

氏 名	もり ざね あす か 森 實 飛 鳥
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2672 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 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	Optimal conditions for in vivo induction of dopaminergic neurons from embryonic stem cells through cell-derived inducing activity (SDIA 法における胚性幹細胞からのドーパミン作動性神経の生体内誘導における至適条件の検討)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 辻 憲 夫 教 授 長 澤 丘 司 教 授 橋 本 信 夫

論 文 内 容 の 要 旨

胚性幹細胞 (ES細胞) を feeder細胞 (PA6) の上で共培養して、ドーパミン産生神経細胞に誘導する方法 (SDIA 法) が Kawasaki らにより報告されている。この方法を応用する事により、ES細胞を用いたパーキンソン病に対する細胞移植治療の可能性が考えられる。SDIA 法で誘導されたドーパミン神経をマウスの線条体に移植すると、生着することが可能で、ドーパミン神経のマーカーである tyrosine hydroxylase (TH) を発現する。本論文では、SDIA 法により誘導されたドーパミン神経の生着効率を上げるために、移植における至適条件を検討した。

まず、移植細胞の至適分化日数を検討するために、8, 10, 12, 14日間の分化誘導をかけたそれぞれの細胞を移植した。SDIA 法で ES細胞を分化誘導すると、feeder 上にコロニーが形成される。これをパパイニンにて feeder細胞より分離した。分離したコロニーを 6-hydroxydopamine (6-OHDA) で処理したマウス (マウスパーキンソンモデル) の線条体に移植した。2週間後にマウスを還流固定し、脳切片を作製した。免疫染色により移植片内の TH 陽性細胞数を計測した。

Donor細胞の in vitro での解析では、TH 陽性細胞は分化日数14日のものに最も多く認められたが、移植をすると最も DA neuron の生着率が高かったのは分化日数12日間のものであった。

SDIA 法による分化誘導は中脳のドーパミン神経の初期発生を模倣していると考えられる。SDIA 法で12日間の分化誘導を行った場合、多くの細胞は、完全に分化を遂げた成熟ドーパミン神経細胞よりも、やや未分化な前駆細胞である。以上より、完全に成熟したドーパミン神経を移植するよりも、やや未分化な前駆細胞を移植した方が生着しやすいという事が示唆された。

次に、移植細胞同士の細胞間の接着をはずし、宿主脳の環境因子が細胞の分化、生着に及ぼす効果を増強することを意図とし、コロニーをばらして個々の細胞とし、低密度での移植を試みた。12日間の分化誘導をかけた細胞のコロニーをプロテアーゼ処理にて細胞間の接着を解き、個々の細胞の細胞浮遊液として20万、2万、2000個で移植した。その結果、コロニーのまま移植するよりも細胞浮遊液にて移植した方が、生着率が下落した。

Bjorklund らは未分化な ES細胞を低密度で移植すると、脳内でドーパミン神経に分化、生着すると報告している。未分化な ES細胞と SDIA で分化誘導された ES細胞の性質の違いによるものと考えられる。SDIA 法の場合は細胞間の接着を保ったままの移植の方が効率的と考えられた。

以上より、12日間の分化誘導を行い、コロニーのまま移植を行うのが、ドーパミン神経の生着には最も効果的であった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文では、stromal cell-derived inducing activity (SDIA) 法により誘導されたドーパミン神経の生着効率を上げるために、移植における至適条件が検討されている。

胚性幹細胞 (ES細胞) を骨髄間質由来の細胞 (PA6) 上で共培養し、ドーパミン産生神経細胞に誘導する方法 (SDIA

法)が報告されている。これを応用する事で、パーキンソン病に対する細胞移植治療の可能性が考えられる。

本論文ではまず、SDIA法での分化日数の最適条件を検討している。ドナー細胞の解析では、成熟ドーパミン産生神経は分化日数14日のものに最も多く含まれていたが、移植をすると最も生着率が高かったのは分化日数12日間のものであった。

次に、移植細胞をコロニーのまま移植する条件の方が、ばらして個々の細胞として移植する条件よりも優れていることが示されている。

以上より、12日間の分化誘導を行い、コロニーのまま移植を行うのが、至適条件であることが示された。

SDIA法により12日間の分化誘導を行った場合、成熟ドーパミン神経細胞よりも、やや未分化な前駆細胞が多く含まれると考えられる。以上より本論文は、完全に成熟したドーパミン神経を移植するよりも、やや未分化な前駆細胞を移植した方が生着しやすいという事を示唆している。

以上の研究は、胚性幹(ES)細胞から誘導した神経細胞の移植における至適条件の解明に貢献し、パーキンソン病に対する細胞移植治療の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15年12月1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。