

Title	Nestin-EGFP Transgenic Mice : Visualization of the Self-Renewal and Multipotency of CNS Stem Cells
Author(s)	川口, 綾乃
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43811">https://hdl.handle.net/11094/43811</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	川口綾乃
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第16904号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Nestin-EGFP Transgenic Mice: Visualization of the Self-Renewal and Multipotency of CNS Stem Cells (ネスチン-EGFP トランスジェニックマウス：中枢神経系神経幹細胞の自己複製能と多分化能の可視化)
論文審査委員	(主査) 教授 田野 保雄  (副査) 教授 不二門 尚 教授 竹田 潤二

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

哺乳類発生過程において、幹細胞は種々の分化した細胞を産生することにより組織形成および器官形成に重要な役割を果たしている。その研究のためには幹細胞を予期的に分離同定することが重要である。しかし中枢神経系においては、造血系で同定されているような、幹細胞特異的表面抗原が同定されていないため、従来その予期的同定は困難であった。この問題を克服するため、神経系前駆細胞により強い発現を誘導することが期待される、中間径フィラメントの一種ネスチンの遺伝子のエンハンサーの制御下に、レポーターとしてGFP (green fluorescent protein) を発現するトランスジェニックマウスを作製し、FACS (fluorescence-activated cell sorting) による神経幹細胞の分離・同定を試みた。

#### 【方法並びに成績】

まず胎生期大脳におけるGFPの発現を組織学的、免疫細胞化学的に検討した。未分化な細胞が存在することが知られている脳室帯においてより強い蛍光強度を認め、これらの細胞ではニューロン、グリアの各分化マーカーが陰性であり、より未分化な前駆細胞にGFPがより強く発現していることが明らかとなった。

さらにより定量的にGFPの蛍光強度と神経幹細胞の性質が相関するかを検討するため、FACSにより分取した細胞を用いて解析した。

BrdU (プロモデオキシウリジン) を生体に投与された胎生14日マウス大脳由来の細胞をGFP蛍光強度に応じてFACSにより分画したところ、GFP強陽性群ではBrdUの取り込み率が高く、GFP強陽性の細胞は生体内でより活発に分裂していることが明らかになった。

神経幹細胞をFGF2あるいはEGFの存在下で浮遊培養すると、分裂増殖し、球形の細胞塊であるニューロスフェアを形成することが知られており、神経幹細胞の選択的培養法として用いられている。そこでFACSにより分画した細胞をこれら増殖因子の存在下で浮遊培養し、GFPの蛍光強度と生じるニューロスフェアの頻度との相関を検討した。1週間の培養によりGFPの蛍光で光るニューロスフェアが形成され、その形成頻度はGFP強陽性の分画では陰性の分画に比較し42.1倍であった。さらに形成されたニューロスフェアを接着性のプレートに移し増殖因子を除去し血清を加えた培地で培養し分化させた。分化した細胞ではGFPの蛍光は消退し、免疫染色によりニューロン、

オリゴデンドロサイト、アストロサイトのマーカー陽性の細胞を認め、分裂してニューロスフェアを形成したものの細胞が多分化能を有することが証明された。GFP 強陽性の分画から生じたニューロスフェアを長期継代し、3ヶ月後において同様の分化アッセイを行ったところ、長期に渡る多分化能を維持していることが明らかになった。これら一連の実験から、GFP 強陽性の細胞の多くは、多分化能および自己複製能を有する、すなわち神経幹細胞であることが証明された。

次に成体マウスにおける GFP の発現と細胞特性についての検討を行った。

組織学的解析では、側脳室周囲から脊髄中心管にいたる全脳室周囲領域に GFP の発現を認めた。しかし脳室上衣細胞での GFP の発現パターンは弱陽性から強陽性まで不均一であった。過去の報告から、成体での神経幹細胞は分裂周期が長いことが知られているため、成体マウスに低濃度 BrdU を長期に渡り投与し、この分裂周期の長い細胞をラベルした。脳室下帯に存在する GFP 弱陽性細胞が BrdU でラベルされ、一方短期 BrdU 投与によりラベルされる分裂周期の早い細胞は GFP 陰性であった。これらの解析により、成体の中枢神経系における GFP の発現部位は、神経幹細胞あるいは神経系前駆細胞が成体で存在しているであろうと従来報告されている部位とほぼ一致していることが明らかとなった。

続いて成体の側脳室周囲領域由来の細胞を用い、FACS により GFP の蛍光強度とニューロスフェアの形成能の相関を調べた。

GFP 陰性の分画からニューロスフェアの形成は認めなかったが、GFP 弱陽性の分画からは GFP 強陽性の分画よりも高頻度でニューロスフェアの形成を認めた。しかし興味深いことに、この培養過程において GFP 弱陽性であった細胞は蛍光強度を獲得し、結果として生じた光るニューロスフェアは、胎生期由来の細胞から形成されたものと同様の細胞生物学的特性を示すことが明らかとなった。

#### 【総括】

このトランスジェニックマウスは従って、神経幹細胞濃縮のための新しいソースであり、かつ胎生期生体内、および胎児・成体由来の培養細胞において、神経幹細胞としての特質が可視化される。本マウスは今後の自己複製や分化を制御する分子メカニズムの解明、および生体内環境での神経幹細胞の生物学的解析に貢献する有効な研究道具となりうる。

#### 論文審査の結果の要旨

本論文では、中枢神経系神経幹細胞の可視化を目的として、蛍光タンパクをレポーターとして発現するトランスジェニックマウスを作成し、種々の培養法を用いて、中枢神経系における蛍光強度と細胞特性との相関を厳密に検討している。

本論文は、現時点で未だ困難であるほ乳類胎生期中枢神経系神経幹細胞の同定と分離に関わる、さきがけ的な研究報告であり、本論文の中で用いられた方法論は、今後の神経幹細胞研究に寄与することが期待される。以上の理由から学位の授与に値すると考えられる。