The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	A new three-dimensional axonal outgrowth assay for central nervous system regeneration.
Author(s)	石原, 正浩
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34317
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	石原　正浩
論文題名 Title	A new three-dimensional axonal outgrowth assay for central nervous system regeneration. （中枢神経再生に対する新たな3次元軸索伸長評価系の開発）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

脊髄の神経線維のほとんどが断裂される完全麻痺になった脊髄損傷は重篤な外傷であり、ほとんど運動機能が改善しないことが知られている。完全脊髄損傷に対する細胞移植療法の動物実験モデルとして、①脊髄を切断しギャップを形成する②ギャップに移植細胞を含有したマトリゲルを注入する。③神経軸索伸長効果を測定するというラット脊髄離断モデルがしばしば用いられる。しかし、この方法では評価に4-8週程度の長時間かかることからより短期間に神経軸索伸長効果を評価できる方法が望まれる。

そこで、ラット感覚運動野大脳皮質スライスと移植細胞を含有したマトリゲルを共培養することにより、ラット脊髄離断モデルにおける細胞移植の環境と類似の環境を作成し作成できると推測した。この大脳皮質スライスーマトリゲル共培養系を用いて神経軸索伸長効果と細胞間相互作用を3次元的に容易にスクリーニングできる軸索評価系を開発することを目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

移植候補細胞1.0×10^4個の細胞を10μlのマトリゲルに混合し、ミリセル上に4-5mm×6-7mmの長方形に形成して留置した。3日間培養後、生後3日目Sprague-Dawleyラット(SDラット)の400μmの大脳皮質スライスを作成し、マトリゲルの長径に接するように留置し、以後7日間共培養した。培養後、各種免疫染色を施行した。軸索伸長促進効果を観測するため、神経軸索のマーカーであるNuerofilament-Lにて免疫染色した標本を蛍光顕微鏡を用いて2μmで撮影した。得られた画像は、2次元に圧縮し、撮影画像を融合した。マトリゲルと大脳皮質スライスの境界線を基準線とし、基準線から500μm, 1000μm, 1500μm, 2000μmの距離を通過する軸索の本数をカウントした。

まず、神経軸索がマトリゲル側に伸長するのかを検討するために、移植細胞を含まないマトリゲルと大脳皮質スライスとを共培養し、免疫染色した。マトリゲルに神経軸索は継時的に伸長することを確認した。神経細胞体、アストロサイト、オリゴデンドロサイトもマトリゲル側に遊走することが分かった。次に、移植細胞による軸索伸長効果の測定が可能であるか判定するために、Positive controlとして軸索伸長促進効果が知られているシュワン細胞、Negative controlとして軸索阻害作用があると知られている繊維芽細胞のCell lineである3T3細胞を移植し、細胞なしコントロールと比較した。コントロール群では123.9±17.8(500μm), 37.0±13.9(1000μm), 6.8±2.8(1500μm), 1.4±1.0(2000μm)本カウントされた。一方、シュワン細胞群では、196.1±25.6(500μm), 92.1±17.4(1000μm), 45.4±10.6(1500μm), 18.1±5.1(2000μm)本伸長し、1500, 2000μmにおいてコントロール群に対して有意に測定本数が多かった。一方3T3細胞群では35.5±9.4(500μm), 0.0±0.0(1000μm), 0.0±0.0(1500μm), 0.0±0.0(2000μm)であり、500μmにおいてコントロール群に比べ有意に測定本数が少なかった。以上から、シュワン細胞は軸索伸長促進効果を認め、一方,3T3細胞は軸索伸長阻害効果を認めた。また、シュワン細胞の免疫染色を観察すると、大脳皮質スライスを共培養すると、シュワン細胞は、伸長軸索の進行方向に沿って配列されることを確認した。このように大脳皮質由来神経軸索と移植細胞との細胞間相互作用を確認した。

〔総　括(Conclusion)〕

大脳皮質ーマトリゲル共培養系の3次元的軸索伸長評価系としての有用性を検討した。同培養系により、移植細胞による神経軸索伸長再生能の評価のみならず、神経軸索と移植細胞との細胞間相互作用を評価することができた。本実験を通して、中枢神経再生における3次元軸索伸長評価系が確立された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）石原　正浩

		（職）	氏　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	吉峰俊樹
	副　査	大阪大学教授	望月秀樹
	副　査	大阪大学教授	山下俊英

論文審査の結果の要旨

脊髄の神経線維のほとんどが断裂される完全麻痺になった脊髄損傷は重篤な神経外傷である。完全脊髄損傷に対する細胞移植療法の動物実験モデルとしてよく用いられるラット脊髄離断モデルを用いると神経軸索伸長の評価に通常4-8週程度の長時間かかることが知られている。今回開発された大脳皮質―マトリゲル共培養系を用いた3次元神経軸索伸長評価系を用いることにより、このラット脊髄離断モデルでの移植細胞と神経軸索と類似の環境を再現できかつ10日程度で軸索伸長効果を観測することができた。また、移植細胞による神経軸索伸長再生能の評価のみなず、神経軸索と移植細胞との細胞間相互作用や神経栄養因子による影響をも評価することができた。本実験を通して、中枢神経再生における新規3次元軸索伸長評価系が確立されたと考える。博士（医学）の学位授与に値する。