

論文審査の結果の要旨

氏名 田中 裕一

本研究論文は内在性細胞を用いた神経再生を最終的な目的とし、成体マウス大脳新皮質ネスチン陽性細胞に焦点を当てて遂行された。第1章は成体マウス大脳新皮質におけるネスチン陽性細胞の性質および分化能の解析について、第2章は脳梗塞後に見られるネスチン陽性細胞からのBDNFタンパク産生の活性化について、第3章では脳梗塞後の機能回復における神経栄養因子の寄与について、研究が実施され神経再生における意義を中心にその結果が考察されている。

脳梗塞は脳内の血管が詰まる事により、栄養枯渇になり脳細胞が壊死する事で機能障害をもたらす病気である。特に脳の上部表面に存在し知覚や行動といったヒトの高次機能の働きを制御する大脳新皮質では、梗塞を受けると日常生活を営む上で必要な機能が失われてしまう。そのため、有効な治療法の開発が望まれている。しかし現在、脳梗塞後の回復メカニズムは未だ不明のままであり、特に細胞レベルでのメカニズムの解析は重要だと考えられる。本研究論文では成体マウス大脳新皮質に存在するネスチンタンパク陽性な細胞に焦点を当てその性質、分化能の解析が行われた。このネスチンタンパクは中間系フィラメントの1種で神経幹細胞に発現する有力なマーカーの一つである。ネスチン陽性細胞の脳梗塞後に見られる変化、そしてニューロンをサポートする保護的な役割について解析が行われている。さらに、内在性神経栄養因子が脳梗塞後の回復に与える影響についても検討が実施された。

第1章では、成体大脳新皮質におけるネスチン陽性細胞の性質をNestin-GFPトランスジェニックマウスを用いて解析されている。ネスチン陽性細胞はオリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカーのNG2や転写因子のOlig2を発現するグリア細胞である事が分かった。次に、ネスチン陽性細胞の分裂能を確認後、分化の性質を調べるためBrdUを用いて分裂細胞をラベルし、その行方を追った。すると、1ヶ月後においても約80%のBrdU陽性細胞はネスチン陽性細胞のままであった。すなわち、成体大脳新皮質に存在するネスチン陽性細胞は分化能をほとんど有していないと考えられる。また、これと同時に、ニューロン新生の有無についても解析を行なったが新生の証拠は得られなかった。さらに、GABAアゴニスト投与によるネスチン陽性細胞の活性化が細胞分化に影響を与えるかどうかについても調べた。すると、細胞分裂は抑制され、成熟グリアへの分化促進は認められたものの、この場合でもニューロン新生は見られず、神経新生は起きていないと考えられた。

第2章では、「成体大脳新皮質ネスチン陽性細胞が脳梗塞を受けると興奮性GABA入力により活性化される。そして、その活性化によりネスチン陽性細胞からのBDNF放出が促進されて機能回復に貢献する。」という仮説を立て、光感受性物質のローズベンガルを用いた脳梗塞モデルマウスを作成し解析が進められた。まず、脳梗塞を受けてから4日目以降でBDNFを発現している

ネスチン陽性細胞が健常体と比較して数多く確認された。次に、フローサイトメトリーを用いてネスチン陽性細胞の BDNF 量を比較定量した。すると、梗塞部位周囲においては健常側と比較してネスチン陽性細胞からの BDNF の発現が上昇する事が確かめられた。次に、この上昇が GABA 依存的かどうかを調べるためネスチン陽性細胞内の NKCC1 トランスポーターに着目した。そして、阻害剤である bumetanide を脳梗塞後に投与したところ、ネスチン陽性細胞からの BDNF の発現が減少した。この GABA シグナル増強による BDNF の増加が脳梗塞後の機能回復に貢献しているのではないかと考え、運動感覚機能回復に関する行動実験を行なわれた。すると、bumetanide の投与により感覚機能回復の遅れが見られた。

第3章では、前章の結果を受け、次に BDNF などの神経栄養因子が回復に与える影響を解析された。大脳新皮質のニューロンでは BDNF と NT-3 に対するレセプターの発現が過去に報告されているため、これら2つの因子について解析を行なわれた。そして、これら因子の働きを脳梗塞後に抑制すると、BDNF 抑制時には変化は無かったが、NT-3 の抑制時には感覚機能の回復に遅れが見られ、BDNF ではなく NT-3 が回復に貢献している事が示唆された。しかし、これは前章の結果と矛盾する。そのため BDNF 抑制分を補うメカニズムがあるのではないかと考え、脳梗塞後に見られる CREB のリン酸化に着目した実験が実施された。すると、梗塞後では、BDNF 抑制時にはリン酸化が促進され、NT-3 抑制時にはリン酸化が抑制される事が分かり、この違いが行動回復の変化に現れたのではないかと示唆された。

本論文では、成体大脳新皮質のネスチン陽性細胞がグリア細胞の性質を保有し、分裂後もそのまま残る事を示した。また、この細胞は脳梗塞後、興奮性 GABA 刺激を受けて神経栄養因子 BDNF の産生を促し、梗塞後の感覚機能の回復に寄与する事が分かった。この結果を受け、神経栄養因子の回復への影響を調べたところ、BDNF ではなく NT-3 阻害で回復の抑制が見られたが、これは CREB リン酸化の違いが関与しているためだと考えられた。以上、本論文は、脳梗塞後の機能回復における神経栄養因子の役割を明らかにした点で、神経再生治療法の開発に道を拓くものである。

なお本論文の内容は、戸塚祐介、高田徹夫、嶋津直行、松村直人、太田綾、および久恒辰博との共同研究である。しかしながら、論文に記した諸データは、論文提出者が主体となって分析及び検証を行った結果得られたものである。したがって、本研究において論文提出者の寄与は十分であると判断される。以上より、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。