



Title	Improvement in protocol to generate homogeneous glutamatergic neurons from mouse embryonic stem cells reduced apoptosis
Author(s)	藤木, 亮輔
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59718
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	藤 木 亮 輔
博士の専攻分野の名称	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	第 2 5 8 7 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 25 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体生理医学専攻
学 位 論 文 名	Improvement in protocol to generate homogeneous glutamatergic neurons from mouse embryonic stem cells reduced apoptosis (胚性幹細胞から均質グルタミン酸産生ニューロンを得る方法に改良を加えることでアポトーシスが減少した)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 山下 俊英 (副査) 教 授 金井 好克 教 授 島田 昌一

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的(Purpose)〕

均質な1種類の神経細胞を大量に得ることは、初代培養は無論、胚性幹細胞（ES細胞）から神経へと分化させる系を用いてでもとても難しいことであった。最近、レチノイン酸で処理した胚様体を基にしたES細胞分化培養系が確立され、それが可能となった。最終的に得られる神経は90-95%純度の均質なグルタミン酸産生大脳皮質錐体神経で、現存するグルタミン酸産生神経培養系では最高純度を示す。ほとんど全て原法通りの条件の下、我々の手で本系の再現を試みたところ、純度の観点からは再現性は高かったものの、得られた神経が2週間以上生存しない問題に直面した。我々が行っている軸索輸送、シナプス伝達、樹状突起の分枝等の研究では低密度長期培養が必須であるため、神経生存を延長させる様々な打開策を模索した。その過程で開発したグルタミン酸産生神経の高い純度を低下させることなく、最も著しく神経生存延長効果をもたらした改良法をここで報告する。

〔 方法ならびに成績(Methods/Results)〕

我々は原法でも推奨されている通り、胚様体解離直後に得られた神経幹細胞（NPC）を一旦凍結保存し、それを解凍・播種することで全ての実験を行った。なお、本系では播いたNPCは大部分48時間以内にグルタミン酸産生神経へと分化するよう既にレチノイン酸で強力に誘導されている。解凍直後のNPCを播いて2日間のNPC用培地は原法通りN2培地（NM）を使用し、グルタミン酸産生神経用培地を原法のComplete培地（CM）から市販のグリア培養上清含有神経培養用培地（SBM）へと変更することで目視上、著しい神経生存延長効果が得られた。そこで播種6日目のアポトーシスをマーカーである

抗活性化カスパーゼ抗体を用いた免疫細胞染色法（ICC）で確認したところ、陽性神経の割合は60%から20%へと著しく低下していた。少なくとも播種3週間後までは神経が健全であることを確認し、SBMに著しい生存延長効果があることを実証した。一方で、SBMはグリア培養上清を含有し、理論的には非神経細胞が増殖し、純度が低下する懸念があったため、原法通り播種7日目に純度をグルタミン酸産生神経マーカーである抗VGLUT1抗体を用いたICCで確認した。その結果、純度は98%以上とむしろ原法以上であり、懸念は払拭された。

次に、SBMの生存延長効果の主要因子を同定する目的で、代表的神経栄養因子である脳由来神経栄養因子（BDNF）や塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）をそれと想定し、原法通りのNMやCMに濃度や時間を違えて培地に添加することで神経の生存が延長するかを播種6-7日目に抗活性化カスパーゼ抗体を用いたICCで確認した。BDNF添加実験ではNPC播種直後、24、48時間後にそれぞれ1-100 ng/ml、50 ng/ml、50 ng/ml添加したものの、神経の生存延長効果は全く認めなかった。bFGF添加実験ではNPC播種直後に1.3 ng/ml - 1.3 μ g/ml添加したところ、容量依存性に非神経細胞の著しい増殖が見られた一方で、神経の生存延長効果は全く見られなかった。非神経細胞増殖を防ぐ目的で、NPCが神経に分化するのを待ち、播種48時間後に2 ng/ml - 1 μ g/mlのbFGFを添加したところ、非神経細胞の増殖は著しく減弱したものの、依然神経の生存延長効果は全く認めなかった。これらの結果により著しい神経の生存延長効果をもたらすSBMの主要因子はBDNFやbFGFではないことが示唆された。

〔総括(Conclusion)〕

我々は均質なグルタミン酸産生神経が得られるES細胞分化培養系の原法に、神経用培地をCMからSBMに変更することで高い純度を維持したまま著しい神経の生存延長効果をもたらすことに成功した。

SBMの神経生存延長効果をもたらした主要因子はBDNFやbFGFではなかった。

論文審査の結果の要旨

最近、他グループが確立した胚性幹細胞分化培養系によって均質（90-95%純度）グルタミン酸産生神経を大量に得ることが可能となった。ほとんど全て原法通りの条件の下、本系の再現を試みたところ、純度の観点からは再現性は高かったものの、得られた神経が2週間以上生存しない問題に直面した。本論文では神経生存を延長させるために講じた様々な打開策のうち、高い純度を低下させることなく、最も著効した簡便な方法を報告した。具体的には原法でのグルタミン酸産生神経用培地Complete培地を市販のグリア培養上清含有神経培養用培地へと変更することで健全な神経の培養を少なくとも3週間以上維持できた。この神経生存延長効果をもたらした主要因子は脳由来神経栄養因子や塩基性線維芽細胞成長因子ではないことも確認した。本論文は神経生存期間の観点で原法の再現が困難な場合に著しい生存延長効果をもたらす最初の改良報告で学位の授与に値すると思われる。