

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 山 本 真 一

本研究は、成体脊髄の再生誘導療法の開発を目指し、成体脊髄に内在する神経前駆細胞の再生能に関する基礎的な解析を行ったものである。ラットをモデル動物として、試験管内培養系と第 10 胸髄切断モデルを用いて、成体神経前駆細胞の同定を行い、その増殖、分化制御機構について検討し、以下の結果を得ている。

1. 試験管内培養系を用いて神経前駆細胞を neurosphere として単離し、脊髄中心管周囲組織のみならず実質外側部にも神経前駆細胞が相当数存在することが示された。単一前駆細胞のクローン解析から、成体脊髄には分化能の点で多様な前駆細胞が存在していること、さらに多分化能を保持した神経前駆細胞が実質外側部にも存在していることが示された。
2. 培養系で成体前駆細胞は、胎生期と同様に、ホメオドメイン型 (Pax6, Pax7, Nkx2.2, Prox1) や basic helix-loop-helix (bHLH) 型 (Ngn2, Mash1, NeuroD1, Olig2) の転写因子を発現していることが示された。成体前駆細胞は分子レベルでも多様な細胞群が混在していると考えられ、胎生期と共通の制御機構の存在が示唆された。しかし、成体前駆細胞では、脊髄運動・介在ニューロンに特異的なマーカー (Islet1, Lim1, Lim3, HB9) の発現は認められなかった。
3. 第 10 胸髄切断モデルを用いた組織レベルでの解析から、上衣細胞だけでなく、損傷実質部においても GFAP や NG2 などのグリア系のマーカーを発現しない nestin 陽性の増殖性細胞が出現することを観察し、内在性前駆細胞に相当すると考えられた。また、損傷組織内には、Pax6, Pax7, Nkx2.2 といったホメオドメイン型転写因子を発現する細胞が出現し、特異的分布様式を示した。
4. 損傷脊髄内の増殖性細胞群を BrdU 標識した後に培養すると、多数の BrdU 陽性細胞が neurosphere 中に含まれており、さらにその一部はニューロンへと分化する能力を持っていることが示された。また、損傷部位近傍組織を培養した場合、正常脊髄からと比較して約 2 倍の neurosphere が単離されることから、内在性の神経前駆細胞が個体内で実際に増殖していることが示された。
5. 損傷脊髄組織内にはニューロンへの分化を促す bHLH 型転写因子 (Ngn2, Mash1,

NeuroD1) の発現やニューロンの新生は認められなかった。成体脊髄に発現している Notch1 は、損傷後に上皮細胞や損傷実質部内の増殖性細胞において発現が増強しており、発生期と同様に Notch シグナル系によるニューロンへの分化の制限の可能性が示唆された。

6. 組換え型レトロウイルスを用いた遺伝子操作により、培養系において成体前駆細胞における Notch シグナル系の役割を検討したところ、恒常活性型 Notch1 の強制発現により前駆細胞の分化が抑制され、Notch1 受容体のリガンドである Delta-like-1 のドミナントネガティブ型の発現や Ngn2 の強制発現により、ニューロンへの分化が促進されることが示され、Notch シグナル系が成体脊髄でのニューロン新生の制限に関与していることが強く示唆された。

以上、本論文は、成体脊髄には神経前駆細胞が広範囲に相当数存在することを明らかにした。損傷時には内在性前駆細胞は増殖するも、ニューロンの新生を含め有意な組織の再生は観察されなかった。この要因として、成体前駆細胞の内的性質とともに、組織内での外的環境要因の存在が考えられ、この外的制限機構の一つとして、Notch シグナル系が関与している可能性を明らかにした。本研究は、成体前駆細胞の持つ潜在的な能力を活性化することによる将来の再生誘導療法の開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。