

氏 名	まつ 松 浦 のぶ き 樹
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2494 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 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻
学位論文題目	Sonic hedgehog facilitates dopamine differentiation in the presence of a mesencephalic glial cell line (v-myc 癌遺伝子および Sonic hedgehog 遺伝子導入によるラット中脳前駆細胞株樹立とそのドーパミン細胞誘導分化作用に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 影 山 龍 一 郎 教 授 柴 崎 浩 教 授 橋 本 信 夫

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

中脳 dopamine (DA) 細胞の誘導, 分化, 生存には, 腹側中脳細胞からの拡散因子や細胞表面因子が重要な働きをしていることを示唆する報告がここ数年見られる。本研究では, in vitro でも未分化中脳腹側細胞に, 中脳神経前駆細胞が DA 細胞へ誘導分化する過程を増強させる作用があると想定し, その細胞間で働く因子の研究ツールとして, また Parkinson model への移植材料として, 増殖能を有する細胞株樹立を試みた。更に DA 細胞の誘導因子であり, DA 細胞の生存率を増強する栄養因子でもある Sonic hedgehog (SHH-N) にも着目し, このパラダイムにおけるその作用を調べた。

【方法】

神経細胞の不死化には v-myc 癌遺伝子を組み込んだ retrovirus vector (LINXv-myc) を用いた。v-myc の promotor は tetracycline (Tc) により制御されており, 感染細胞の分裂増殖を停止させることが可能である。本 retrovirus を胎生14日 (E14) rat 中脳腹側細胞に感染させた。得られた不死化神経幹細胞株 VME14に SHH-N 遺伝子を組み込んだ retrovirus vector (LXSHD/SHH-N) を二重感染させ, SHH-N を過剰発現させた細胞株 A1 を作成した。これら細胞株を栄養細胞層として E11 rat 中脳細胞との共培養を行った。

【結果】

VME14 細胞は増殖能を有し, 形態上は丸く突起を持たない。Tc 1 μ g/ml にて増殖は抑制され neurite 様の突起を伸ばし, 接触阻止を呈し monolayer を維持する。免疫染色で GFAP+ であったが, TH+ 細胞 (DA 細胞の marker) は認めなかった。A1 細胞も Tc により同様な形態の変化を呈し, TH+ 細胞は認めず GFAP+ であった。A1 細胞では転写・蛋白レベル共に SHH-N が確認されたが, VME14 では内因性を含め SHH-N は確認できなかった。また両細胞とも GDNF, FGF-8 は RT-PCR で検出されなかった。

E11 中脳細胞は分散培養において cluster を形成するが, 単独培養では TH+ 細胞は極わずかし認めなかった。一方 VME14, A1, primary hippocampal glia 各細胞との共培養では, TH+ 細胞数が2を超える cluster の比率は, それぞれ約20%, 35%, 10%であり, VME14, A1 細胞に DA 細胞数の強い増加作用を認めた。

更に共培養における TH+ 細胞数増加の機序について, BrdU の取り込み実験と TUNEL 法によるアポトーシスの検出を行った。BrdU を取り込んだ TH+ 細胞は1%以下であったことから, DA 前駆細胞の増殖の可能性は少ないと考えられた。また VME14 との共培養と E11 単独培養に TUNEL+ 細胞数に有意差がなく, 加えて A1 との共培養でも TH+ 細胞で TUNEL+ はなく, Tuj1+ 細胞で TUNEL+ も0.1%以下であったことから, TH+ 細胞の増加に生存率の増強が一次的に関連する可能性は少ないと考えられた。

【考察】

VME14 や A1 細胞が E11 中脳細胞からの TH+ 細胞数を増加させるのには, これまで報告されたものとは異なるなんら

かの強力な誘導・分化機序が作用していると考えられる。Parkinson 病の移植治療においては、移植材料が限られていることと、その生着率の低さ（5—6%）が大きな障壁となっており、co-graft として DA 細胞を誘導する細胞株 VME14, A1 は1つの解決法であり、有用と考えられる。

論文審査の結果の要旨

未分化中脳腹側細胞に中脳神経前駆細胞がドーパミン細胞へ誘導分化するのを促す作用があると想定し、同細胞株樹立を試み、その作用につき調べた。

テトラサイクリン（Tc）により v-myc の発現を抑制できるレトロウィルスベクターを用いて、不死化した胎生14日ラット中脳腹側細胞株 VME14 を作成した。更に同細胞株に、ドーパミン細胞の誘導因子である Sonic hedgehog（Shh）を過剰発現させた細胞株 A1 を作成した。両細胞株を栄養細胞層として胎生11日ラット（E11）中脳細胞との共培養を行った。

VME14, A1 両細胞は増殖能を有し、Tc 投与後増殖は抑制され突起を伸ばした。両細胞とも GFAP 陽性であったが、内因性 Shh, GDNF, FGF-8 は RT-PCR で検出されなかった。E11 中脳細胞は、単独培養においてチロシンヒドロキシラーゼ（TH）陽性細胞を極わずかししか認めないが、VME14 細胞との共培養では、TH 陽性細胞数の強い増加作用を認め、A1 細胞との共培養では、更にその作用は 50-75%増強された。

これらの結果より、VME14 や A1 細胞が E11 中脳細胞から TH 陽性細胞数を増加させるのには、これまで報告されたものとは異なる何らかの強力な誘導・分化機序が関与している可能性が示唆された。

以上の研究はドーパミン細胞の誘導分化機序の解明に貢献し、パーキンソン病治療の発展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3月11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。