

Title	マウス由来多能性幹細胞からセロトニン神経細胞への分化誘導およびその単離
Author(s)	嶋田, 健
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/57958">https://hdl.handle.net/11094/57958</a>
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、 <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

【12】

氏 名	嶋 田 健 <small>しま だ たけし</small>
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 7 5 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学 位 論 文 名	マウス由来多能性幹細胞からセロトニン神経細胞への分化誘導およびその単離
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 馬 場 明 道 (副査) 教 授 水 口 裕 之 教 授 八 木 清 仁 教 授 中 川 晋 作

## 論文内容の要旨

セロトニン神経系は脳幹の縫線核を起始核とし、大きく頭側部と尾側部の2つのグループに分けられる。そのうち、頭側部の細胞群は大脳皮質辺縁系、基底核、視床下部など脳の様々な領域へ、尾側部の細胞群は下位脳幹および脊髄に投射している。中枢神経系におけるセロトニン神経は、ラットの場合20,000個前後であり、神経の総数である $10^{10}$ 個と比べると極めて少ないことが報告されているが、上述のように非常に広範囲に投射しており、攻撃行動、摂食、記憶学習などを制御していること、数多くの精神疾患との関連を示す結果が報告されていることなどから、重要な生理的役割を担う神経系であると考えられている。

一方でセロトニン神経系は、マウスの場合胎生10から12日頃に産生される各種神経系の中で最も早期から出現する神経系で、細胞の分裂、神経系細胞の遊走、細胞の分化、シナプス形成などの発達期のイベントを調節することも示されている。近年、発達初期の前脳セロトニン1A受容体が、成熟後の不安様行動の発現に関与することが報告されるなど、発達期におけるセロトニンシグナルの変化が、成熟後の行動の異常を引き起こすことが示されている。このようにセロトニンが、成体における神経伝達物質としての働きに加えて、脳の発達に関わる因子としても重要であることも示唆されている。

以上のようにセロトニンは、脳機能に加えて脳の発達そのものに影響を与えることが示唆されるため、その源であるセロトニン神経の発生と機能に関する研究は極めて重要であると考えられる。そのため、これらについて様々な手法を用いて検討が進められ、その一端が解明されてきている。例えば、*ex vivo*での検討から、これまでにShh (sonic hedgehog)、FGF (Fibroblast growth factor) 4、FGF8といった因子によってセロトニン神経への分化が誘導されること、種々の因子をノックアウトした動物を用いた検討から、Nkx2.2 (NK2 transcription factor related, locus 2)、lmx1b (LIM homeobox transcription factor 1 beta)、Pet1 (PC12 ETS domain-containing transcription factor 1) などの転写因子がセロトニン神経への分化過程で重要であることが報告されている。しかしながら、個体での検討では限界があるため、詳細な細胞内メカニズムについては、依然不明な点が多く残されている。

そこで我々は、細胞内メカニズムの検討に適していると考えられる血清や異種細胞を用いない*in vitro*神経分化誘導系の構築を目指して研究を進め、ラミニンやIV型コラーゲンなど、発生期の脳に多く存在する細胞外マトリックスを主成分とするマトリゲルを培養担体として用いることで、胚性幹(ES)細胞から神経細胞が誘導されることを見出した(マトリゲル法)。さらに本誘導法を基盤として、種々の因子の特定神経への分化誘導活性を検討した結果、BMP (bone morphogenetic protein) アンタゴニストとして知られるNogginがセロトニン神経分化促進作用を有することをはじめて明らかにし、ES細胞からのセロトニン神経分化誘導系を構築することに成功した(マトリゲル-Noggin法)。セロトニン神経への分化過程などについて詳細な検討を行ったところ、Nogginを培養初期に作用させるとセロトニン神経への分化が促進されること、分化過程において、*in vivo*と同様なパターンでセロトニン神経分化に関わる転写因子が発現変動すること、加えて、Nogginの作用が複数のマウス多能性幹細胞株(EB5細胞、D3細胞、iPS細胞)で見られることを明らかにした。メカニズムについては、Nogginの作用がBMP4により抑制されるものの、Nogginと同じくBMPアンタゴニストとして知られるChordinでは再現されないなど、今後さらなる検討が必要と考えられるが、マトリゲル-noggin法におけるセロトニン神経分化誘導メカニズムを明らかにすることが出来れば、*in vivo*でのセロトニン神経分化機構の解明につながることを期待される。

