

氏名	のなか ひでき 野中 秀樹
学位(専攻分野)	博 士 (学術)
学位記番号	博乙第 200 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	ミクログリアの MAP2 陽性および GFAP 陽性細胞への分化転換 機構に関する研究
審査委員	(主査)教授 山口政光 教授 中島敏博 教授 亀井加恵子

論文内容の要旨

申請論文は序論、本論第 1 章「ミクログリアの MAP2 陽性および GFAP 陽性細胞への分化転換に関する研究」第 2 章「ミクログリアの MAP2 陽性および GFAP 陽性細胞への分化転換における SOX2 の役割に関する研究」第 3 章「ミクログリアの MAP2 陽性および GFAP 陽性細胞への分化転換における bFGF の作用に関する研究」と総括および結論から構成されている。

序論では、本論文の背景と目的が述べられている。ミクログリアは遊走能・貪食能および炎症性サイトカインの放出等により脳内の免疫反応を担っているとともに神経栄養因子を分泌して神経系の維持および修復にも関与している中枢神経系のグリア細胞である。近年、ミクログリアが高濃度血清中でニューロンやアストロサイトへと分化転換する可能性を示唆する報告が出されている。しかしながら、ミクログリアの神経系細胞への分化転換を支持する報告は依然として少なく、またその分子メカニズムに関してはほとんど明らかにされていない。これらの学術的背景のもとに、申請者は単離・精製したミクログリアがニューロンやアストロサイトへと分化転換することを確認し、その分子メカニズムおよび分化転換の促進方法についての検討を開始したと述べられている。

第 1 章では、ミクログリアが確かに MAP2 陽性および GFAP 陽性細胞へ分化転換することが記載されている。大脳皮質から単離・精製したミクログリアは、ミクログリアのマーカーである CD11b および IBA-1 抗体を用いて免疫染色したところ約 99% と高純度であった。既報に従いこれらを高濃度血清中でさらに 2 日間培養することで、精製したミクログリアがニューロンのマーカーである MAP2 やアストロサイトのマーカーである GFAP 陽性細胞に分化転換すること、さらに、insulin-like growth factor-1 (IGF-1) を添加した E2 medium 中で培養することにより分化転換がさらに誘導されることを確認したことが述べられている。

第 2 章ではミクログリアの MAP2 陽性および GFAP 陽性細胞への分化転換を制御する因子として、神経幹細胞の性質を特徴づける重要な因子であるとともに神経系の成熟にも寄与する転写因子である SOX2 に着目している。ウェスタンブロッティングにより、単離・精製したミクログリアを高濃度血清中で培養すると SOX2 の発現量が増加すること、また免疫細胞染色により SOX2 タンパク質は分化転換後の MAP2 陽性および GFAP 陽性細胞の核内に発現していることを明らかにした。さらに、siRNA を用いて SOX2 をノックダウンすることでミクログリアの MAP2 陽性お

より GFAP 陽性細胞への分化転換が抑制されることを明らかにしている。続いて、過去の研究により高濃度血清中の BMP がミクログリアの分化転換に寄与していることが知られているため、その下流にある Smad シグナル伝達経路が応答しているかどうかを調査した。高濃度血清処置により、Smad1/5/8 のリン酸化および Smad4 が一過性に上昇することが確認された。さらに、Smad4 siRNA 処理により SOX2 の発現上昇が抑制され、ミクログリアの MAP2 陽性および GFAP 陽性細胞への分化転換も抑制された。以上より、高濃度血清処置による Smad シグナル伝達経路を介した SOX2 の発現上昇が、ミクログリアの MAP2 陽性および GFAP 陽性細胞への分化転換において重要な役割を担っていると結論している。

第3章では、ミクログリアの MAP2 陽性および GFAP 陽性細胞への分化転換を促進する手段として、神経幹細胞の分化および増殖を制御する成長因子である bFGF に着目したことが述べられている。ミクログリアを高濃度血清中で培養すると bFGF の受容体である *Fgfr1*、*Fgfr2* および *Fgfr3* mRNA が上昇することが定量 PCR で確認され、続く bFGF の処置はミクログリアの MAP2 陽性および GFAP 陽性細胞への分化転換を促進させた。また、当作用が FGFR tyrosine kinase 阻害剤である SU5402 でブロックされることや、高濃度血清処理をする前の細胞に bFGF を処置しても分化転換が起こらないことから、当作用は FGFR を介した作用であることが確認された。またこの bFGF の作用は MEK 阻害剤である PD98059 により部分的に抑制されたことから、一部 ERK- MAP kinase の経路を介していることがわかった。以上より、ミクログリアは高濃度血清中で FGFR1-3 の発現を上昇し、続く bFGF による FGFR の刺激が一部 ERK-MAP kinase 経路を介して、ミクログリアの MAP2 陽性および GFAP 陽性細胞への分化転換を促進すると結論している。

