

Title	Conversion of mammalian Muller glial cells into a neuronal lineage by in vitro aggregate-culture
Author(s)	久保田, 享
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47352
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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	くぼた あきら 久保田 享
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 20989 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Conversion of mammalian Müller glial cells into a neuronal lineage by in vitro aggregate-culture (インビトロの凝集培養による哺乳類ミュラー細胞のニューロンへの再分化)
論文審査委員	(主査) 教授 田野 保雄 (副査) 教授 仲野 徹 教授 片山 一朗

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

網膜は光を感じる中枢神経系の組織であり、組織学的に 10 層に分けられる。光は眼内に入ると、まず 9 層目の視細胞が光を感知してその信号を脳内へと伝達し光を感じているので、この視細胞が障害を受けると光を感じることができずに視力低下や視野狭窄を来たしてしまう。網膜変性疾患のひとつである網膜色素変性症は、失明に至る重篤な疾患であるにもかかわらず現在有効な治療法が存在しないが、組織学的には視細胞以外の細胞は比較的保たれていることがわかっている。これまで神経幹細胞は一度グリア細胞に分化するとニューロンへと再分化することはできないと考えられていたが、近年脳のグリア細胞であるアストロサイトがインビトロで凝集培養をするとニューロンへと再分化可能であるということが報告されたり、インビボでラットの硝子体に神経毒性のある薬剤を注入すると、網膜のグリア細胞であるミュラー細胞が活性化して網膜の種々のニューロンへと再分化するということが報告されるなど、ミュラー細胞が網膜のニューロンのプロジェニター細胞としての役割を持っていることが示唆されてきた。グリア細胞は、少量でも培養が可能のため、効率よく目的とするニューロンへと分化誘導が可能であれば、視細胞再生のセルソースとして利用可能であり、さらに自己の組織を利用すれば拒絶反応の可能性もないので理想的である。そこで我々は障害を受けた視細胞の再生医療の実現のため、インビトロでのミュラー細胞からニューロンへの分化誘導法の確立を目的として本実験を行った。

〔 方 法 〕

2 週齢のロングエバン斯拉ットの網膜をパパインとコラゲナーゼで処理した後に培養皿に播種し、37°C、5%CO₂、培地に血清を含む条件下でミュラー細胞を濃縮培養した。コンフルエントになったミュラー細胞を、血清を含まない培地で親水性のポリマーでコーティングした非接着性の培養皿に継代し、ニューロスフェア様の細胞の凝集塊を形成させた。5 日間培養した後、凝集細胞をニューロンへと分化させるためにオルニチン・ラミンでコーティングした接着性のチャンバースライドに移して、さらに 7 日間培養した。その際、ニューロンへの分化を促進するために血小板由来増殖因子やバルプロ酸を添加した。細胞を固定した後、初期ニューロンのマーカーであるベータ III チューブリン

ンとダブルコルチンの抗体で免疫染色を行った。次に、細胞を網膜特異的な環境におくこと目的としてグリーンフルオレセンスプロテイントランスジェニックラットのミュラー細胞を凝集培養したのち通常のロングエバンスラットの網膜下に移植した。1週間後に切片を作製し視細胞特異的のマーカであるオプシンの発現を調べた。最後に、8歳のサルに網膜を用いてラットと同様にインビトロでの凝集培養と血小板由来増殖因子・バルプロ酸を添加してニューロンへの分化誘導を行い、ベータIIIチューブリンの発現を調べた。

[成 績]

ラットミュラー細胞は、非接着性培養皿で凝集培養を行うことによって、網膜のプロジェニター細胞のマーカであるネスチンを発現するようになった。接着性のチャンバースライドに移すだけでは、幼弱なニューロンのマーカであるベータIIIチューブリンやダブルコルチンの発現は見られなかったが、血小板由来増殖因子を添加するとそれらの発現が見られるようになり、血小板由来増殖因子とバルプロ酸の両方を添加するとさらにその発現率が増加した。しかし、インビトロの系では、視細胞特異的のマーカであるオプシンの発現までは見られなかった。ラットの網膜下への移植実験では、通常の培養をしたミュラー細胞ではオプシンの発現は見られなかったが、凝集培養したミュラー細胞ではオプシンを発現するようになった。最後に、8歳のサルにミュラー細胞を用いた実験でも同様に凝集したスフェアを形成し、分化を誘導するとベータIIIチューブリンの発現が確認された。

[総 括]

網膜のグリア細胞であるミュラー細胞は、インビトロでの凝集培養と神経分化誘導因子である血小板由来増殖因子およびバルプロ酸の組み合わせによって、効率よくニューロンへ分化させることができた。さらに凝集培養したミュラー細胞は、網膜に特異的な環境である網膜下へ移植することにより視細胞のマーカであるオプシンを発現することが分かった。網膜の構造がよりヒトに近いサルにミュラー細胞でも、インビトロの実験ではラット同様に、ニューロンへと分化可能であることがわかった。以上のことより、ミュラー細胞が視細胞再生のセルソースとして利用可能であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究において証明された、網膜のミュラーグリア細胞からニューロンへの再分化させるという方法は、これまで一度ある系統の細胞に分化すると他の系統の細胞には分化できないと考えられていたため、正確な研究がおこなわれていなかった。この欠を埋め、ミュラーグリア細胞からニューロンへの分化誘導方法に関する知見を得ることが本研究の第一目的であったが、効率のよいニューロンへの分化誘導方法が記載され、この目的を十二分に達成している。

この他、多くの新知見を得ているが、凝集培養したミュラー細胞を網膜下に移植すると視細胞に分化するという可能性の指摘は特に重要である。視細胞のマーカを発現した細胞の機能的な解析がない点が惜まれるものの、網膜特異的な環境で分化させることの重要性に基本的知見を与えた貢献は、極めて重要である。

また、網膜の構造がより人間に近いサルにミュラー細胞を用いても同様にニューロンへの分化が可能であり人間においても実現性が高いという結論は、網膜色素変性症などの疾患に対してミュラー細胞をセルソースとした視細胞移植が可能であるという結論と一致しており、重要な発見である。

よって、著者は博士（医学）の学位授与に値する。