



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1675号
学位記番号	第1192号
氏名	藤掛 数馬
授与年月日	平成 31年 3月 25日
学位論文の題名	Detachment of chain-forming neuroblasts by Fyn-mediated control of cell-cell adhesion in the postnatal brain (出生後の脳における Fyn を介した細胞間接着制御による新生ニューロンの鎖状塊からの離脱) The Journal of Neuroscience. Vol. 38 : P.4598-4609, 2018
論文審査担当者	主査： 飛田 秀樹 副査： 浅井 清文, 祖父江 和哉

論文内容の要旨

【目的】

哺乳類の脳において、側脳室外側壁に沿って存在する脳室下帯には生後も神経幹細胞が存在し、新しいニューロン（ニューロblast）が産生されている。産生されたニューロblastは、密に接着して鎖状に連なった細胞塊（鎖状塊）を形成し、吻側移動経路（RMS）を通過して嗅球へと移動する。嗅球に到達したニューロblastは鎖状塊から離脱し、単独で嗅球内を移動して成熟することで、様々な嗅覚機能の調節に関与する。これまでに、ニューロblastの鎖状塊からの離脱を促進するいくつかのタンパク質が同定されている。しかし、ニューロblastが鎖状塊から離脱する際に、細胞間接着がどのように調節されているかは不明である。そこで本研究では、ニューロblastの鎖状塊からの離脱に関与する新規分子を探索し、その制御メカニズムを解明することを目的とした。

【方法】

ニューロblastの鎖状塊からの離脱に関与する新規分子を探索するため、標的既知の阻害薬を用いたスクリーニングを実施した。ニューロblastにおける Fyn の発現パターンや活性化の解析には、免疫組織化学染色法およびウエスタンブロット法を用いた。Fyn の機能阻害および機能獲得実験を行うため、電気穿孔法を用いて Fyn ノックダウン配列もしくは cDNA 配列をコードしたプラスミドを脳室下帯に遺伝子導入した。ニューロblastの鎖状塊からの離脱における Dab1 の機能を調べるため、*Dab1* 遺伝子変異マウス (*yotari* マウス) を用いて、細胞移植実験および電子顕微鏡を用いた細胞間接着の微細形態解析を行った。

【結果】

阻害薬スクリーニングの結果、Src family チロシンキナーゼ阻害薬 PP2 が鎖状塊からの離脱を抑制することを見いだした。ニューロblastにおける Src family チロシンキナーゼの発現および活性化を解析した結果、Fyn がニューロblastに発現し、鎖状塊から離脱する際にリン酸化されて活性化することを明らかにした。

ニューロblastの鎖状塊からの離脱における Fyn の機能を調べるため、*in vivo* で Fyn の機能阻害および機能獲得実験を行った結果、Fyn がニューロblastの鎖状塊からの離脱を促進することが分かった。次に、ニューロblastの鎖状塊からの離脱における Dab1 の機能を調べるため、*yotari* マウスを用いて細胞移植実験を行った結果、Dab1 も鎖状塊からの離脱を促進することが分かった。さらに Fyn と Reelin-Dab1 シグナルの関係を調べるために、Fyn を過剰発現させた野生型および Dab1 変異ニューロblastを用いて細胞移植実験を行った結果、野生型ニューロblastで観察された Fyn による鎖状塊からの離脱促進は、Dab1 変異ニューロblastでは観察されなかった。以上の結果から、Reelin-Dab1 シグナルと Fyn が協調してニューロblastの鎖状塊からの離脱を調節することが示唆された。

ニューロblastは接着結合様構造を形成してお互いに接着する。上皮細胞の接着結合にはカドヘリンや p120 カテニンが局在して接着に寄与することから、ニューロblast間の接着における p120 カテニンの局在を調べた。その結果、ニューロblastの細胞間接着部に p120 カテニンの集積が観察され、Fyn のノックダウンにより増強した。また、RMS におけるニューロblast間

の接着結合様構造を電子顕微鏡で解析した結果、野生型マウスではニューロblastが鎖状塊から離脱する際に接着結合様構造が消失するが、*yotari* マウスではこの構造が維持されてしまい、脱接着できない可能性が示唆された。以上より、Reelin-Dab1 シグナルと Fyn が接着結合様構造を調節して鎖状塊からの離脱を制御していることが示唆された。

最後に、Fyn 阻害による鎖状塊からの離脱抑制機構を明らかにするため、Fyn と N-カドヘリンのダブルノックダウン実験を行った。その結果、N-カドヘリンのノックダウンにより Fyn 阻害による鎖状塊からの離脱抑制が回復した。以上より、N-カドヘリンが Fyn 阻害による鎖状塊からの離脱抑制に関与することが示唆された。

