

京都大学	博士 (医学)	氏名	佐野 徳隆
論文題目	Enhanced Axonal Extension of Subcortical Projection Neurons Isolated from Murine Embryonic Cortex using Neuropilin-1 (Neuropilin-1 を用いて胎児マウス的大脑皮質から選別した Subcortical Projection Neuron は移植後により多くの軸索を伸展させる)		
(論文内容の要旨)			
<p>齧歯類胎仔の脳組織や多能性幹細胞から分化誘導した大脳皮質神経細胞を齧歯類個体の前頭葉運動野に移植すると、一部の移植細胞が軸索を脊髄まで伸ばすことが知られている。これを元に、細胞移植により失われた神経回路を再構築するという脳疾患に対する新たな治療手段に向けた研究が数多く行なわれているが、脳に移植した細胞の中でどの種類の細胞が subcortical projection neuron として皮質下に軸索伸展しているかは明らかでなく、将来的な高効率の細胞移植治療のためには、軸索を伸展する細胞の選別が必要と考えられる。そこで胎生期の subcortical projection neuron が軸索を形成する初期の段階で強く発現する蛋白を用いて軸索を伸展する細胞を選別することができるのではないかと考え、マウスにおいて subcortical projection neuron が最初の軸索を皮質下に伸ばし始める胎生 14.5 日 (E14.5) に強く発現する表面抗原のひとつである Neuropilin-1 (NRP1) に着目した。最初に E14.5 の C57BL/6N マウス前頭葉脳組織を single cell とし、NRP1 で蛍光標識したうえで、セルソーターを用いて NRP1 陽性細胞群と NRP1 陰性細胞群、およびセルソーターを通す操作のみを行った unsorted 群の 3 群を設けた。それぞれの群を免疫染色と quantative polymerase chain reaction (qPCR) で評価したところ、NRP1 陽性細胞は NeuroD1 や Tbr2 を発現する脳室下帯や中間帯に細胞体を持ち、皮質板への移動途中の興奮性の細胞を多く含んでいるのに対し、NRP1 陰性細胞は脳室帯や脳室下帯に存在する PAX6 や Ki67 を発現した未分化な細胞を多く含んでいた。これらの細胞群を in vitro で 4 日間培養すると、NRP1 陽性細胞由来の細胞塊は Ctip2、VGluT1、Robo1 などの subcortical projection neuron に発現するマーカーを強く発現したが、NRP1 陰性細胞由来の細胞塊は未分化な性質を保つ傾向にあった。最後に E14.5 の GFP 全身発現マウスの脳を上記の 3 群に分け、生後 2 日の C57BL/6N マウスの一次運動野に移植し、移植後 35 日目の状態を免疫染色で観察した。移植片の Ctip2 陽性細胞の比率は NRP1 陽性細胞由来の群で NRP1 陰性細胞由来の群に比べ 2.6 倍高く、NRP1 陽性細胞由来の軸索は線条体中の線維束の中をより選択的に通過する傾向にあった。NRP1 陽性細胞は NRP1 陰性細胞や unsorted 細胞に比べて、同側の大脳脚・橋腹側・脊髄に有意に軸索を伸ばしており、NRP1 陽性細胞由来の軸索のみが錐体交叉以降、対側の脊髄髄質まで到達していた。</p> <p>以上より、E14.5 のマウス前頭葉細胞の中で NRP1 陽性の細胞は subcortical projection neuron やその前駆細胞を多く含み、新生仔マウスの前頭葉運動野に移植した際にも皮質下に皮質脊髄路に沿ってより多く、より脳から遠位まで軸索を伸ばす傾向があることが分かった。本研究の結果は、多能性幹細胞から神経細胞への適切な分化誘導と組み合わせることにより、脳血管障害に対する細胞移植治療への応用に利用できる可能性がある。</p>			

(論文審査の結果の要旨)
<p>大脳皮質神経細胞の移植により、脳血管障害で失われた神経機能を回復するための研究は数多く行われているが、脳に移植した細胞の中でどの細胞が subcortical projection neuron として皮質脊髄路に沿って軸索伸展するかは明らかでなく、効率的かつ安全な移植治療を行うには適切な細胞の選別を行う必要があると考えられる。そこで申請者は胎生期の subcortical projection neuron が軸索を形成する初期の段階、マウスにおいては胎生 14.5 日 (E14.5) 前後に発現する Neuropilin-1 (NRP1) を用いた選別を試みた。NRP1 は軸索形成の初期に重要なガイダンス因子であり、セルソーターを用いて NRP1 陽性細胞と陰性細胞に分離すると、NRP1 陽性細胞は皮質板への移動途中の興奮性神経細胞を多く含んでいるのに対し、NRP1 陰性細胞は脳室帯や脳室下帯に存在する未分化な細胞を多く含んでいた。E14.5 マウス前頭葉組織を NRP1 陽性細胞と陰性細胞に分離し生後 2 日目の C57BL/6N マウス前頭葉皮質にそれぞれ移植すると、NRP1 陽性細胞は皮質脊髄路に沿った軸索をより多く、遠くまで伸展させた。</p> <p>本研究により、NRP1 によるセルソーティングは皮質脊髄路を形成する subcortical projection neuron の選別に有用である可能性が示された。</p>
<p>以上の研究は、皮質脊髄路に沿って軸索伸展する神経細胞の同定に貢献し脳血管障害に対する再生医療研究に寄与するところが多い。</p> <p>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。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 12 月 28 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。</p>