

氏 名	いま よし いたる 今 吉 格
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 144 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 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	生 命 科 学 研 究 科 高 次 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	活性誘導型Cre組み換え酵素を用いた神経幹細胞の時期特異的な遺伝子操作法の開発とマウス成体脳におけるニューロン新生の生理的意義の解析

論文調査委員 (主 査)
教 授 杉 田 昌 彦 教 授 上 村 匡 教 授 渡 邊 大

論 文 内 容 の 要 旨

従来、ニューロンの産生は発生期においてしか行われないと考えられていたが、ヒトを含めた哺乳類の成体の脳においても神経幹細胞が存在し、側脳室周囲の脳室下帯や海馬の歯状回といった特定の領域では、ニューロンの新生が一生継続している事が解ってきた。

しかし、これまでニューロン新生を研究するのに用いられてきた手法では、ニューロン新生の全体像を明らかにする事ができなかったため、マウス個体内において、新生ニューロンの大部分を、意図するタイミングで恒久的に標識する手法の開発が必要であった。このため、活性誘導可能な組み換え酵素であるCreER^{T2}を、神経幹細胞において働く*Nestin*プロモーター／第2イントロンの制御下に発現するトランスジェニックマウス (Nes-CreER^{T2}) を開発した。これにより、タモキシフェンを投与する事で、意図するタイミングにて、神経幹細胞特異的な遺伝子操作が可能になった。

次にこのマウスを用いて、成体脳神経幹細胞から産生される新生ニューロンの選択的標識と除去を行った。Nes-CreER^{T2}マウスと、*Rosa*レポーターマウスとのダブルトランスジェニックマウスを作製し、新生ニューロンの標識を行った。嗅球においては、12ヶ月の間に顆粒細胞の大部分は新生ニューロンに置き換わっている事が明らかになった。また、Nes-CreER^{T2}マウスと、NSE-DTAマウスとのダブルトランスジェニックマウスを作製し、新生ニューロンの供給を阻害した。このマウスの嗅球では、顆粒細胞の数が経時的に減少する事から、ニューロン新生は嗅球の顆粒細胞の数、及び神経回路の維持に必須である事が解った。また、海馬・歯状回においては、新生ニューロンの供給が途絶えても歯状回の組織構造そのものには異常は見られなかったものの、野生型マウスで観察される顆粒細胞の増加が見られなかったことから、ニューロン新生は成体に間における顆粒細胞の数の増加に必要な事がわかった。

よって、本研究ではマウスの遺伝学を用いて、今まで遺伝子操作が困難であった成体脳神経幹細胞から産生される新生ニューロンの選択的標識と除去を行い、マウス成体脳ニューロン新生の全体像を明らかにするとともに、成体脳ニューロン新生の機能的意義について重要な知見が得られた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

哺乳類の成体脳には神経幹細胞が存在し、特定の領域ではニューロンの新生が一生継続していると考えられる。しかしこれまでの研究手法では、成体の神経幹細胞や新生ニューロンの時空間的ダイナミクスを特異的、選択的に解析することが困難であったため、その生理的意義には不明の点が多い。そこで申請者は、タモキシフェンにより活性誘導可能な組み換え酵素であるCreER^{T2}を、神経幹細胞において働く*Nestin*プロモーター／第2イントロンの制御下に発現するトランスジェニックマウス (Nes-CreER^{T2}) を樹立した。このマウス成体において、タモキシフェン投与により神経幹細胞に効率のよいCre組み換え活性を誘導できることが明らかとなり、成体の神経幹細胞の解析研究のための貴重な動物モデルが確立された。

申請者はさらに*Rosa26*レポーターマウスとのダブルトランスジェニックマウスを作製し、組み換えが起った神経幹細胞

に由来する新生ニューロンを特異的に標識することにより、嗅球の顆粒細胞層と海馬の歯状回におけるニューロン新生の解析を行った。嗅球においては、タモキシフェン投与12ヶ月後には約60%の顆粒細胞がレポーター蛋白質を発現しており、神経幹細胞での組み換え効率が60~70%であることから顆粒細胞の大部分は新生ニューロンに置き換わっていると考えられた。一方、海馬の歯状回においては、タモキシフェン投与12ヶ月後においても、レポーターたんぱく質を発現する細胞の割合は10%程度であり、新生ニューロンは顆粒細胞の一部を占めるにすぎないことが示された。また、NSE-DTAマウスとのダブルトランスジェニックマウスを作製し、新生ニューロンに特異的にdiphtheria toxin fragment Aを発現させることによりその選択的除去を行った。嗅球においては、新生ニューロンの供給が途絶えると、顆粒細胞の数が経時的に減少し、神経回路の崩壊がみられた。したがって嗅球においては、持続的なニューロン新生は顆粒細胞の総数と神経回路の維持に必須であることがわかった。一方、海馬の歯状回においては、新生ニューロンの供給が途絶えても組織構造は正常に保たれていたが、野生型マウスに見られる顆粒細胞数の経時的な増加は見られなかった。したがって、歯状回におけるニューロン新生は、顆粒細胞数の増加に必須であることがわかった。

よって本研究は、活性誘導可能なCre/LoxPシステムを新生ニューロンの解析に適用することにより、ニューロン新生の全体像を明らかにし、嗅球の顆粒細胞層と海馬の歯状回における新生ニューロンの組み込み様式の違いを解明した。

以上より、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。

また、平成20年1月22日論文公聴会を開催し、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。