



Title	EphA Receptors Direct the Differentiation of Mammalian Neural Precursor Cells through a Mitogen-activated Protein Kinase-dependent Pathway
Author(s)	青木, 美和
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47497
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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

氏 名	あおきみわ 青木美和
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 20995 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学 位 論 文 名	EphA Receptors Direct the Differentiation of Mammalian Neural Precursor Cells through a Mitogen-activated Protein Kinase-dependent Pathway (EphA 受容体の、MAPK カスケードを介した神経前駆細胞分化への関与)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 遠山 正彌 (副査) 教 授 祖父江憲治 教 授 狩野 方伸

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

Ephrin は、Eph 受容体型チロシンキナーゼ RTK の細胞膜結合型リガンドであり、神経細胞の軸索誘導、移動の様々な発生過程に関与する。Eph 受容体と ephrin には、A、B 二つのサブクラスがあり、それぞれに特異的なリガンドの ephrin と結合する。Ephrin の構造はサブタイプにより大きく異なり、ephrinA は GPI アンカーにより細胞膜についているが、ephrinB は膜貫通ドメインにより細胞上に存在している。また、EphB はリガンド依存性に RTK カスケードを活性化することにより、神経幹細胞増殖促進に働いていることが報告されている。ところが EphA の一部はこれとは逆に Ras/MAPK カスケードを阻害し、腫瘍細胞の増殖を阻止することが分かっている。

私たちは、Eph/ephrinA が神経系の発生時に神経分化に影響を及ぼすという結果を検証した。

〔 方法ならびに成績 〕

E14 マウス脳室壁周囲部位において、神経系の未分化な細胞のマーカーである nestin 陽性細胞に、EphA が発現しているかを免疫染色法により検討した。EphA3、A4 とそのリガンドである ephrinA1 が nestin と共局在していることがわかった。さらに、マウス胎児線条体細胞に含まれる神経前駆細胞を培養し、neurosphere を作成した。この神経前駆細胞に、EphA3 が発現している事が確認された。

この神経前駆細胞への ephrinA 付加が、神経前駆細胞の増殖や分化に影響を及ぼすかについて検討した。付加後、5 日目では 1 日目に比べ、全細胞数に対する nestin 陽性細胞数は、ephrinA 付加では減少することがわかった。細胞死アッセイでは、ephrinA 付加による細胞死が起きていないことを確認した。次に、神経分化への影響を検討した。EphrinA 付加 5 日目では 1 日目に比べ、TuJ 1 陽性を示す細胞の数の有意な増加が観察された。この様にして、ephrinA によって神経細胞分化した細胞は TH 陽性を示す細胞がほとんどであった。一方、アストロサイトのマーカーの GFAP やオリゴデンドロサイトのマーカーのニューロフィラメントに陽性を示す細胞の数は増加しなかった。さらに in vivo に近い条件下で、検討するために E14.5 マウス前脳のスライスカルチャーを用いた実験を行なった。培養液中に BrdUrd を加え、分裂する未分化な細胞を認識できる用にした。スライスを通常の培養液中で培養すると、ほとんどの細胞は TuJ 陽性を示すようになった。一方、内因性の EphA2 の働きを競合的に阻害するために EphA2

の細胞外ドメインを加えると、内因性に起こっていた神経分化が抑制され TuJ1 陽性細胞の数が減少することがわかった。この事からも、Eph/ephrinA シリーズの活性化は神経前駆細胞を TuJ 陽性細胞に分化させる働きがある事が示唆された。

次に、EphA 活性化による神経発生の分子メカニズムを検討した。神経前駆細胞に ephrinA と MAPK カスケードの阻害剤を加えると神経細胞への分化が抑制された。また、ephrinA 作用時、Rap 1 の活性がみられたが、Ras の活性は抑制されていた。

〔 総 括 〕

これまでに、Eph ファミリーが神経系の発達や維持に関与するという多くの報告がなされてきた。本研究では、EphA ファミリーが、B ファミリーとは異なり、神経細胞分化に寄与する事や、今まで未知だったシグナル伝達についても明らかにすることができた。多くのサブタイプを持つ Eph ファミリーが、様々な神経機能に関与するということが示唆された。

論文審査の結果の要旨

Eph/Ephrin は、神経細胞の軸索誘導、移動の様々な発生過程に関与する。

私は、Eph/ephrinA が神経系の発生時に神経分化に影響を及ぼすという仮説を検証した。発生期に神経分化が盛んに起こるマウス胎児脳室壁周囲部位において、神経前駆細胞に EphA が発現していた。In vitro において、外因性・内因性 ephrinA によって、神経細胞分化の促進が示唆された。

次に、EphA 活性化による神経発生の分子メカニズムを検討した。神経前駆細胞に ephrinA と MAPK カスケードの阻害剤を加えると神経細胞への分化が抑制された。EphA 受容体は、MAPK カスケードの活性を促すことで、神経前駆細胞における神経分化に寄与していると考えられる。

本研究は、これまでに報告があった Eph/ephrinA の神経発生への関与が、より広範囲にわたる事を示した新たな知見であり、学位に値すると考える。