

京都大学	博士（医科学）	氏名	GRINAND Luc Brice
論文題目	Automated measurement of fluorescence signals reveals a significant increase of the graft-derived neurite extension in neonates compared to aged rats (移植神経細胞の突起伸長は老齢ラットよりも幼齢ラットにおいて著明に増加することが蛍光信号の自動計測で示される)		
(論文内容の要旨)			
<p>The likelihood of Parkinson's disease becoming treatable in the future thanks to grafts of iPS cell derived neurons is rapidly increasing. However, the ability of grafted neurons to integrate in a mature brain is limited. In an attempt to provide therapeutical improvement, it appeared that rigorous and efficient methods for quantifying the extend of graft-derived innervation was severely lacking</p> <p>Methods do exist, but all those reviewed present limitations that renders them unsuitable for our experimental plan. Among the main concerns stands user intensiveness and proneness to errors, both being due to the human element required for data treatment.</p> <p>In essence, an operator is necessary to form a judgment on where to place the threshold for separating the background noise from the authentic signal, potentially on hundred if not thousand of micrographs. This poses multiple issues regarding consistency, accuracy, repeatability, and practicality.</p> <p>As reliable quantification capabilities are required for further development in this field, the decision was taken to develop a new method that relies on the same core principles, but exchanged the human element with an automated approach that emulate what an operator would do. Careful observation of rat brain tissue revealed that some measurable values (Mean brightness, Standard Deviation) could be extracted from images and allow a program to calculate a background threshold similar to what an operator would decide. From this base, fine-tuning can be done quickly by a computer, by calculating through a range of possibilities instead of letting a human operator rely on trial-and-error.</p> <p>With this new method, Processing the 3145 images taken across the brains of 9 animals (5 young rats, 4 old) took only 12 hours of computing, and concluded that the young brain environment was more favorable to neural grafts as compared to an "elderly" brain, with the young condition containing 40% more graft-derived neurites.</p>			

(論文審査の結果の要旨)

iPS 細胞由来神経細胞の移植によるパーキンソン病治療法開発において、治療効果の評価のためには、移植細胞の生着や軸索伸長を厳密かつ効率的に解析する必要がある。過去に幼若ラットの脳環境は老齢ラットと比べて移植細胞の軸索伸長に有利だという報告があるが、その方法では作業者が閾値設定を行い、さらに数百枚以上の顕微鏡写真から手作業で軸索伸長を計測する必要があり、正確性、再現性、実用性などの点で課題が存在する。

本研究では、同じ基本原理に依拠しながら、作業者が行う作業を模倣した自動化画像解析による新しい評価法を開発した。具体的には、ラット脳組織画像の平均輝度および標準偏差を抽出して背景閾値を決定し、さらに画像濾過レベルを変化させることによって移植した iPS 細胞由来神経細胞の軸索伸長を定量化した。この方法では自動的、客観的かつ迅速に軸索伸長を解析することができ、9 匹（幼若 5 匹、老齢 4 匹）のラット脳画像 3145 枚を 12 時間で処理した。その結果、幼若ラットでは老齢ラットと比べて移植した iPS 細胞由来神経細胞の軸索伸長が 40%増加していることが確認できた。ただし、本法の潜在的な評価バイアスにより、解析対象に応じて適切なコントロールまたはより厳密な閾値を設定する必要がある。

以上の研究はヒト iPS 細胞由来神経細胞の移植後の脳内での正確な組織学的評価に貢献し、将来の細胞移植治療への応用に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医科学）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、令和 4 年 5 月 23 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。

要旨公開可能日： 年 月 日以降