

氏 名	ひらつか だいし 平塚 大士
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 1 0 2 9 号
学位授与の日付	令和 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科 バイオテクノロジー専攻
学 位 論 文 題 目	Oligodendrogenesis in the medulla oblongata of adult mouse brain after demyelination (成体マウス延髄における脱髄時のオリゴデンドロサイト新生)
審 査 委 員	(主査)教授 宮田清司 教授 伊藤雅信 准教授 吉村亮一

論文内容の要旨

神経幹細胞は、自己複製能と多分化能を併せもった未分化な細胞であり、脳の胎生期や発育期には活発に増殖しているが、成体脳には存在しないと考えられてきた。これは、ニューロン説を提唱し神経科学の基礎を築き上げたノーベル賞受賞者・カハールが 1928 年の論文の中で「成体哺乳類の中枢神経系は損傷を受けると 2 度と再生しない」と結論して以来、この定説が 70 年にわたって影響を与えることになったからである。しかし、人を含む成体の哺乳類の脳には神経幹細胞が存在し、生涯にわたって新しい神経細胞を生み出していることが証明された。成体脳の神経幹細胞の機能は脳部位特異的である。例えば、海馬にある神経幹細胞は記憶や学習機能に関与し、側脳室下帯の神経幹細胞は嗅覚情報機能に関与していることが知られている。一方、側脳室下帯の神経幹細胞は、大脳皮質の損傷に応答し、新しい神経やグリア細胞を供給することが報告されている。さらに、近年これらの 2 部位に加えて延髄でも神経幹細胞が存在することが報告されている。延髄は、脳幹の一部であり、大脳や小脳と脊髄をつなぐ中継点に位置しており、呼吸中枢や循環器中枢など生命維持に必須の中枢神経が存在している。例えば、呼吸、嘔吐、嚥下、消化、心拍数の調節中枢が存在している。このため、延髄を損傷すると、肢体麻痺や呼吸不全などが起こり、生命を維持することが困難になる。オリゴデンドロサイトは、脳の神経軸索の周囲を幾重にも取り巻く髄鞘を形成している。髄鞘は電気抵抗が高く、結果的に神経インパルスは跳躍伝導により電気信号が伝わり、伝導速度を上げている。一方、オリゴデンドロサイトが消失し髄鞘がなくなる脱髄が起きると、伝導速度が著しく下がり運動障害など顕著な脳障害を引き起こす。本申請論文では、マウスの延髄に存在する神経幹細胞に着目し、脱髄後の延髄におけるオリゴデンドロサイト新生、即ちオリゴデンドロジェネシスについての研究をまとめた。

本申請論文は、序論、第 1 章「実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) モデルマウスにおける延髄神経幹細胞のオリゴデンドロジェネシスにおける役割」、第 2 章「Lysophosphatidylcholine (LPC) による局所脱髄刺激によるマウス延髄のオリゴデンドロジェネシスと Vascular endothelial growth factor (VEGF)/Platelet-derived growth factor (PDGF) シグナリングによるオリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte

progenitor cells; OPCs) の増殖制御」から構成されている。序論では、生体脳における神経幹細胞の運命決定と機能について概説している。次に、脳のオリゴデンドロサイトの自己免疫疾患である多発性硬化症について説明している。最後に、脳の髄鞘とオリゴデンドロジェネシスを解説している。第 1 章では、多発性硬化症の最もよく使用される動物モデルである EAE 誘発マウスを用いて、延髄の神経幹細胞が新しいオリゴデンドロサイトを供給していることを解説している。第 2 章では、延髄への LPC の局所注入後のオリゴデンドロサイトの新生と VEGF/PDGF 依存的な OPCs の増殖について解説している。

第 1 章では、申請者は多発性硬化症の動物モデルである EAE 誘発マウスを用いて、脱髄後のオリゴデンドロジェネシスについてチミジンアナログ Bromodeoxyuridine (BrdU) と Nestin-CreERT2/EGFP トランスジェニックマウスを用いた免疫組織化学により調べた。EAE 誘発による脱髄 20 と 50 日後、最後野のアストロサイト様神経幹細胞と中心管のタニサイト様神経幹細胞の増殖には変化がなかった。一方、OPCs の増殖は脱髄 20 日後には増加していたが、50 日後にはコントロールレベルまで戻っていた。一方、Nestin-CreERT2/EGFP トランスジェニックマウスを用いて、神経幹細胞由来の細胞分化を追跡すると、神経幹細胞由来の新しいオリゴデンドロサイトやアストロサイトの分化が確認された。しかし、細胞供給は多様であり、神経幹細胞由来のアストロサイト密度が高い部位はオリゴデンドロサイトの密度が低かった。一方、神経幹細胞由来のオリゴデンドロサイト密度が高い部位はオリゴデンドロサイトの密度は正常であった。以上の結果より、申請者は EAE 誘導の慢性的脱髄動物モデルでは、内在性の OPCs と共に神経幹細胞由来の細胞がオリゴデンドロジェネシスに関与する事を示した。

