

氏 名 清 水 健 史

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第702号

学位授与の日付 平成15年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Wnt Signaling Controls the Timing of Oligodendrocyte
Differentiation in the Spinal Cord

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 重本 隆一
教授 池中 一裕
教授 高田 慎治
教授 岡村 康司（岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター）

論文内容の要旨

Oligodendrocytes are the myelin-forming cells in the central nervous system. Although it is commonly accepted that oligodendrocytes are derived from the ventral neuroepithelial cells in response to Sonic Hedgehog signals, Wada et al. previously reported that multiple steps of oligodendrocyte development were inhibited by some factors secreted from the dorsal spinal cord. Thus the finely tuned balance of regulatory signals from both ventral and dorsal regions could strictly control oligodendrocyte development in the spinal cord. Wada et al. had examined the activity of BMP4, a typical BMP derived from the dorsal neural tube, on oligodendrocyte development in the spinal cord. However, BMP4 did not affect the number of O4⁺ oligodendrocytes in our culture system of the flat whole-mount preparation. As a first step to identify this inhibitory factor, he examined the developmental change of dorsal inhibitory activity and compared that with the expression profile of candidate genes. Developmental profile of *Wnt-1* and *-3a* gene expression showed significant correlation with the developmental changes in the dorsal inhibitory activity. Thus, he focused on *Wnt-1* and *-3a* as the candidates for the dorsal inhibitory factor. Treatment of explant culture or dissociation culture of embryonic ventral spinal cord with *Wnt-3a* resulted in the inhibition of a maturational step from oligodendrocyte progenitors into O4⁺ immature oligodendrocytes. Misexpression of LEF-1/ β -catenin complex, a downstream effector of canonical Wnt/ β -catenin pathway, inhibited the maturation of CG4 oligodendrocyte progenitor cell line into oligodendrocyte-like cells, suggesting that Wnt directly inhibited oligodendrocyte maturation through LEF-1/ β -catenin signaling. To test whether *Wnt-1* and *-3a* play important roles in oligodendrocyte development in vivo, he analyzed oligodendrocyte development in the *Wnt-1* or *-3a* single knockout mice. He did not detect any differences in O4⁺ cells between *Wnt-3a* (-/-) or *Wnt-1* (-/-) mice and their wild-type littermate mice. Since *Wnt-1* and *-3a* were proposed to share a common receptor and showed a similar expression profile, *Wnt-1* and *-3a* could compensate each other for the function. Addition of recombinant mouse frizzled-8/Fc chimera, a secreted Wnt antagonist, increased the O4⁺ cell number and expanded the O4⁺ cell distribution in the flat whole-mount preparation. These results indicate that endogenous Wnt proteins including dorsal *Wnt-1* and *-3a* control the oligodendrocyte differentiation and distribution. This study suggests that Wnts control a timing of oligodendrocyte maturation and may regulate the dorsal distribution of oligodendrocytes.

論文の審査結果の要旨

オリゴデンドロサイト（稀突起膠細胞）は中枢神経系におけるミエリン鞘形成細胞である。オリゴデンドロサイトは胎生期において、sonic hedgehog シグナルによって腹側の神経上皮細胞から発生してくることが知られていた。最近、脊髄の組織培養（flat whole-mount preparation, FWMP）を用いた和田らの研究によって、背側からオリゴデンドロサイトの発生分化を抑制する何らかの因子が放出されていることが明らかにされた。本研究ではこの因子を同定することを目的として以下の実験を行った。まず、マウスの FWMP を用いて胎生 11 日から 14 日の脊髄背側の抑制因子の活性を比較したところ、胎生 11 日で最も活性が高く、12 日では減弱し、13-14 日ではほとんど抑制活性が検出されなかった。そこで脊髄背側に限局して発現する遺伝子について、胎生 11 日から 14 日の発現変化を調べたところ、Wnt-1 および Wnt-3a 遺伝子がこの抑制因子の活性とよく似た発現パターンを示すことが明らかとなった。次に Wnt-3a を放出する L cell の培養上清を FWMP や腹側脊髄の初代培養細胞に適用したところ、オリゴデンドロサイト前駆細胞から次のステップである O4 陽性細胞への成熟過程を抑制することが分かった。またこの抑制作用は Wnt を中和する ECD8 や Wnt シグナルの受容を阻害する Dkk-1 によって阻害された。さらにオリゴデンドロサイト前駆細胞の性質を持つ CG4 細胞株に Wnt シグナル下流の β -catenin pathway を活性化する Lef-1/ β -catenin を遺伝子導入により発現させたところ、O4 陽性オリゴデンドロサイトへの成熟が抑制された。これらの結果から Wnt がオリゴデンドロサイト前駆細胞に直接作用して β -catenin pathway を介して成熟を抑制していることが示唆された。さらに、Wnt に対する阻害作用を持つ frizzled-8/Fc キメラを FWMP に適用したところ、O4 陽性オリゴデンドロサイトの増加および分布範囲の拡大が認められた。

以上の結果は、マウス胎生期の脊髄において、オリゴデンドロサイトの発生分化を抑制する因子の実体を初めて同定し、分化制御のメカニズムを明確に解明したものであり、大変意義深いと考えられる。またこれらの実験は、高度な技術と的確な観察および論理的な考察に基づいて行われていると認められる。従って委員会は全員一致で本論文が博士の学位論文として相応しいものであると判定した。

学位論文の内容の発表および審査委員 4 名との間での質疑応答を行った。発表はよくまとまっており、大変分かりやすいものであった。また、申請者は委員の質問に対して、自ら行った実験の意味や関連分野における所見などを的確に応答し、結果についても非常に厳密な解釈を示した。また、この学位論文が簡潔でわかりやすい英語で書かれていることから、語学力も充分であると考えられた。従って、審査委員全員により申請者は学位授与に相応しい学力があると判定した。