での神経細胞の分化に重要な働きをしているならば、P19細胞にSox6を過剰発現させれば神経細胞の分化に何らかの影響を及ぼすのではないかと考え、Sox6過剰発現P19細胞株を作成した。野生型P19細胞は神経細胞への分化にRAが必須であるが、Sox6を過剰発現させると、RA不在下で自ら細胞同士が凝集し、神経突起を伸展し神経細胞へと分化した。即ちSox6の過剰発現だけでP19細胞を神経細胞へ分化させることができた。そのときSox6過剰発現P19細胞では、細胞接着分子E-cadherinとN-cadherin両方の発現が著しく上昇し、その結

果分散培養にもかかわらず細胞同士が著しく凝集した。また Sox6 過剰発現細胞では神経細胞の分化に関連の深い Wnt-1、Mash-1 の転写が促進していた。従って Sox6 は P19 細胞で細胞接着分子の発現を増加させて細胞の凝集を起こし、さらに神経細胞への分化に関連する遺伝子の転写を直接あるいは間接的に促進し、結果として P19 細胞を神経細胞に分化させたと考えられる。

第三に、P19 細胞において Sox6 が神経細胞の分化に必須かどうか検討するために、antisense-Sox6 発現ベクターを導入し、恒常的に Sox6 の発現を抑制した P19 細胞株を作成した。この Sox6 抑制細胞株は幹細胞特異的転写因子 Oct-3/4 を発現していることから、幹細胞としての性質を一部保持しているが、RA を添加しても神経細胞に全く分化しなかった。この細胞株はまた RA で誘導中、浮遊培養をして細胞が凝集しやすい条件にしているにもかかわらず、細胞接着分子 E-cadherin の発現が低下し、細胞はほとんど凝集塊を作らず、更に高い頻度で細胞死を起こすことを見いだした。この細胞死は DNA の断片化、クロマチンの凝集、caspase3 活性の上昇を伴うことから、apoptosis 型細胞死であると推測された。つまり Sox6 の発現を抑制することで、P19 細胞は RA で分化誘導中に細胞接着分子や Wnt-1 や Mash-1 のような神経分化関連遺伝子の発現ができず神経細胞に分化できなくなってしまうことが判明した。また、同時に RA 依存的に apoptosis が高頻度で起こることを見いだした。

以上から、Sox6 は中枢神経の発生過程で未分化な神経の前駆細胞で働く可能性が示唆された。その働きは、細胞の凝集を促進し、RA シグナルの下流で Wnt-1 の発現を増加させ、その後、Mash-1、N-cadherin などの発現も促し、結果として神経細胞への分化を促進するのではないかと推測できる。また、その過程で Sox6 は RA による apoptosis から細胞を守り、生存を維持している可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨

神経系の発生は態官発生の中で最も初期に起こる重要で複雑な現象の一つである。近年、神経幹細胞の発見に端を発し、神経変性疾患への幹細胞移植による再生医療を目指した研究が進んでいるが、神経再生を成功させるためには神経発生の遺伝子制御メカニズムを知ることが重要である。そこで本研究では、神経系の発生初期に特異的に発現している転写因子 Sox6 に着目し、Sox6 の神経系の分化への関わりを細胞生物学的、分子生物学的に解析した。

(1) 中枢神経系の発生段階で、Sox6 は胎生 10 日以降から出生 4 日までのマウス脳で継続して高い発現が認められ、その後速やかに消失した。

(2) 胚性腫瘍細胞 P19 を用いて解析したところ、P19 細胞がレチノイン酸（RA）存在下、及び凝集条件下では、いわゆる拘束状態の時に Sox6 発現は増加し、神経細胞への分化とともにその発現が減少した。

(3) Sox6 過剰発現 P19 細胞株を作成した。野生型 P19 細胞は神経細胞への分化に RA が必須であるが、Sox6 を過剰発現させると、RA 不在下でも自ら細胞同士が凝集し、神経突起を伸展し神経細胞へと分化した。このとき、神経細胞の分化に関連が深い Wnt-1、Mash-1、E-cadherin、N-cadherin の転写が促進していた。

(4) アンチセンス法で恒常的に Sox6 の発現を抑制した P19 細胞株を作成した。Sox6 抑制細胞株は幹細胞特異的転写因子 Oct-3/4 を発現していることから、幹細胞としての性質を一部保持しているが、RA を添加しても神経細胞に全く分化しなかった。

(5) sox6 抑制細胞株では RA 依存的に apoptosis が高頻度で起こった。これは Sox6 が神経細胞の分化の過程で細胞の生存に関わっている可能性を示唆した。

本研究は、転写因子 Sox6 が神経前駆細胞の分化に働くことを明らかにした。P19 細胞の神経細胞への分化を単独で引き起こすことができる因子は Sox6 以外に未だ報告されていない。更に、Sox6 が神経前駆細胞の生存にも働く可能性が示唆されたことは、神経系の発生段階での分化と apoptosis のメカニズムを解明する糸口になることが期待される。本研究は、神経系の発生・分化のメカニズム解明に役立ち、これらの成果を発展させることで神経幹細胞を用いた再生医療のための基礎研究に貢献できる可能性を秘めており、薬学博士の学位を授与するにふさわしいものと考える。