第 2 章では、申請者は LPC による舌下神経核の局所脱髄によるマウス延髄のオリゴデンドロジェネシスと VEGF/PDGF による OPCs の増殖制御について BrdU を用いた免疫組織化学により調べた。LPC 注入により延髄に脱髄が生じるが、数週間程度でオリゴデンドロジェネシスにより修復が行われていることが分かった。一方、損傷初期にはミクログリアが高密度で集積しているが、修復の進行に伴い密度は減少した。LPC による局所脱髄により最後野や中心管の神経幹細胞の増殖には変化がなかった。一方、脱髄部位における舌下神経核では顕著に OPCs の増殖が認められた。また、神経幹細胞由来のオリゴデンドロジェネシスは認められなかった。次に、VEGF 受容体阻害剤 AZD2171 あるいは PDGF 受容体阻害剤 STI57 は OPCs 増殖を阻害することを示した。以上の結果より、申請者は慢性的な脱髄と異なり軽微な脱髄では内在性 OPCs の分化・成熟で組織修復が可能で、神経幹細胞由来の細胞による修復は必要ないこと、および OPCs の増殖は VEGF/PDGF 依存的であることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

再生医療は、従来の治療方法で治すことが出来なかった疾病に対して有効な治療方法となる可能性がある。既に、神経幹細胞は人工多能性幹細胞から作製することが可能となっているが、外来性の神経幹細胞を移植しても必要となる本来の細胞に分化し、組織再生に寄与するかどうかは不明である。一方で、内在性の神経幹細胞は、決められた仕組みの中で細胞運命が決定されている。よって、内在性の神経幹細胞を人工的に操作することが出来れば、新しい再生医療への道が

開ける可能性がある。成体脳の延髄には、最後野にアストロサイト様神経幹細胞と中心管にタニサイト様神経幹細胞が存在している。しかし、これらの神経幹細胞が、延髄の損傷に応答して新しい細胞を供給する修復作用があるかどうかは明らかになっていない。本研究で、申請者はオリゴデンドロサイトが消失する慢性的脱髄モデルである EAE 誘導マウスと LPC による局所脱髄モデルを用いて、延髄におけるオリゴデンドロジェネシス、特に神経幹細胞の働きについて調べた。

第 1 章では、申請者は多発性硬化症の動物モデルである EAE 誘発マウスを用いて、オリゴデンドロジェネシスを調べた。EAE 誘発による脱髄では、最後野や中心管に存在する神経幹細胞の増殖には変化がなかったが、発症初期に OPCs 増殖が増加していた。一方、神経幹細胞由来の細胞分化運命追跡実験では、神経幹細胞由来の新しいオリゴデンドロサイトやアストロサイトの分化が観察された。以上の結果より、申請者は EAE 誘発の慢性的脱髄動物マウスでは、内在性の OPCs と神経幹細胞由来の細胞がオリゴデンドロジェネシスに関与する事を示し、延髄の神経幹細胞が組織修復機能を有していることを明らかにした。

第 2 章では、申請者は LPC による局所脱髄マウスモデルを用いてオリゴデンドロジェネシスを調べると共に、VEGF/PDGF による OPCs の増殖制御について調べた。LPC 局所注入による延髄の脱髄は EAE 誘発マウスと同様に最後野や中心管の神経幹細胞の増殖に影響を与えなかった。しかし、脱髄部位において顕著な OPCs 増殖が認められたが、これは神経幹細胞由来ではなかった。さらに、内在性 OPCs の増殖は VEGF/PDGF 依存的であることを明らかにした。以上の結果より、申請者は慢性的な脱髄と異なり軽微な脱髄では内在性の OPCs の分化・成熟で修復が可能で、神経幹細胞は慢性的で広範囲にわたる脱髄に反応して新しいオリゴデンドロサイトを供給することを明らかにした。

延髄は、脳幹の一部であり、大脳や小脳と脊髄をつなぐ中継点に位置しており、呼吸中枢や循環器中枢など生命維持に必須の中枢神経が存在している。このため、延髄を損傷すると、肢体麻痺や呼吸困難などが起こり、生命を維持することが困難になる。本研究の結果は、延髄の損傷時に神経幹細胞から新しい細胞が供給されることを始めて明らかにしたもので、学術的意義が非常に高い研究である。また、これらの研究は、医学的意義も大きく、延髄の神経幹細胞を人為的に制御することが出来れば延髄の損傷により肢体麻痺や呼吸困難となった脳疾病の治療方法の開発に貢献する可能性がある。

学位論文は、査読制度のある国際科学雑誌に掲載済みで申請者が筆頭著者である下記の論文 2 編を基礎としている。

[公表論文]

- 1) Daishi Hiratsuka, Eriko Furube, Katsutoshi Taguchi, Masaki Tanaka, Mitsuhiro Morita, Seiji Miyata. Remyelination in the medulla oblongata of adult mouse brain during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 319, pp. 41-54, 2018.
- 2) Daishi Hiratsuka, Erkin Kuruganov, Eriko Furube, Mitsuhiro Morita, Seiji Miyata. VEGF- and PDGF-dependent proliferation of oligodendrocyte progenitor cells in the medulla oblongata after LPC-induced focal demyelination. *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 332, pp. 176-186, 2019.

参考論文として、日本語による総説 1 編と国際科学雑誌に掲載された論文 1 編がある。

[参考論文]

- 1) 平塚大士・宮田清司「総説；延髄の神経幹細胞による髄鞘修復」 BIO Clinica 5月号「特集：免疫性神経疾患の治療学(国立精神・神経医療研究センター・山村隆編)」 Vol. 34, pp. 72-76, 2019.
- 2) Fukushima S, Kurganov E, Hiratsuka D, Miyata S. Effect of fluoxetine on proliferation and/or survival of microglia and oligodendrocyte progenitor cells in the fornix and corpus callosum of the mouse brain. Pharmacological Reports, Vol. 72, pp. 340-349, 2020.)