

論文要約

学位論文題目 「マウス神経発生におけるビトロネクチンの役割

～ 神経幹細胞分裂と細胞周期脱出, 神経突起形成に着目して ～

氏 名 荻原 (菅原) 京加

脊椎動物は、1本の管状になった脊髄とその前方にある脳で構成される中枢神経系を有する。行動や感覚などを司る非常に複雑な構造の中枢神経系は、胎生期からその発生が開始される。哺乳類の胎生初期の神経発生では、神経上皮細胞である神経幹細胞が対称分裂によって自己複製を行い、一定数まで細胞数を増やしていく。その後、自己増殖を伴う非対称分裂によって、直接もしくはニューロンへの分化能を獲得した神経前駆細胞を介し、ニューロンが産生される。このとき、神経前駆細胞は特定の分裂回数の後、細胞周期から脱出して未成熟ニューロンになる。産生されたニューロンは適切な位置へと移動し、軸索や樹状突起などの神経突起を形成することで成熟ニューロンとなる。このような神経発生の過程において、細胞外マトリックスが重要な働きをすることが数多く報告されている。

細胞外マトリックスタンパク質の一つであるビトロネクチン (Vtn) は、神経発生中の神経管底板や脊索で一過的に発現することが報告されている。神経発生過程で発現する Vtn の機能は不明であったが、近年、Vtn が神経発生初期の神経管における運動ニューロンの分化を促進し、網膜神経の神経突起伸長促進に関わることが明らかになった。本研究室においても、Vtn が受容体の一つである $\alpha v \beta 5$ インテグリンを介して、小脳顆粒細胞の初期分化促進や軸索決定に関わることを報告した。しかし、神経発生という大きな事象での Vtn の主な機能は明らかになっておらず、どの受容体を介して個々の機能を調節しているのかについては不明な点が多い。このことから本研究では、神経発生の各過程における Vtn および受容体の機能解明を目的とした。そこで、神経幹細胞の対称/非対称分裂や神経前駆細胞の細胞周期脱出、神経突起形成に着目し、i) 中脳ドーパミン神経形成における Vtn の機能解析 (*in vivo*)、ii) マウス神経芽腫細胞株 Neuro2a のレチノイン酸 (RA) 誘導性神経分化における Vtn の機能解析 (*in vitro*) を行なった。

第 1 章序論では、本研究の目的に加え、神経発生とビトロネクチンの関連について最近の知見をまとめた。

第 2 章では、神経幹細胞の対称/非対称分裂における Vtn の役割を調べるために、胎生 12.5 日目のマウス胚を用いて、中脳ドーパミン神経形成における Vtn の機能解析を行った。中脳腹側領域の脳室帯には神経幹細胞が密に並び、産生された神経前駆細胞は、神経幹細胞である放射状グリアの突起に沿ってドーパミン神経へと分化しながら辺縁部に移動する。免疫蛍光染色の結果、Vtn は放射状グリア上に発現することが明らかになった。次に、Vtn ノックアウト (Vtn^{-/-}) および野生型マウスの組織切片を用いて神経幹細胞数や神経前駆細胞数、ドーパミン神経への分化効率の比較解析を行なった。Vtn^{-/-}マウスにおいて中脳腹側領域の神経幹細胞数および分裂直後の神経前駆細胞数の増加

が観察されたが、胎生 12.5 日目ではドーパミン神経数および分化効率に影響は見られなかった。これらの結果から、Vtn はマウス中脳腹側領域における神経幹細胞の非対称分裂を抑制し、対称分裂を促進することが示唆された。

第 3 章では、神経前駆細胞の細胞周期脱出および神経突起形態における Vtn の役割を調べるために、*in vitro* の系として Neuro2a 細胞の RA 誘導性神経分化モデルを用いた。Neuro2a 細胞は RA により細胞増殖が抑制され、細胞周期脱出および多極性から双極性への突起形態変化が誘導される。RA 添加後に一過性に Vtn 発現が上昇したことから、Vtn 抗体を用いた阻害実験を行なった。その結果、細胞周期脱出効率および突起形態移行が顕著に抑制された。また、免疫蛍光染色により Vtn が Neuro2a 細胞の突起先端に特異的に発現することを見出した。双極性形態を示す大半の細胞では両方の突起に Vtn が発現していたが、多極性形態を示す細胞では Vtn 陽性突起だけでなく複数の Vtn 陰性突起も観察された。そこで、Neuro2a 細胞の突起形態移行における細胞極性因子の関与を調べるために、Par6 変異体を導入した。これにより、突起形態移行が乱れるだけでなく、突起先端への Vtn 局在化も乱れることが明らかになった。さらに、受容体候補である $\beta 3$ および $\beta 5$ インテグリンのノックダウンにより、細胞周期脱出効率が有意に減少した。対照的に、 $\beta 5$ インテグリンノックダウンにより突起形態移行が顕著に抑制されたが、 $\beta 3$ インテグリンノックダウンでは影響が見られなかった。これらの結果より、Vtn は $\alpha v\beta 3$ および $\alpha v\beta 5$ インテグリンを介して細胞周期脱出を促進し、 $\alpha v\beta 5$ インテグリンおよび細胞極性因子 Par6 とともに多極性から双極性への突起形態移行に深く関与することが明らかになった。

第 4 章では、神経前駆細胞の突起伸長における Vtn の役割を調べるために、Neuro2a 細胞の RA 誘導性神経突起伸長モデルを用いた。前章と同様に Vtn 抗体による阻害実験を行った結果、Vtn は Neuro2a 細胞の RA 誘導性神経突起伸長も促進していることが明らかになった。また、 $\beta 5$ インテグリンではなく、 $\beta 3$ インテグリンノックダウンによって神経突起伸長が抑制された。これらの結果から、Vtn は $\alpha v\beta 3$ インテグリンを介して神経突起伸長を促進することが示唆された。

以上の結果から、Vtn は非対称分裂抑制および対称分裂促進に関与し、神経幹細胞の自己増殖を促進することが明らかになった。これに対し、非対称分裂によって生じる神経前駆細胞においては、細胞周期脱出促進に加え、それに伴う神経突起の形態移行や伸長促進に深く関与することが示された。また、これらの機能には $\alpha v\beta 3$ や $\alpha v\beta 5$ インテグリンが関与しており、こうした受容体の違いによって Vtn が複数の機能をもち得ることが示唆された。