

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	石川正真
論文題目	初代培養ラット胎児由来神経細胞を用いた細胞老化機構の解析		
(論文内容の要旨)			
<p>細胞老化は、増殖細胞が非可逆的に増殖停止を来すことを主徴とし、老化特異的 β ガラクトシダーゼ活性 (senescence-associated β-galactosidase, SA-β-gal) 陽性、炎症性サイトカインの異所的発現と分泌 (SASP, senescence-associated secretory phenotype) やヘテロクロマチン形成などの特徴的な表現型を伴う。また、細胞老化は個体老化の一因となることが示されている一方、重要ながん抑制機構として適応的役割を果たすことが知られている。これまでに齧歯類長期培養神経細胞において、SA-β-gal 活性陽性などの細胞老化様表現型の報告があったが、その類似性が生物学的に意味のあることなのかは不明であった。そこで、本論文において申請者は、先ず、ラット胎児海馬および大脳皮質から得た神経細胞を 28 日間にわたって維持する培養系を確立し、初代長期培養神経細胞が、細胞老化に特徴的な表現型と老化脳神経細胞が示す表現型を示すのかについて、それぞれ検討している。最後に、培養神経細胞がこれらの細胞生物学的な変化を示すようになる分子機構を明らかにしようとしている。</p> <p>申請者は、ラット初代神経細胞長期培養系を開始するにあたり、分裂能をもつアストロサイトなどが長期培養中に集団の主要な細胞を占めないように、培養開始後 24 時間にわたって Ara-C 処理を行い、その結果、培養 28 日目 (D28) においても 76% の細胞が神経細胞を占める長期培養系を確立している。次に、本培養系において、SA-β-gal 陽性、SASP 陽性、CDK 阻害因子 p16 の発現活性化、Lamin B 遺伝子の発現低下が経時的に出現することを示し、長期培養神経細胞が分裂細胞で定義されてきた細胞老化と極めて類似した表現型をもつことを証明している。一方、同じ長期培養神経細胞が生理的生体老化脳の神経細胞に見られるように、転写共役因子 REST を発現し、電位開口型 Ca^{2+} イオンチャネル依存性 long-term potentiation が優位になることを示し、本培養系が生体老化脳における神経細胞の加齢性変化の一部を再現していることを証明している。以上のことから、申請者はラット初代長期培養神経細胞が生理的老化脳で見られる神経細胞の機能変化を解析する上で有用であることを論じ、その変化の少なくとも一部は細胞老化の誘導によっておこるものと推測している。</p> <p>最後に、申請者は長期培養神経細胞に見られる以上のような変化がいかなる分子機構によって生じるのかを明らかにしようとしている。その結果、D28 神経細胞は、アミロイド β 凝集体の増加、不溶性ユビキチン化蛋白質の増加、オートファジーフラックスの低下などの所見を示し、蛋白質恒常性の低下が起きていることを示している。さらに、長期培養系に $\text{A}\beta$ 凝集体を減少させる作用をもつ化合物 EPPS 処理を行うと細胞老化表現型が減弱し、家族性アルツハイマー病で見られる変異型ヒト APP 蛋白質を強発現すると細胞老化表現型が強く見られることを証明している。最後に、蛋白質産生を正に、オートファジー活性を負に制御する mTOR の阻害剤であるラパマイシンを長期培養系に投与すると細胞老化表現型が減弱することを見出している。以上の結果から、申請者は、蛋白質恒常性の低下が長期培養神経細胞における細胞老化表現型の原因であると結論している。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

細胞老化は、1965年に米国のL Hayflickが、正常ヒト線維芽細胞が培養条件下で分裂できる回数が有限であることを初めて報告したことに端を発する(Exp. Cell Res., 1965)。細胞のドナー年齢が高いほど試験管内ではより少ない数の細胞分裂しか行わないことから、彼はこの現象が個体老化と関係があると考え、細胞老化と名付けた。その後、細胞老化は、SA-β-gal、SASPなどの特徴的な表現型を示すことが明らかになり、これらをもって定義される。重要なことは、細胞老化は個体老化を誘導するという個体生存にとって負の側面をもつとともに、抗腫瘍作用という適応的な側面をもつことである。

ヒト脳老化は個体老化のなかでも重要な医学的・社会的意味をもつ。これまでに長期培養齧歯類神経細胞において神経細胞にSA-β-gal活性の出現を観察した報告など、分裂停止細胞である神経細胞において細胞老化と類似した現象の出現は指摘されてきたが、細胞老化の重要な判定基準が細胞分裂の非可逆的停止であるため、神経組織に細胞老化は起こるのか、あるとすればそれを誘導する分子機構は何なのかについて詳細な解析は行われてこなかった。本研究は、この問題に解答を与えることを目的として、ラット海馬神経細胞の長期培養系を樹立し解析を行ったものである。特に、申請者は困難なラット長期培養系を工夫しながら独力で確立し、少数の細胞しか得られないにも関わらず、ウェスタンブロット、レンチウイルス発現 shRNA による遺伝子ノックダウン、定量的免疫抗体染色法などの技術的に困難な実験を統計学的に判断しながら再現性よく行っており、実験研究者としての申請者の力量が評価できる。さらに、本長期培養系を用いて単に神経細胞が細胞老化を起こすことを証明するのみならず、ヒト老化において生理的老化脳の一部がアルツハイマー病に進行する過程を念頭に入れながら、培養神経細胞で見出された所見がヒト老化脳のどの段階に相当するのか考え、神経細胞の細胞老化はアルツハイマー病で特徴的に見られる神経細胞死を防ぐ適応的な役割をもつという極めて独創的な仮説の提出をしていることは、申請者が優れた生命科学研究者としての資質をもつことを示している。

以上のように、本論文は生命科学に関する高度で幅広い学識、染色体研究分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見もしくは概念等が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。更に、令和元年12月2日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日