



Title	Formation mechanisms of mouse neural crest-derived stem cells
Author(s)	藤田, 恭平
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56060
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (藤 田 恭 平)

論文題名

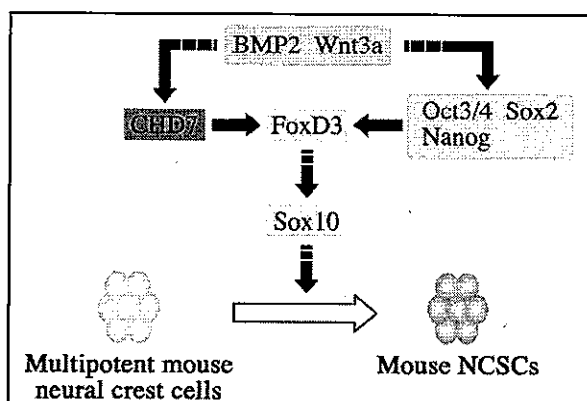
Formation mechanisms of mouse neural crest-derived stem cells
(マウス神経冠細胞由来幹細胞の形成機構)

論文内容の要旨

脊椎動物は進化の過程で、一過性の胚組織である神経冠を獲得した。胚発生の初期に神経管の背側に発生するその組織からは、神経冠細胞が形成され、体の様々な領域へと遊走する。神経冠細胞は多分化能を有することが知られており、遊走した神経冠細胞は末梢神経やグリア細胞、骨・軟骨細胞、色素細胞、脂肪細胞、平滑筋細胞などに分化することができる。近年、成体においても一部の神経冠細胞が多分化能を維持し、神経冠細胞由来幹細胞 (neural crest-derived stem cells, NCSCs) として、骨髓や神経節、皮膚などに存在することが報告された。しかし、NCSCsの形成機構に関する研究は、ほとんどなされていない。本研究は、神経冠細胞の多分化能を維持することによって、NCSCsが形成されるという仮説の基に、マウスNCSCsの形成機構の解明を試みた。

多分化能を有する神経冠細胞は、BMP/Wntシグナルとクロマチンリモデリング因子CHD7によって誘導されることが知られていることから、これらの因子の働きにまず着目した。CHD7の発現は、遊走初期の未分化状態の神経冠細胞、成体マウス後根神経節および座骨神経に存在するNCSCsにおいて認められた。また、マウス体幹神経冠細胞の培養において、BMP2/Wnt3aの添加によりCHD7の発現が促進され、マウス体幹神経冠細胞の多分化能が維持された。同様に、CHD7の過剰発現が多分化能の維持を促進し、一方でCHD7の発現抑制が多分化能の維持の顕著な抑制につながった。これらの結果は、BMP2/Wnt3aシグナルとCHD7の協調的な働きがマウス体幹神経冠細胞の多分化能を維持し、マウスNCSCsの形成に導くことを示す。

次に、マウスNCSCsの形成における遺伝子制御機構を解析した。神経冠細胞の発生において、BMPs/WntsシグナルはPax3/7、Msx1、Zic1 (neural crest inducer genes) などを活性化する。これらの遺伝子群の産物とCHD7がFoxD3やSox9、Sox10、Twist1などのneural crest specifier genesと呼ばれる遺伝子群をそれぞれ活性化することにより、多分化能を有した神経冠細胞が誘導される。また、ES細胞においては、CHD7は、Oct3/4、Sox2、Nanog (pluripotent stem cell-related genes) と標的遺伝子のエンハンサー領域で相互作用し、多分化能を維持している。マウス体幹神経冠細胞の培養において、FoxD3やSox9の発現をsiRNAによってノックダウンしたところ、BMP2/Wnt3aの存在下であってもSox10やCHD7の発現が有意に減少し、NCSCsの形成が抑制された。さらに、μChIP-qPCR法により、CHD7やneural crest inducer genesの産物およびpluripotent stem cell-related genesの産物が、neural crest specifier genesの遺伝子発現を直接的に制御しているかを解析した。その結果、FoxD3の上流に存在するcisエレメント (mE1, mE2, mE3) に対し、CHD7、Oct3/4、Sox2、NanogがBMP2/Wnt3a依存的に結合能の上昇を示した。また、FoxD3やSox10の発現は、siRNAによるCHD7、Oct3/4、Sox2、Nanogのノックダウンにより有意に減少した。これらの結果は、BMP2/Wnt3aシグナルによって活性化されたCHD7やOct3/4、Sox2、NanogがFoxD3の発現を直接的に促進し、それによるSox10の発現促進がNCSCsの形成に働いていることを示す (図)。また、本研究で得られた結果は、neural crest inducer genesが関与する神経冠細胞の誘導機構とは大きく異なる遺伝子制御機構によって、マウスNCSCsが形成されることを示唆する。



論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (藤田 恭平)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	小倉 明彦
	副 査	教授	西田 宏記
	副 査	教授	松野 健治
	副 査	講師	伊藤 一男

論文審査の結果の要旨

神経冠は脊椎動物の発生過程で現れる特有な組織で、その細胞は様々な細胞種に分化する能力（多分化能）をもつ。近年、神経冠細胞は、成体となった後も多分化能を保持した神経冠細胞由来幹細胞 (NCSCs) として、様々な組織に広く分布していることが報告された。しかし、神経冠組織から NCSCs がどのようにして形成されるかの機構は、ほとんど分かっていない。

藤田恭平君は、神経冠細胞の一部が、神経冠細胞が元々備えていた多分化能を維持することによって、NCSCs が形成されるという仮説を立て、その検証を行った。

同君はまず、始原外胚葉細胞から神経冠細胞を誘導することが知られている BMP/Wnt シグナルとクロマチンリモデリング因子 CHD7 の働きに着目した。マウス体幹神経冠細胞の培養系で、BMP2/Wnt3a シグナルによって CHD7 と転写因子 Sox10 の発現が促進され、CHD7 の活性化は神経冠細胞の多分化能維持を促進した。この結果は、BMP2/Wnt3a シグナルと CHD7 の協調的な働きがマウス体幹神経冠細胞の多分化能を維持し、NCSCs の形成を導くことを示している。

次に、NCSCs 形成で機能している BMP2/Wnt3a シグナル以降の遺伝子制御機構を解析した。転写因子 FoxD3 の発現を阻害すると、BMP2/Wnt3a の存在下でも Sox10 の発現は有意に減少した。また、ChIP-qPCR 法により、CHD7、Oct3/4、Sox2、Nanog が *FoxD3* の上流に存在する *cis* エレメントに BMP2/Wnt3a 依存的に結合することがわかった。さらに、FoxD3 の発現は CHD7、Oct3/4、Sox2、Nanog の阻害によって有意に減少した。

これらの結果から、BMP2/Wnt3a シグナルによって活性化された CHD7 や Oct3/4、Sox2、Nanog が、FoxD3 の発現を介して Sox10 の発現を促進し、NCSCs が形成されるという機構が示された。本研究論文は、NCSCs の形成機構について重要な知見を提供するものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。