また、これまでに報告されている*in vitro*セロトニン神経モデルは報告数が少ない上に、セロトニン合成酵素であるTph (Tryptophan hydroxylase) の発現量やセロトニン合成量が低いなど、*in vivo*セロトニン神経と異なることが報告されており、新たなモデルが望まれていた。そこで我々は、成熟セロトニン神経の*in vitro*モデルの構築を目指し、マトリゲル-Noggin法で誘導されたセロトニン神経の単離を試みた。具体的には、セロトニン神経特異的に発現する遺伝子であるPet1のエンハンサー (ePet) の下流に蛍光タンパク質EGFPをつないだコンストラクトをROSA26遺伝子座に導入したノックインES細胞を作製し、マトリゲル-Noggin法によりセロトニン神経を誘導し、EGFP陽性細胞をFACSにより単離することを試みた。その結果、FACSを用いたソーティングによりEGFP陽性細胞、セロトニン陽性細胞の割合は共に上昇し、セロトニン陽性細胞を濃縮することが可能であることが確認された。また、得られた細胞はラット海馬スライス上で少なくとも10日間は神経としての機能を維持していることが電気生理学的検討から明らかとなり、本法により得られた細胞が、*in vitro*成熟セロトニン神経モデルとして利用

できる可能性が示された。

今回我々が確立した誘導系およびソーティングによって純化されたセロトニン神経は、セロトニン神経への分化機構ならびに分化した神経の機能研究に有用であると考えられる。今後本研究成果が、セロトニン神経の発生・機能研究に貢献し、セロトニン神経を通じて生体における生理機能・脳発達機構の解明に役立つことを期待する。

## 論文審査の結果の要旨

博士学位申請者、嶋田 健の学位論文の概要と評価を示す。本論文のテーマは、マウス胚性幹細胞 (ES) からの新規の特異的セロトニン (5-HT) 神経細胞分化系を構築したことにあたる。ES細胞からのドパミン神経細胞分化系の確立が為されているのに対し、5-HT神経細胞系の分化については知見が少ない状況であった。本論文の最も特筆すべき研究成果は、マトリゲルを基材とし、BMPアンタゴニストであるNogginを加えることにより、5-HT神経細胞への分化が選択的に起こることを見出したことにある。この系による5-HT神経細胞への分化は、他のES細胞、iPS細胞でも確認している。さらに、5-HT神経の分化関連遺伝子解析から、マトリゲル-Noggin系による分化が、正常な5-HT神経分化の時間軸を持つことを明らかにした。さらに、Nogginが、神経幹細胞分化以前の比較的早い時期にその分化を決定することも実証した。

加えて、この方法により分化した5-HT神経細胞に蛍光たんぱく、光により活性化されるチャネルロドプシンを組み込んだ細胞を構築、単離することに成功した。このチャネルロドプシン導入5-HT神経細胞は、照射により活動電位を発生するとともに、マウス海馬切片での生着し活性を持つことを明らかにすることで、光活性型の5-HT神経細胞の構築を確認している。

これらの知見は、5-HT神経細胞の新たな分化系を構築したことにとどまらず、その決定因子としてのNogginの役割を時間軸においても明らかにしたものであり、胎生期での5-HT神経の発達と成熟後の精神疾患との関連研究にも重要な知見を与えるものである。また、新たに構築した光活性型5-HT神経細胞は、今後のこれらの研究において重要なツールとなるものである。

以上の成果は、薬学博士の授与に十分に値するものであると判断する。