

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 吉田 真子

本論文は、発生期における中枢神経幹細胞の細胞生物学的研究を行ったものである。神経幹細胞とは、自己複製を繰り返して増殖した後、ニューロンおよびグリア細胞へ分化する性質を有した細胞である。従来、神経幹細胞の分化に関する研究は *in vitro* 培養実験を用いた分化誘導因子の探求により行われていた。これによりグリア細胞分化に関与する多くの液性因子が同定された一方、ニューロン分化に関しては有力な因子の発見には至らず、現在もニューロンへの分化調節機構の解明が神経科学分野における中心課題となっている。そこで、本研究では神経幹細胞の増殖とニューロンへの分化の間には密接な関係があると考え、液性因子以外の増殖シグナルとして接着分子であるインテグリンに注目し、神経幹細胞におけるインテグリンの発現と増殖およびニューロンへの分化の関係を解明することを主な目的とした。

緒言では本研究の背景と意義について概説されている。

第 1 章では、インテグリン $\alpha_5\beta_1$ が神経幹細胞の増殖に与える影響について解析を試みた。神経幹細胞の培養基質として経験的にフィブロネクチンを用いていたことから、そのレセプターであるインテグリン β_1 の発現について、胎生 14.5 日目のマウス終脳由来初代培養細胞を用いて、フローサイトメトリーによる定量的な解析を行った結果、 β_1 の発現量の異なる 2 つの細胞群 (β_1^{high} および β_1^{low}) が認められた。そこで、セルソーターを用いて各細胞群の分離培養実験を行った結果、 β_1^{low} 細胞群では増殖性が顕著に低いことが判明した。続いて、株化細胞 (MSP-1 および MHP-2 細胞) を用いて $\alpha_5\beta_1$ の共発現を確認するとともに MSP-1 細胞に対して α_5 の染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により観察した結果、数多くの接着斑が認められ、 $\alpha_5\beta_1$ が神経幹細胞の増殖に機能している可能性が示唆された。そこで、基質であるフィブロネクチンの有無が増殖に与える影響について Alamar Blue Assay 法を用いた解析の結果、フィブロネクチンによる増殖促進作用が確認された。これらのことから、インテグリン $\alpha_5\beta_1$ が神経幹細胞の増殖調節に機能することが示された。

第 2 章では、神経伝達物質の一つであるグルタミン酸が神経幹細胞の増殖に与える影響について解析している。まず、カルシウムイメージング法により神経幹細胞におけるグルタミン酸受容体の発現を確認した。続いて、グルタミン酸非存在下における培養実験を行った結果、初代培養細胞および MSP-1 細胞は増殖できずに死滅した一方、MHP-2 細胞からは亜株が樹立された。この原因として、第 1 章の発現解析の結果、MHP-2 細胞においてのみ認められた $\alpha_5\beta_1$ の発現量の少ない細胞が、グルタミン酸非存在下でも増殖した可能性が示唆された。MSP-1 細胞および初代培養細胞の増殖にはグルタミン酸が必要不可欠であったことから、グルタミン酸が神経幹細胞の増殖を調節することが示唆された。

第 3 章では、神経幹細胞からニューロンへの分化に伴うインテグリン $\alpha_5\beta_1$ の発現量の変

化について解析を試みた。本章では、中枢神経幹細胞に特異的に発現する中間径フィラメントである nestin のプロモーター下で GFP を発現する pNestin-GFP トランスジェニックマウスを用いて、直接的に神経幹細胞を調製した。胎生 14.5 日目の大脳皮質組織に対する染色の結果、神経幹細胞層である脳室周辺域において nestin-GFP とともにインテグリン α_5 の強い発現が認められた一方、未成熟ニューロン層である中間帯ではその発現が低下していた。さらに、各発生段階における α_5 および β_1 の発現解析を行った結果、脳発生とともに nestin-GFP⁺細胞において α_5 および β_1 の発現量の少ない細胞の増加が認められた。そこで、第 1 章と同様、nestin-GFP⁺細胞 $\alpha_5\beta_1^{\text{high}}$ および $\alpha_5\beta_1^{\text{low}}$ 細胞群の分離培養実験を行った結果、 $\alpha_5\beta_1^{\text{low}}$ 細胞群ではニューロンが、 $\alpha_5\beta_1^{\text{high}}$ 細胞群では nestin-GFP⁺細胞が多く認められた。さらに、 $\alpha_5\beta_1^{\text{high}}$ 細胞群の神経幹細胞としての性質を確認するため単細胞培養実験を行った結果、自己複製能および多分化能が確認された。これらのことから、神経幹細胞ではインテグリン $\alpha_5\beta_1$ が高発現しており、ニューロンへの分化に伴ってその発現量が低下することが明確に示された。

以上、本論文は、インテグリン $\alpha_5\beta_1$ およびグルタミン酸が神経幹細胞の増殖を調節しており、特にニューロンへの分化に際して神経幹細胞におけるインテグリン $\alpha_5\beta_1$ の発現量は低下することを新たに示し、今後、神経幹細胞を利用した中枢神経機能再生への応用が期待される重要な知見を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。