【考察および結論】

本研究の結果から、Fyn がニューロblastの細胞間接着を適切に調節することで、その嗅球への移動を促進することが示唆された。このメカニズムは、正常脳においてニューロblastが細胞レベルで嗅球神経回路を再編成する過程に寄与する。

(注) 和文で2, 000字以内でまとめる

論文審査の結果の要旨

【目的】 脳室下帯には神経幹細胞が存在し、ニューロblastが産生され、鎖状に連なった細胞塊（鎖状塊）を形成し、吻側移動経路（RMS）を通過して嗅球へと移動、単独で嗅球内を移動して成熟し、様々な嗅覚機能の調節に関与する。しかし、ニューロblastが鎖状塊から離脱する際に、細胞間接着がどのように調節されているかは不明である。本研究は、ニューロblastの鎖状塊からの離脱に関与する新規分子を探索、その制御メカニズムの解明を目的とした。

【方法】 鎖状塊からの離脱に関与する新規分子を探索するため、標的既知の阻害薬を用いたスクリーニングを実施した。Fyn の発現パターンや活性化の解析には、免疫組織化学染色法およびウエスタンブロット法を用いた。Fyn の機能阻害および機能獲得実験を行うため、電気穿孔法を用いて Fyn ノックダウン配列もしくは cDNA 配列をコードしたプラスミドを脳室下帯に遺伝子導入した。ニューロblastの鎖状塊からの離脱における Dab1 の機能を調べるため、Dab1 遺伝子変異マウス（*yotari* マウス）を用いて、細胞移植実験および電子顕微鏡を用いた細胞間接着の微細形態解析を行った。

【結果】 阻害薬スクリーニングの結果、Src family チロシンキナーゼ阻害薬 PP2 が鎖状塊からの離脱を抑制することを見いだした。Src family チロシンキナーゼの発現および活性化を解析した結果、Fyn がニューロblastに発現し、離脱時にリン酸化され活性化していた。

鎖状塊からの離脱における Fyn 機能を調べるため、*in vivo* で Fyn の機能阻害および機能獲得実験を行った結果、Fyn が鎖状塊からの離脱を促進することが分かった。次に、離脱における Dab1 の機能を調べるため、*yotari* マウスを用い細胞移植実験を行い、Dab1 も鎖状塊からの離脱を促進することが分かった。さらに Fyn と Reelin-Dab1 シグナルの関係を調べるために、Fyn を過剰発現させた野生型および Dab1 変異ニューロblastを用い細胞移植実験を行った結果、Fyn による鎖状塊からの離脱促進は、Dab1 変異ニューロblastでは観察されなかった。Reelin-Dab1 シグナルと Fyn が協調して鎖状塊からの離脱を調節することが示唆された。

ニューロblastは接着結合様構造を形成し接着する。カドヘリンや p120 カテニンが接着に寄与することから、接着における p120 カテニンの局在を調べた。その結果、細胞間接着部に p120 カテニンの集積が観察され、Fyn のノックダウンにより増強した。また、ニューロblast間の接着結合様構造を電子顕微鏡で解析した結果、*yotari* マウスではこの構造が維持され、脱接着できない可能性が示唆された。Reelin-Dab1 シグナルと Fyn が接着結合様構造を調節し離脱を制御していることが示唆された。最後に、Fyn 阻害による鎖状塊からの離脱抑制機構を明らかにするため、Fyn と N-カドヘリンのダブルノックダウン実験を行った。N-カドヘリンのノックダウンにより Fyn 阻害による鎖状塊からの離脱抑制が回復した。N-カドヘリンが Fyn 阻害による鎖状塊からの離脱抑制に関与することが示唆された。

【審査内容】 約 20 分間のプレゼンテーションの後、主査の飛田教授から、接着結合様構造が検出される電顕原理について、増殖との関係性についてなど 10 項目の質問がなされた。また第一副査の浅井教授からは、*yotari* マウスの形質について、pCAG-GS ベクターを用いた利点や特長は何か、など 8 項目が質問された。第二副査の祖父江教授からは、臨床応用についてどう考えるかなど専門領域に関わる 4 項目が質問された。申請者からは、これら質問について概ね満足する内容の回答が得られた。

審査委員会は、本論文筆頭著者は学位論文の内容を十分理解し、博士に相応しい学力を有していると判断し、博士（医学）の学位を授与するのに相応しいと判定した。

論文審査担当者 主査 飛田 秀樹 副査 浅井 清文、 祖父江 和哉