



Title	Flow Cytometric Analysis of Neural Stem Cells in the Developing and Adult Mouse Brain
Author(s)	村山, 綾子
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43846
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、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

氏 名	むら やま あや こ 村 山 綾 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 5 7 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学 位 論 文 名	Flow Cytometric Analysis of Neural Stem Cells in the Developing and Adult Mouse Brain (フローサイトメトリーによる神経幹細胞の解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 内山 安男 (副査) 教 授 宮崎 純一 教 授 遠山 正彌

論 文 内 容 の 要 旨

(目的)

近年、神経幹細胞の様々な性状が明らかになってきているが、いまだ予見的に神経幹細胞を同定することは不可能である。しかし、神経幹細胞の予見的な同定が可能となれば、時間的・空間的に神経系の細胞分化を制御している機構の解明に大いに貢献すると考えられる。本研究では、神経幹細胞の予見的な同定を可能にするために、フローサイトメトリーを用いて、発生段階を追った神経幹細胞の性状解析を行った。

(方法ならびに成績)

細胞の大きさおよび細胞内構造の複雑さによる神経幹細胞の物理的性状解析神経幹細胞が終生存在するといわれている線条体脳室下帯にある細胞に注目し、フローサイトメーターを用いて、各発生段階にある神経幹細胞の性状解析を行った。細胞に当たったレーザーの前方散乱光 (FSC)/側方散乱光 (SSC) を測定することにより、細胞の大きさと細胞の内部構造の複雑さをそれぞれ測定することができる。これら 2 つのパラメーター (FSC/SSC) の展開図をもとに細胞を 7 つの分画に分け、それぞれの細胞群の **neurosphere** 形成能アッセイを行い、どの分画に **neurosphere** を形成するような神経幹細胞が存在するのかを調べた。**neurosphere** 形成能アッセイとは、神経幹細胞の選択的培養法を用いて、神経幹細胞の持つべき 2 つの性質である“細胞の自己複製能”と“分化能”を測定する試験法である。胎児期では主に **FSC^{high}** 分画に神経幹細胞が存在し、神経発生が進んだ出生直後には **FSC^{low}/SSC^{high}** の分画にも存在するようになることが明らかになった。また、どの発生段階においても **FSC^{high}/SSC^{low}** 分画を採取することによって、神経幹細胞を濃縮することができることが示唆された。

nestin-EGFP トランスジェニックマウスを用いた FSC/SSC 展開図における各細胞群の解析

当研究室で作製した *nestin*-EGFP トランスジェニックマウス (Kawaguchi et al., 2001) 由来の線条体細胞を用いて、FCS/SSC 展開図中の各細胞群の性状解析を行った。*nestin*-EGFP トランスジェニックマウスは、*nestin* 遺伝子第 2 インترون内にあるエンハンサーに制御されて EGFP (enhanced green fluorescent protein) が発現しており、

神経系の未分化な細胞を可視化できるマウスである。このマウス由来細胞の *nestin*-EGFP 発現強度は3つに分けられ(陰性、弱陽性、強陽性)、発現強度の高い細胞分画ほど未分化な細胞を含むことが報告されている(Kawaguchi et al., 2001)。FSC/SSC 展開図の各分画内の細胞の *nestin*-EGFP 発現強度分布を調べると、neurosphere 形成能が高い FSC^{mid/high}/SSC^{low} の各分画には *nestin*-EGFP 強陽性の未分化な細胞が多く含まれ、FSC^{low}/SSC^{high} 内の EGFP 強陽性の細胞は神経発生後期に上昇し、神経幹細胞が含まれる割合が高くなっていることを示唆していた。この結果は neurosphere 形成能アッセイの結果と非常によく一致していた。また、胎児期の神経幹細胞は *nestin*-EGFP 最強陽性(上位 10%)細胞に 20%前後で濃縮されることが報告されている(Kawaguchi et al., 2001)が、これらの細胞は FSC^{high} に集約されており、ここに神経幹細胞が濃縮されているということが確認された。

