



Title	Postsynaptic structure formation of human iPS cell-derived neurons takes longer than presynaptic formation during neural differentiation in vitro
Author(s)	東郷, 一行
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/87881
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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	東郷 一行
論文題名 Title	Postsynaptic structure formation of human iPS cell-derived neurons takes longer than presynaptic formation during neural differentiation in vitro (ヒトiPS細胞由来神経細胞の体外での神経分化でのシナプス形成ではシナプス後構造の形成に時間がかかる)
論文内容の要旨	
<p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>ヒトiPS細胞由来神経細胞が形成するシナプスは、ヒトシナプスの生理研究や疾患研究への応用が期待されているが、シナプス構造の形成過程に関する研究報告は少なく、詳細は不明である。そこでヒトiPS細胞由来神経細胞のシナプス形成過程と機能との関連性の解明を目的に本研究を実施した。</p>	
<p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>別々に確立した2種類のヒトiPS細胞を用い、dual SMAD inhibition法を用いて神経前駆細胞へ分化させた。分化させた神経前駆細胞をニューロスフェアの状態に維持・拡大培養し、均一な細胞集団を作成した。拡大培養を行った後の神経前駆細胞を神経細胞へ分化誘導し、その分化誘導過程においてRT-PCR法・免疫染色法・ウェスタンブロット法で発現解析を行い、微小電極アレイを用いて機能解析を行った。</p> <p>分化誘導に用いた神経前駆細胞は後脳腹側に近い局在マーカー発現を認め、分化誘導でVGLUT2陽性グルタミン酸作動性ニューロン主体の細胞集団に分化を認めた。この神経前駆細胞の段階で拡大培養してから神経細胞へ分化誘導させる手法について頑健性があることを多施設バリデーション試験でも確認を行った。分化過程でのRT-PCR法での遺伝子発現解析ではシナプス前マーカーおよびシナプス後マーカーは経時的に発現上昇を認め、これはウェスタンブロット法での蛋白発現解析でも同様の結果を認めた。免疫染色法による経時的解析ではシナプス前マーカーは経時的に発現上昇を認め、シナプス後マーカーについてもMAP2などの一部の発現は経時的に発現増加を認めた。しかし、PSD-95やドレブリンAなどのシナプス後マーカーの発現は異なり、PSD-95は経過を通じて検出できずドレブリンAは分化35日目以降で認めたもののわずかな発現にとどまった。これらの結果はシナプス後マーカーの一部については局在が不十分でありシナプス後構造が十分に形成されていないことを示唆された。この状態で電気生理学的評価を行うと、PSD-95・ドレブリンAが発現しているコントロールのラット由来細胞は電気活動を認めたのに対し、これらの発現に乏しいヒトiPS細胞由来神経細胞では電気活動が乏しかった。</p> <p>市販されているヒト成人RNAサンプルとヒトiPS細胞由来神経細胞分化48日目RNAサンプルを用いて遺伝子発現について比較するとシナプシン、シナプトフィジンといったシナプス前マーカー、PSD-95などのシナプス後マーカーは一貫した差は認めなかった。しかし、ドレブリン分画比でみると大脳皮質サンプルとはいずれのサンプルでも有意な差を認めた。</p> <p>このことからin vitroでのiPS由来神経細胞のシナプス形成はシナプス後マーカーであるドレブリンAとPSD-95がその機能性獲得の指標となる可能性があり、ドレブリンの分画比についてもその成熟性を表す指標となる可能性がある。</p>	
<p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>ヒトiPS細胞由来神経細胞のシナプス成熟に伴いアクチン結合蛋白質の1種のドレブリンAがシナプス後部に発現する他の主要分子に先駆けてシナプス部分に発現・集積し、機能的ヒトシナプス後構造形成の指標になり得ることを明らかにした。本研究で得られた成果は、ヒトシナプス成熟過程の客観的・定量的評価に応用可能であり、ヒトiPS細胞を用いたシナプス研究やシナプス機能障害を標的とした治療法開発の発展に貢献することが期待される。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 東郷 一行

		(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授	望月 秀樹
	副 査	大阪大学教授	片山 泰一
	副 査	大阪大学教授	早島 晴彦

論文審査の結果の要旨

ヒト人工多能性幹細胞から分化させた神経細胞で成熟シナプスを形成することは、シナプスの生理研究や疾患研究への応用が期待されている。しかし、どのようにシナプス構造が形成されるのかを示した報告はほとんどない。そこでシナプス形成過程での機能と構造の関連を明らかにすることを目的に本研究を計画した。本研究ではシナプス成熟に伴いドレブリンAというタンパク質がシナプス後部に発現する他の主要分子に先駆けてシナプス部分に発現・集積し機能的シナプス後構造形成の指標になりうることを明らかにした。経時的な解析ではmRNA・タンパク質発現レベル自体はシナプス前後で差はなかったものの、ドレブリンAやPSD-95などのシナプス後タンパク質のシナプス構造内への発現集積は遅れ、この状態ではシナプス活性も生じていないことがわかった。また今回の神経細胞分化法は多施設で一定の堅牢性と再現性を持つことが確認できた。本研究で得られた成果を用いることで、シナプス成熟をより客観的・定量的に評価することが可能となり生理学的・病理学的研究やシナプス機能障害を標的とした治療といったさらなる発展に貢献することが期待される。

博士（医学）の学位授与に値する。