最後に「総括および結論」として、本研究によりミクログリアが高濃度血清中で MAP2 陽性および GFAP 陽性細胞へと分化転換する分子メカニズムとして Smad シグナル伝達経路を介した SOX2 の発現上昇が重要であること、さらに bFGF の処置が分化転換を促進することを明らかにしたとまとめている。本研究の成果は、脱落したニューロンを補充する手段として、ミクログリアが標的となり得ることを示すものであり、新たな再生医療のコンセプトの基礎的知見を提供するものであると述べられている。

論文審査の結果の要旨

本研究は中枢神経系のグリア細胞であるミクログリアが高濃度血清中で神経系の細胞へと分化転換することを確認し、その分子メカニズムおよび分化転換の促進方法を見出した新規性に富んだものである。ミクログリアは、神経幹細胞から分化するニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトとは異なる起源を有していると考えられているが、特定の条件下において種々の神経系の細胞のマーカーを発現することも報告されている。このような背景の中で、ミクログリア自身が高濃度血清中で脱分化様の変化をきたし、続く分化誘導によってニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイト等の神経系細胞へと分化転換することを示唆する報告が出された。ミクログリアは損傷部位へと集積する性質を有しているため、集積したミクログリアを神経系細胞へと分化転換させることができれば、失われたニューロンを効率的に再生させる一つのアプローチ方法となり得る。そこで申請者は、ミクログリアがニューロンやアストロサイトへと分化転換することをまず確認し、その分子メカニズムの解析および分化転換の促進を目的として以下の検討を行った。最初に申請者は、高純度で精製されたミクログリアがニューロンの

マーカーである MAP2 陽性細胞およびアストロサイトのマーカーである GFAP 陽性細胞へと分化転換することを確認した。さらに、分化転換後の MAP2 陽性細胞が KCl 誘発の細胞内カルシウム流入や 4-aminopyridine 誘発の発火活動等のニューロンとしての機能を一部有していることを明らかにした。次に申請者は、分化転換の分子メカニズムの解析として、神経系細胞への分化に沿って機能する重要な転写因子である SOX2 の役割に関して検討を行った。ミクログリアは高濃度血清中でこの SOX2 タンパク質の発現を上昇し、SOX2 のノックダウンは神経系細胞への分化転換を抑制した。また Smad4 タンパク質のノックダウンが SOX2 タンパク質の発現上昇および分化転換を抑制することも明らかにし、これらの結果から、ミクログリアは高濃度血清中で Smad シグナル伝達経路を介して SOX2 タンパク質の発現を上昇し、MAP2 陽性および GFAP 陽性細胞へと分化転換するという一連の分子メカニズムを明らかにした。最後に申請者は、高濃度血清中の細胞は SOX2 タンパク質を発現することで一部神経幹細胞様の性質を有しているという仮説のもと、分化転換を促進する方法として basic FGF (bFGF) の作用に関して検討を行った。ミクログリアは高濃度血清中で FGFR1-3 の発現を上昇し、続く bFGF による FGFR の刺激が一部 ERK-MAP kinase 伝達経路を介して MAP2 陽性および GFAP 陽性細胞への分化転換を著しく促進することを明らかにした。

これらの一連の研究は、脱落したニューロンを補充する手段として、神経幹細胞様の性質を獲得し得るミクログリアが標的となる可能性を示すものであり、新たな中枢神経系の再生医療のコンセプトに関する基礎的知見を提供するものとして高く評価できる。また、今後の再生医療の進展にも強く貢献する知見であると判断できる。

これらの研究の成果は、申請者が筆頭著者 2 編（1 編はダブル筆頭著者）を含む、査読性のある下記の国際科学雑誌 4 編に掲載されている。

(1) Hideki Nonaka, Tetsuhiro Niidome, Yoriko Shinozuka, Akinori Akaike, Takeshi Kihara, Hachiro Sugimoto, A role for SOX2 in the generation of microtubule-associated protein 2-positive cells from microglia, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380, 60-64 (2009).

(2) Tetsuhiro Niidome*, Hideki Nonaka*, Akinori Akaike, Takeshi Kihara, Hachiro Sugimoto, Basic fibroblast growth factor promotes the generation of microtubule-associated protein 2-positive cells from microglia, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390, 1018-1022 (2009).

*equal contribution

(3) Satoru Matsuda, Tetsuhiro Niidome, Hideki Nonaka, Yasuaki Goto, Kazuhiko Fujimura, Masaru Kato, Masaya Nakanishi, Akinori Akaike, Takeshi Kihara, Hachiro Sugimoto, Microtubule-associated protein 2-positive cells derived from microglia possess properties of functional neurons, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368, 971-976 (2008).

(4) Tetsuhiro Niidome, Satoru Matsuda, Hideki Nonaka, Akinori Akaike, Takeshi Kihara, Hachiro Sugimoto, A molecular pathway involved in the generation of microtubule-associated protein 2-positive cells from microglia, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 370, 184-188 (2008).