

氏 名	きた だ まさ あき 北 田 容 章
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2455 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 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 生 理 系 専 攻
学位論文題目	Differentiation of choroid plexus ependymal cells into astrocytes after grafting into the pre-lesioned spinal cord in mice (マウス損傷脊髄への移植による脈絡叢上衣細胞のアストロサイトへの分化)
論文調査委員	(主 査) 教 授 金 子 武 嗣 教 授 橋 本 信 夫 教 授 井 出 千 束

論 文 内 容 の 要 旨

脈絡叢は脳脊髄液の産生部位として機能し、上衣細胞がその中心的役割を果たしていることは周知のところである。私達はこれまでに脈絡叢上衣細胞の新たな機能として、軸索再生促進作用を有することを明らかとしてきた。脊髄損傷の治療を目的としたラット切断損傷脊髄への脈絡叢の移植実験において、私達は以下のことを見出した。脈絡叢上衣細胞は脳室側に豊富な微絨毛や隣接する細胞との細胞間結合装置を有し、血管側にはその直下に基底膜が存在するが、脈絡叢移植後には移植上衣細胞は基底膜から離れ、微絨毛を次第に失う。この状態で再生軸索と接着し更に再生軸索を取り巻く像が観察されたことから、脈絡叢上衣細胞は形態変化を生じながら再生軸索を支持することが明らかとなった。移植脈絡叢上衣細胞の分化をより純度の高い系で確認する為、培養脈絡叢上衣細胞をマウス脊髄へ移植した。

培養には哺乳7～14日齢の green fluorescence protein (GFP) 遺伝子導入マウス（グリーンマウス）の第四脳室脈絡叢を用いた。このマウスは、 β -アクチンプロモーター下に GFP 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスである。グリーンマウスをドナーとし、野生型マウスをレシピエントとすることで、移植細胞の同定は容易となる。第四脳室脈絡叢は大槽側から比較的簡単に採取することが可能であり、脳実質組織混入の可能性はほとんど生じない。培養法としては、既に確立されていた脳室上衣細胞培養法を用いた。無血清培地を用いたこの方法では、脳組織全体を素材として培養する場合でも、培養3週間でアストロサイトの含有率は2%まで抑えられる。脈絡叢にはアストロサイトが存在しない為、より純度の高い上衣細胞を得ることが可能となる。こうして4～6週間培養した脈絡叢上衣細胞を、前処置として移植1週間前に部分切断損傷を行ったマウス脊髄へ移植した。移植1, 2, 3週後に免疫組織化学法を用い、アストロサイト、オリゴデンドロサイトあるいは神経細胞への分化について検討した。

移植上衣細胞は多数の突起を有する細胞へと形態変化を生じていた。免疫組織化学染色により、アストロサイトのマーカーであるグリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) に陽性であり、かつアストロサイトの機能的マーカーであるグルタミン酸トランスポーター GLT-1も陽性である移植細胞が観察された。また、抗 GFP 抗体及び抗 GFAP 抗体を用いた二重免疫電顕法により、移植細胞は多数の突起を有し、微絨毛や細胞間接着装置を持たない極性のない細胞へと形態変化を生じ、更にその細胞体・突起に GFAP 陽性の中間径フィラメントを有することが明らかとなった。全移植細胞のうち GFAP 陽性細胞の占める割合は、移植3週までで5%程度であった。脈絡叢上衣細胞のオリゴデンドロサイトや神経細胞への分化は、確認されなかった。以上より、少なくとも一部の脈絡叢上衣細胞は培養後移植することでアストロサイトへと分化することが明らかとなった。アストロサイトへの分化能を有することから、脈絡叢上衣細胞が神経幹細胞として機能し得る可能性が示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者らはこれまでに脈絡叢上衣細胞が新たな機能として、軸索再生促進作用を有することを明らかとしてきた。更に脊

髄損傷の治療を目的としたラット切断損傷脊髄への脈絡叢の移植実験において、脈絡叢上衣細胞は形態変化を生じながら再生軸索を支持することを明らかとしてきた。

本研究では、GFP トランスジェニックマウスの脈絡叢上衣細胞を培養し、同型野生型マウスの脊髄に移植することで、脈絡叢上衣細胞の分化能を調べた。移植 1 週間前に前処置として脊髄 T9 レベルに部分切断損傷を与え、そこへ 4×10^4 個の細胞を移植した。移植 1 ～ 3 週で移植上衣細胞は多数の突起を有する細胞へと形態が変化しており、免疫組織化学染色によりアストロサイトのマーカー蛋白質 (GFAP) の発現が観察された。また、抗 GFP 抗体及び抗 GFAP 抗体を用いた二重免疫電顕法により、移植細胞がアストロサイトの微細形態と類似した像を示すことが観察された。全移植細胞のうち GFAP 陽性細胞の占める割合は、移植 3 週までで 5 % 程度であった。脈絡叢上衣細胞のオリゴデンドロサイトや神経細胞への分化は確認されなかった。これらの所見より、少なくとも一部の脈絡叢上衣細胞は培養後移植することでアストロサイトへと分化することが明らかとなった。アストロサイトへの分化能を有することから、脈絡叢上衣細胞が神経幹細胞として機能し得る可能性が示唆された。

以上の研究は脈絡叢上衣細胞の新たな機能の発見に貢献し、グリア細胞の分化研究に寄与するところが多い。

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 14 年 1 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。