

氏名(本籍)	さか ぐち まさ のり 坂 口 昌 徳 (熊本県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 3786 号		
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<b>A method for gene transfer, single isolation and in vitro assay for neural stem cells</b> (神経幹細胞に遺伝子を導入、単離し試験管内で研究する方法)		
主査	筑波大学教授	医学博士	大野 忠 雄
副査	筑波大学教授	博士(医学)	梶 正 幸
副査	筑波大学教授	医学博士	吉 田 薫
副査	筑波大学講師	医学博士	吉 澤 利 弘

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

神経幹細胞 (neural stem cell : NSC) は自己複製能と多分化能 (中枢神経系の主な系譜の細胞を産生する能力) を持つ細胞であるが, その自己複製の制御機構には不明な点が多い。NSC の研究ではニューロスフェア法が広く用いられるが, ニューロスフェアには NSC より分化の進んだ細胞も含まれるため, NSC に対する遺伝子や分子の影響を検討する実験では, ニューロスフェアを構成する細胞全体を用いた場合には, 結果の解釈や効率に問題が生じる。本研究は, まずこの問題を解決するため, 遺伝子を導入した NSC を選択的に単離してその機能を解析する方法を開発すること (第 1 章), 次に単離した NSC の自己複製における糖結合蛋白 Galectin-1 の機能を明らかにすること (第 2 章) を目的とした。

### (方法)

第 1 章: NSC への遺伝子導入にはレトロウイルスベクターを用い, 遺伝子導入細胞の標識は同ベクターに組み込んだ GFP の発現により行った。NSC のマーカーには抗 CD15 抗体を用いた。セルソーター (FACS) により, ニューロスフェアの中から, GFP/CD15 共陽性の細胞と GFP 陽性のみの細胞を単離し, それぞれのニューロスフェア形成効率を測定した。GFP/CD15 共陽性として単離された細胞の多分化能を検討するため, 形成されたニューロスフェアを分化に適した条件下で培養した後 neuron, astrocyte, oligodendrocyte に対する抗体で免疫染色を行った。

第 2 章: 新規 NSC 増殖因子の単離精製のため, OP9 細胞株培養上清の蛋白質発現差解析を行った。同定された Galectin-1 の NSC 自己複製への関与を, Galectin-1 の組み替え蛋白と中和抗体を用いて, in vitro で検定した。Galectin-1 の糖結合能が NSC に与える効果の判定には, 糖結合能を阻害する TDG や, 酸化による糖結合能の失活を防止した CS-Galectin-1 を用いた Galectin-1 の成体中枢神経系における発現は免疫染色法で, NSC における発現は BrdU 長期保持細胞染色法と Ara-C 投与による前駆細胞除去法で確認した。Galectin-1 の成体 NSC での機能は, 組換え Galectin-1 蛋白の成体

側脳室内投与により検討した。さらに、Galectin-1 KO マウスの NSC 数を正常マウスと比較した。

#### (結果と考察)

第1章： 抗 CD15 抗体と GFP 発現レトロウイルスベクターを用いてセルソーターにより単離した共陽性の細胞集団のニューロスフェア形成効率は、GFP 陽性の全細胞集団の約 5 倍であり、胎仔由来のニューロスフェアにおいても抗 CD15 抗体反応性を指標にして遺伝子導入 NSC を効率よく単離できることが示された。また、長期間の培養でも GFP 陽性細胞が見られ、ウイルスベクターのサイレンシングが起らずに NSC に遺伝子が導入されたことが示された。共陽性細胞由来のニューロスフェアに neuron, astrocyte, oligodendrocyte に対する抗体で免疫染色される細胞が観察され、単離された細胞が多分化能を有し、NSC の性質を持つことが示された。

第2章： 糖結合蛋白 Galectin-1 が、新規 NSC 増殖因子として同定され、NSC での高発現が認められた。ニューロスフェア形成を、組換え Galectin-1 蛋白は促進し、中和抗体は抑制した。TDG はニューロスフェア形成を抑制し、CS-Galectin-1 の効果は内在性 Galectin-1 と同等であった。これらの結果は、Galectin-1 の糖結合能が NSC 増殖に重要なことを示す。成体側脳室内 Galectin-1 投与で脳室周囲の NSC が増え、脳室周囲細胞からのニューロスフェア形成も増加した。Galectin-1 KO マウスで、側脳室周囲等で NSC 数が半減した。この結果は、Galectin-1 が成体 NSC の自己複製の促進因子であることを示す。Galectin-1 は NSC 周囲の血管内皮細胞に濃縮されており、これが内皮細胞由来の NSC 制御因子である可能性が示唆される。

#### (結論)

本研究は、遺伝子導入 NSC の単離・培養を、レトロウイルスベクターとセルソーターを組み合わせることで、効率よく行う方法を開発した。これにより、NSC を制御する遺伝子・分子やその機能を選択的に解析することが可能になった。また、新規 NSC 増殖因子として Galectin-1 が同定され、その糖鎖結合活性が NSC の自己複製に重要であることが明らかになった。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究で開発された方法は、遺伝子を導入された神経幹細胞 (NSC) を、従来の方法より効率よく、選択的に単離して研究対象とすることを可能にした点で高く評価できる。この方法により、多くの遺伝子の機能の迅速かつ正確な検定が容易となり、NSC における既知の分子の機能の解析や NSC に影響を与える因子の網羅的探索にも有用と考えられる。また、今回の Galectin-1 の機能に関する研究は、その糖鎖結合活性が NSC 自己複製に重要であることを初めて示したものである。これは、幹細胞の自己複製および組織再生機構の解明を目指す今後の研究への貢献が期待できる優れた研究である。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。