

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 理学 )	氏名	浦田 悠子
論文題目	有尾両生類の中脳視蓋の構造的再生を可能にする 局所成体神経幹細胞の寄与と展開		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文では、21世紀になって再生研究のための新規モデル動物として確立されたイベリアトゲイモリ (<i>Pleurodeles waltl</i>) を用いて、成体の中脳視蓋の左半分的全摘出後 (中脳の約1/4を摘出) の脳の再生過程を詳細に観察して、脳の再生メカニズムを考察するとともに、脳の再生研究のモデル・システムの確立を目指している。</p> <p>具体的には、成体イモリの頭蓋骨を開き、中脳の正中に沿って左右の中脳を分け、左側の間脳と小脳の境界を切開して中脳左側の背側部 (視蓋) を切除することで、再現性の高い摘出手術法を確立している。驚くべきことに、それだけ大きな領域を摘出しにもかかわらず、71匹を手術して71匹全てが生存するという高い生存率を示した。次に、中脳で領域特異的な発現を示すことが知られているPax7, Lim1/2, COUP-TF1といった転写因子に着目し、その抗体を用いて中脳の各領域がどのタイミングで再生するかを観察した。また、イモリの成体神経幹細胞として知られる上衣細胞についてMusashi1、神経に分化した細胞についてはHuC/DといったRNA結合タンパク質に対する抗体で検出し、増殖期にある細胞をチミジンホモログであるEdUの取り込みや、M期の細胞をリン酸化ヒストン抗体で検出し、再生過程のどの時期にどの部位でどれくらいの数の細胞が分裂しているのかを連続切片を作製して詳細に定量化した。さらに、To1システムを用いたエレクトロポレーションによって脳室内壁に分布する細胞をGFP蛍光タンパク質で標識し、標識細胞の再生過程における増殖・移動や細胞分化の解析を行った。</p> <p>その結果、①中脳視蓋のほとんどの部分で完全な再生 (脳の層構造の再生、脳の領域化の再生) を確認できたものの、約1年半の歳月をかけても、rostral側 (吻側・前側) は中脳の完全な層構造までは再生できていないこと、②rostral側では細胞種としては全ての細胞種も再生されており背側の蓋板 (roof plate) も完全再生しているが層構造のみ再生されていないこと、③caudal側 (尾側・後側) の峡部に近い側の上衣細胞 (ependimoglia) が盛んに増殖して視蓋の再生に必要な細胞を供給していること、を見出した。rostral側で層構造が再生していないのは上衣細胞が傷口を塞がないことに起因していること、エレクトロポレーションでの再生細胞の追跡によって長い神経軸索からなる遠心性神経投射の再生も上衣細胞からされていることを示唆した。</p> <p>それらの観察をもとに、中脳の再生においてもrostral側の峡部 (中脳発生時にオーガナイザー活性を持つ) が脳の領域性を含めた再生の中核的な役割を担うこと、それとは独立に背側の蓋板 (roof plate) は再生を行うと結論づけている。</p>			

( 論文審査の結果の要旨 )

本論文は、再生能力の高いことで知られる有尾両生類のイモリを用いて、それもゲノム編集が容易にできることで新規再生モデル動物となったイベリアトゲイモリを用いて、中脳の約1/4という大きな切除手術からの脳の再生を観察することで、脳がどのように領域性や層構造を再生するかを詳細に記述した世界初の論文となっている。再現性の高い脳再生研究システムを確立した点、手術後87週という長期にわたって再生過程を観察している点、いろいろな再生ステージの脳の連続切片を作製しては種々の分子マーカーを用いて増殖細胞や分化細胞を観察している点、それらの観察結果を定量化している点、遺伝子導入法を独自に確立している点など、博士研究にふさわしい内容となっている。また、本論文で発見された現象は、今後の脳の再生メカニズムを考える上で示唆に富むものになっている。

すでに、イモリでは視蓋の再生に伴い、視神経の視蓋への投射パターンも復元されることが示されており、将来の脳の再生研究の重要な実験モデルとなることが大きく期待できる。また、ゲノム編集が容易にできるイベリアトゲイモリを使った脳の再生研究が進展することで、遺伝子レベルで脳の再生メカニズムが解明されるようになるとともに、哺乳動物の脳の再生能力との差についてもゲノムレベルで比較できる新時代が来ることが期待できる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成31年1月15日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。