中枢神経系 SP の解析

近年、造血系において、Hoechst33342 の排出能力の高い細胞集団(SP; Side Population)として幹細胞を単離できることが報告された(Goodell et al., 1996)。SP 細胞とは Hoechst33342 の排出能力の高い細胞集団であり、他の臓器でも幹細胞を濃縮することが報告されている(Gussoni et al., 1999; Seale et al., 2000)。そこで、中枢神経系にも SP が存在することを確認、FCS/SSC 展開図を用いて SP 細胞の性状解析を行った。SP 細胞群は主に直径 10 μ m 前後の比較的小さな細胞であり、これは FSC^{high} や *nestin*-EGFP 最強陽性(上位 10%)の細胞は全く含まないことが明らかになった。発生期の SP 細胞をソーティングし、種々の分子マーカーの発現を調べた結果、Notch1 陽性の未分化な細胞は高頻度で濃縮されたが、神経幹細胞以外の細胞も多く含む集団であることがわかった。一方、成体脳 SP は神経幹細胞分画(>12 μ m CD24^{low}/PNA^{low})と高頻度で一致した。

(総括)

本研究によって、神経幹細胞は単一集団ではなく、様々な様相を呈することが示唆された。また、発生を追って神経幹細胞の性状は変化することが示唆された。本研究において明らかになった神経幹細胞の性質は、今後、神経幹細胞の単離方法の確立や、神経幹細胞の自己複製や分化の機構解明に貢献するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

神経系の細胞系譜中の各発生段階にある幹細胞・前駆細胞は、神経系の細胞分化の制御機構の研究をする上で重要な細胞種である。しかし、これら細胞の簡便な分離・同定法は未だ確立されていない。本論文は、フローサイトメトリーを用いて神経幹細胞の簡便な同定・単離を可能にするパラメーターを探索した研究である。

前方散乱光(FSC、細胞の大きさ)/側方散乱光(SSC、内部構造の複雑さ)をパラメーターとして、線条体脳室下帯より得た細胞群をフローサイトメトリーで展開したところ、細胞は7つの分画に分類でき、各分画中の細胞数の割合は、神経発生進行に伴い変化することが分かった。次に、*nestin*-EGFP トランスジェニックマウスを用いて同様の解析を行った結果、FSC^{mid/high}/SSC^{low} 分画の細胞は *nestin*-EGFP 強陽性を示す未分化な細胞が多く含まれること、神経発生後期には FSC^{low}/SSC^{high} 分画での EGFP 強陽性細胞の割合が上昇して、異なる物理的性状を示す神経幹細胞が出現することが明らかになった。この結果は、各分画内細胞数の割合の変化から予測された結果と一致していた。さらに、各分画について neurosphere 形成能アッセイを行い、神経幹細胞の割合を調べた結果、物理的性状の異なる複数の分画にわたって神経幹細胞が存在すること、また、どの発生段階においても直径 20 μ m 前後の細胞集団に神経幹細胞が濃縮されることが明らかになった。

次に、造血系の幹細胞は、Hoechst33342 排出能力の高い細胞集団(SP)として単離できる事実に基づき、中枢神経系における SP の性状を検討した。その結果、中枢神経系にも SP が存在すること、FCS/SSC 展開すると、SP 細胞群は主に直径 10 μ m 前後の比較的小さな細胞であり、*nestin*-EGFP 最強陽性の細胞は全く含まないこと、さらに、SP 細胞群を神経系の各分子マーカーで調べると、神経発生期の SP はヘテロな細胞集団であることが明らかになった。一方、成体脳 SP は、既知の神経幹細胞分画(>12 μ m CD24^{low}/PNA^{low})と高頻度で一致したことから、SP の分取

は成体脳からの神経幹細胞の濃縮には有効な手段となり得ることが示唆された。

本研究により、神経幹細胞は単一集団ではなく様々な様相を呈すること、また、発生が進むに連れ、神経幹細胞の性状が変化することが示唆された。これらの結果は、今後、神経幹細胞の単離方法の確立や神経幹細胞の自己複製・分化の機構の解明に貢献するものと考えられ、学位授与に値する。