

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 大 堀 靖 夫

本研究は成体ラット脊髄において、損傷に応答して増殖する、内在性神経前駆細胞の性質を明らかにするため、GFP 発現レトロウイルスを用いた標識法を用いて *in vivo* および *in vitro* での解析を試みた。さらに、これらの未分化前駆細胞に増殖因子投与や発生期脊髄に特異的な転写因子を強制発現させることによる増殖・分化誘導を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. 第 10 胸髄高位での脊髄完全切断モデルにおいて、損傷脊髄内に GFP レトロウイルスを直接注入することにより標識される細胞の多くが、Olig2, Nkx2.2, NG2 のグリア前駆細胞のマーカー陽性と示された。これらの細胞は *in vivo* においてはニューロンに分化し得ないものの、*in vitro* において neurosphere 法で浮遊培養すると、未分化の状態を保ったまま neurosphere を形成して増殖することが示された。さらに、分化を誘導すると、ニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトの全てに分化し、すなわち生体内ではグリア前駆細胞の性質を示すものの、培養系においては多能性前駆細胞の性質を保持することが示された。

2. 損傷脊髄内に、GFP レトロウイルスを増殖因子 (EGF, FGF2) とともに注入すると、損傷脊髄内で標識され、分化した GFP 陽性細胞の一部に幼若なニューロンのマーカーを発現する細胞が見られた。このような幼若ニューロンは増殖因子の投与なしには見られず、また増殖因子投与によっても、より分化したニューロンのマーカー NeuN を発現する GFP 陽性細胞はみられなかった。一方で、アストロサイトやオリゴデンドロサイトに分化した GFP 陽性細胞の割合は増殖因子の投与で影響はなく、増殖因子がニューロンに分化しうる前駆細胞群の増殖・分化・生存などに直接作用した可能性が示唆された。

3. *in vitro* において、成体脊髄由来の neurosphere 培養中に BMP4, CNTF などに加えて損傷脊髄内の環境を模倣すると、前駆細胞からのニューロン分化が抑制された。さらに、BMP4 に拮抗作用をもつ noggin や神経栄養因子 BDNF の投与は、BMP4 や CNTF による抑制を部分的に解除した。さらに、これらの分泌因子存在下に、発生期の神経系で neurogenic な作用をもつ *ngn2* を前駆細胞に強制発現させると、BMP4 や CNTF の存在下でもニューロンに分化した細胞の割合が増加し、*Ngn2* の強制発現が損傷脊髄内のニューロン新生に抑制的な環境を克服できる可能性を *in vitro* で示した。

4. 実際に損傷脊髄内に、増殖因子の投与と同時に *Ngn2* や *Mash1* の遺伝子を強制発現させると、*Ngn2* によって前駆細胞から分化したニューロン、*Mash1* によってオリゴデンドロサイトの割合がそれぞれ増加した。さらに *Ngn2* の強制発現は、損傷脊髄内でこれまでみられなかった、

[別紙 2]

成熟ニューロンの新生につながるものであり、損傷 28 日には一部に、前シナプスのマーカーの shynaptophysin を周囲に発現する新生ニューロンがみられ、新生ニューロンによるシナプス形成が示唆された。

これまで、損傷脊髄内で失われるニューロンやオリゴデンドロサイトの細胞補充は移植による研究が進められてきた。しかし、移植した細胞の多くはアストロサイトに分化したり、死んでいくことが報告されてきている。そこで本研究の結果は、このような移植による方法に代わって、成体脊髄に内在する神経前駆細胞の活用による、損傷脊髄の再生医療の開発に重要な手がかりをあたえるものと考えられる。