

氏 名	ながとまさこ 長 門 雅 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2893 号
学位授与の日付	平 成 17 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Prospective characterization of neural stem cells by flow cytometry analysis using combination of the surface markers (細胞表面マーカーを用いたフローサイトメトリーによる神経幹細胞の前方視的分離に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 辻 憲 夫    教 授 橋 本 信 夫    教 授 篠 原 隆 司

### 論 文 内 容 の 要 旨

神経幹細胞は、自己複製能と、かつ多分化能を有することを特徴とし、障害を受けた神経組織の修復・再生への応用が期待されている。神経幹細胞とは、自己複製しつつ非対称性に分裂し、in vitroでの一定培養条件下では不均一な細胞集団である‘Neurosphere’を形成する性質が知られている。私達の研究においても、in vitroでのNeurosphereの存在をNeurosphere initiating cell (以下NS-IC)、つまり神経幹細胞の存在として扱った。このNS-ICは、従来Neurosphere法という培養による後方視的な同定がなされてきたが、前方視的により効率よく濃縮・分離する方法についてフローサイトメトリー(以下FACS)を用いて検討した。

まず、血液系もしくは体性幹細胞表面に比較的特異的に表出されている抗原について、それらの抗体を用いて、Neurosphere構成細胞表面にも表出されているかどうかをスクリーニングした。その結果、有意な発現を示すと考えられる抗原として、syndecan-1, Notch-1, integrin- $\beta$ 1, Thy1.2があげられた。これら抗原の陽性細胞群、陰性細胞群及びコントロール(全生細胞)群別に、FACSを用いて分離・培養し、Neurosphereの形成率、つまりNS-ICの存在率を比較した。各抗原陽性細胞群は、陰性細胞群よりも効率的にNeurosphereを形成した。四つの抗原の中で、syndecan-1はもっとも成績が良かった。また、これらの抗原を組み合わせると二重陽性細胞群と単陽性細胞群で同様にNeurosphere形成率を比較したところ、syndecan-1とNotch-1の組み合わせでは、単陽性(Notch-1陽性)細胞よりも二重陽性細胞群の効率が良かった。

また、これらの抗原がNeurosphere構成細胞のみでなく、新鮮な胎児マウス脳細胞においても、同様にNS-ICを分離できるかを検討した。結果、胎児脳細胞においても、これらの抗原陽性細胞群はコントロールと比べ、より効率よくNeurosphereを形成し、むしろNeurosphere構成細胞での成績よりも効率は良かった。

これらの抗原陽性細胞から形成される一次性又は二次性Neurosphereをin vitroにおいて分化させたところ、Neuron・Astrocyte・Oligodendrocyteの三系統への分化が確認され、神経幹細胞としての多分化能を有することが確認された。また、green fluorescent protein (GFP) 胎児マウスを用いて、これら抗原陽性細胞を、新生児マウス脳の側脳室へ移植したところ、移植細胞は白質を中心に灰白質にも広範な脳領域へ遊走し、かつ、各領域において神経三系統にわたる分化が確認され、in vivoにおける多分化能も示された。

また、元来、Hoechst33342染色により区別されるside population (SP)は、骨髄及び他臓器で幹細胞の豊富な領域とされるが、Neurosphere構成細胞で同様の結論となるかを検討した。SPとmain population (MP)のNeurosphere形成率をFACSを用いて上記同様に比較検討したところ、今回の条件下ではSPとMPとで有意な形成率の差は認めなかった。

以上より、細胞表面抗原syndecan-1, Notch-1, integrin- $\beta$ 1は神経幹細胞の分離・濃縮に有効なマーカーと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

神経幹細胞の細胞表面抗原は明らかにされていない。

申請者は、神経幹細胞を Neurosphere 構成細胞、及び胎児マウス脳組織細胞から、前方視的に細胞表面マーカーを用いて FACS で濃縮・分離する研究を行った。

血液系幹細胞・前駆細胞を中心に体性幹細胞も含め既存の表面抗原の中で、Neurosphere 構成細胞に表出されているものをスクリーニングした。その結果、syndecan-1, Notch-1, integrin- $\beta$ 1 があげられ、これらの陽性細胞は、陰性細胞より豊富な神経幹細胞を含むことを証明した。特に syndecan-1 と Notch-1 を組み合わせることで、より神経幹細胞を濃縮できた。また、胎児マウス脳組織細胞でも、これらのマーカーの発現を認め同様に幹細胞を濃縮可能であった。また、新生児マウス脳室内に移植したこれらの抗原陽性細胞は、脳内で migration を示し広範に分布し、また神経系の Neuron・Astrocyte・Oligodendrocyte の3系統への分化を示した。これらより、上記マーカーによる選別は、神経幹細胞の同定・濃縮に、有用な手段になると考えられた。

以上の研究は、神経組織の再生医療において重要と考えられる神経幹細胞の特性の解明に貢献し、これを効率よく同定し濃縮分離できる手段として、今後の治療研究に大いに貢献すると考えられる。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成17年4月5日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。