

平成 20年 9月

甲斐義輝 学位論文審査要旨

主 査 佐 藤 建 三
副主査 畠 義 郎
同 押 村 光 雄

主論文

Enhanced apoptosis during early neuronal differentiation in mouse ES cells with autosomal imbalance

(マウスES細胞の神経分化過程において常染色体異数性が引き起こすアポトーシスの解析)

(著者：甲斐義輝、Chi Chiu Wang、岸上哲士、香月康宏、阿部智志、滝口正人、白吉安昭、井上敏昭、井藤久雄、若山照彦、押村光雄)

平成20年 Cell Research 掲載予定

学位論文要旨

Enhanced apoptosis during early neuronal differentiation in mouse ES cells with autosomal imbalance

(マウスES細胞の神経分化過程において常染色体異数性が引き起こすアポトーシスの解析)

常染色体異常症候群（ダウン症をはじめとするトリソミー症候群、部分的トリソミー/モノソミー症候群）には表現型異常として精神発達遅滞が共通して認められる。このことは、特定の遺伝子量の変化のみでは説明が出来ず、むしろゲノム全体の不均衡に基づく共通のメカニズムが存在する事を示唆している。また常染色体異常症候群の中で、最も発生頻度が高いダウン症候群においては、神経発生初期におけるアポトーシスの亢進、ならびに神経細胞数の減少が報告されている。つまり、そのメカニズムが神経発生初期での異常に深く関わっている事が考えられる。常染色体異常症候群に共通する精神発達遅滞の理解には、その詳細な分子メカニズムの解明が必須である。本論文では *in vitro* におけるモデル系を開発し、その機能解析を行った。

方法

常染色体異常をもつマウスES細胞を作製するため、まず微小核細胞融合法を用いて、ヒト11番染色体を1本保持するE14マウスES細胞株、およびヒト6番染色体長腕、ヒト11番染色体、ヒト21番染色体を1本保持するTT2FマウスES細胞株をそれぞれ作製した。さらに正常マウスES細胞株をサブクローンすることで、マウス1番染色体、マウス8番染色体とマウス17番染色体、マウス1番染色体と8番染色体をそれぞれ3本保持するTT2FマウスES細胞株、マウス8番染色体、マウス8番染色体とマウス17番染色体をそれぞれ3本保持するマウスTT2細胞株、そしてマウスY染色体が脱落したマウスTT2細胞株を作製した。

これらの染色体異常をもつマウスES細胞株、および正常コントロールである親マウスES細胞株を用いて、SDIA法により *in vitro* において神経分化誘導を行い、神経幹細胞の時期にあたる分化誘導後3日目において、TUNEL法およびFlow Cytometerによるアポトーシスの解析を行った。また、これらのES細胞をヌードマウスの皮下に移植することで、テラトーマを形成させ、*in vitro* で神経発生初期に認められたアポトーシスの亢進は、神経分化誘導時に特異的なものであるかどうかを検証した。

さらに、マウスES細胞の神経分化過程において、染色体異常が遺伝子発現に及ぼす影響を解析するため、正常マウスTT2F細胞とマウス1番染色体、マウス8番染色体とマウス17番染色体、マウス1番染色体と8番染色体をそれぞれ3本保持するTT2FマウスES細胞株を用いて、cDNAマイクロアレイ解析を行った。その結果をReal-time RT PCRにより確認し、それらの遺伝子群について、その機能を、RNAiを用いた手法により検証した。

結 果

ヒト染色体を保持するマウスES細胞株、マウス染色体異数性マウスES細胞株ともに正常マウスES細胞株と同様に、*in vitro*における神経細胞系譜への分化を確認し、神経分化誘導後3日目において、常染色体異数性のマウスES細胞において有意にアポトーシスの亢進が認められた。また、これらのアポトーシスは神経分化誘導時に特異的なものであることも確認された。

網羅的な遺伝子発現解析を行った結果、常染色体異数性クローンでは、神経分化誘導初期において、共通して発現が低下する8つの既知である遺伝子群を同定した。これらの遺伝子群を正常マウスES細胞において、個々にRNAiにより発現を低下させた結果、常染色体異数性のマウスES細胞株と同様に、*in vitro*において神経分化誘導後3日目にアポトーシスの亢進を観察した。

以上のことから、本研究において同定された遺伝子群は、常染色体異常により発現低下を引き起こし、それら遺伝子の発現低下が神経発生初期において、アポトーシスの亢進を誘導する事が示された。

考 察

本研究の内容は、常染色体異常によるゲノム不均衡そのものが、神経発生初期におけるアポトーシスの亢進を引き起こす事を示唆するものである。また、それに関わる分子メカニズムとして、常染色体異常により共通に発現が低下する遺伝子群を同定したが、これらの遺伝子群が、神経発生に伴うアポトーシスに関与するという報告はなく、未知の分子メカニズムである事が考えられる。

また、同定された遺伝子群は、それぞれ異なる染色体上に存在している事から、常染色体異常によるゲノム不均衡が、増減の無い染色体上の遺伝子発現の変化を引き起こしている事を示唆している。実際に、ダウン症候群においても他の染色体上の遺伝子の発現までもが変動するという報告があるが、それに合致する結果である。