京都大学	博士（　医科学　）	氏　名	吉　川　（小　倉）　綾
論文題目	γ-Secretase Inhibitors Prevent Overgrowth of Transplanted Neural Progenitors Derived from Human-Induced Pluripotent Stem Cells. (γセクレターゼ阻害剤は人工多能性幹細胞由来神経前駆細胞の脳内移植後の過増大を抑制する)		

（論文内容の要旨）

パーキンソン病の治療において、ES細胞及びiPS細胞由来のドパミン産生神経は細胞移植治療のソースとして注目を集めている。パーキンソン病モデルラットを用いた動物実験では、これらの細胞が移植後に生着し機能改善に貢献したという報告されている。一方でこれらの臨床応用には安全面での課題がある。ドナー細胞に残留する未分化多能性幹細胞はテラトーマ形成の原因として問題視されてきた。また、たとえ未分化多能性幹細胞がドナー細胞から排除できても、神経前駆細胞(NPC)は一般的に高い増殖能を持っており、移植片の予測不可能な過増大をひきおこす可能性が考えられる。Notchシグナルは、NPCの分化多能性を維持し、その増殖を促進することが知られている。そこで、本研究ではヒトiPS細胞から誘導したNPCに、Notchシグナル経路のメディエーターであるγセクレターゼの阻害剤(GSI)を使用することでpost mitoticな神経へと成熟させた。さらにGSIで短期間処理したドナー細胞をNOD-SCIDマウスの線条体に移植し、移植片の過増大を抑制しうるか検討した。

ヒトiPS細胞はレトロウイルス法とプラスミドベクター法を用いて樹立された2株を使用した。神経分化誘導には浮遊培養法（SFEBq法）を用い、FGF8, Wnt1, SHHなどの因子の添加によりドパミン神経前駆細胞を含む球状の細胞塊（sphere）へと分化誘導した。GSI処理群のsphereには分化18日目から22日目までの4日間、強力な低分子GSIであるDAPTあるいはcompound E（いずれも10μM）を添加した。

*in vitro*の解析ではBrdUによる細胞周期解析および免疫染色にてGSI処理群で分裂細胞の減少を確認した。特にコントロール群のsphereが未熟な神経細胞(PAX6陽性)で構成されるのに対し、GSI群のsphereでは6-7割の細胞が成熟神経（MAP2ab陽性）であった。さらに、神経軸索伸展の実験ではコントロール群に比べGSI添加群の神経細胞は有意に長い神経軸索を伸ばす事が確認された。これらの結果から、4日間のGSIによる処理はNPCの増殖を抑制すると同時に、ニューロンへの分化を促進することが明らかになった。

*in vivo*の解析ではGSIで処理をした神経分化22日目の神経細胞を移植し、8週間後に組織学的解析を行った。コントロール群（1.00±0.13 mm^3、N=7）と比較して、DAPTおよびcompound E群では移植片のサイズが有意に減少した（それぞれ0.14±0.05 mm^3, 0.06±0.05 mm^3）。免疫組織学的な解析の結果、GSIによるドナー細胞の前処理は、移植後生着細胞の構成も変化させることがわかった。つまり、コントロール群では全ての移植片でKi67陽性の細胞が多く観察され過増大を示唆する”neural rosette”などの構造がみられた一方で、GSI処理群の移植片は主としてTubβ3陽性の成熟した神経細胞で構成されていた。

以上より、ES 細胞及び iPS 細胞由来の神経細胞の移植治療の安全性をより高めるために、長期培養による成熟の促進や FACS による未分化細胞の除去と並び、GSIでの処理は有効な方法であることが示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

パーキンソン病の治療において、ES細胞及びiPS細胞由来のドパミン産生ニューロンは細胞移植治療のソースとして注目を集めている。ラットやカニクイザルの疾患モデルを用いた動物実験では、これらの細胞が移植後に長期生着し症状改善に貢献したと報告されている。一方で移植細胞の増殖による移植片の過増大が安全面での課題となっている。神経前駆細胞(NPC)においてNotchシグナルは、その分化多能性を維持し、増殖を促進することが知られている。そこで、本研究ではγセクレターゼ阻害剤(GSI)を使用してヒトiPS細胞から誘導したNPCのNotchシグナル経路を阻害することによって、細胞分裂を抑制し神経分化を促進できるかを検討した。さらに、移植前にGSIで処理することによって移植片の過増大を抑制しうるか検討した。

*in vitro*のBrdUによる細胞周期解析, qPCR、免疫染色では、NPCを４日間GSIで処理することによって分裂細胞が減少し、ニューロンへの分化が促進されることが確認された。次に、NPCをNOD-SCIDマウスの線条体に移植し8週間後に組織学的解析を行うと、対照群に比べGSI処理群では移植片のサイズが縮小していた。さらにGSI処理群ではneural rosette構造もみられずTubß3陽性ニューロンが有意に増加しており、移植細胞の神経分化が促進されていることが明らかとなった。

以上の研究は、ES 細胞及び iPS 細胞由来神経細胞を用いた細胞移植治療の臨床応用にむけ、その安全性を向上させるのに寄与するところが大きい。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平成２５年１月８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