



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	乙第1923号
学位記番号	論第1679号
氏名	荻野 崇
授与年月日	令和5年3月24日
学位論文の題名	Characterization of Multiciliated Ependymal Cells That Emerge in the Neurogenic Niche of the Aged Zebrafish Brain (老齡ゼブラフィッシュ脳のニューロン新生領域において出現する多繊毛を持つ上衣細胞の同定) The Journal of Comparative Neurology, 524:2982-2992 (2016)
論文審査担当者	主査： 齊藤 貴志 副査： 飛田 秀樹, 松川 則之

論文内容の要旨

哺乳類においては、発生期脳の脳室壁は神経幹細胞である放射状グリアによって覆われている。放射状グリアは分裂・分化によって、活発にニューロンを産生する。生後になると、脳室壁全域で起こっていたニューロン新生は、脳室下帯や海馬といった、一部の脳室周囲領域だけに限られるようになる。また、出生の直後に、放射状グリアは成体における神経幹細胞であるアストロサイト様神経幹細胞と運動性の多繊毛を持つ上衣細胞という 2 種類の細胞に分化することが報告されている。アストロサイト様神経幹細胞によって産生された未熟な新生ニューロンは、吻側移動経路 (rostral migratory stream: RMS) に沿って嗅球へと移動する。それらは嗅球に到達した後で成熟ニューロンへと分化して、神経回路に組み込まれる。また、上衣細胞は繊毛運動によって脳脊髄液流を生じさせることで、髄液の循環を担うようになる。繊毛運動によって生じた前側に向かう液流は、反発因子の濃度勾配の形成に寄与することで、RMS の新生ニューロン移動を促進する。

これに対して、ゼブラフィッシュでは、成体期においても、脳室周囲領域全体に放射状グリアが存在しており、マウスの発生期と同様に高いニューロン新生能が維持されていることが知られている。ゼブラフィッシュでは、老化に伴いニューロン産生が低下することが報告されているが、それに伴って脳室周囲領域の細胞構成が変化するのは不明であった。

そこで、私たちは、ゼブラフィッシュの脳室周囲領域において、マウスと同様の変化が生じるのではないかと仮定し、若齢ゼブラフィッシュと老齢ゼブラフィッシュで、上衣細胞の数を比較した。免疫組織化学的手法によって、繊毛のマーカーである Acetylated tubulin の抗体を用いて、脳室壁の多繊毛を持つ細胞の密度を比較すると、マウスの脳室下帯に相当する腹側脳室帯において、老化に伴う多繊毛性細胞の出現が確認された。若齢期には腹側脳室帯の全体に一次繊毛を持つ放射状グリアが存在しているが、老齢期においては、腹側脳室帯の背側領域だけに多繊毛性細胞の存在が観察された。次に、脳室壁の変化を形態学的に調べるために、走査型電子顕微鏡を用いて、腹側脳室帯領域の脳室壁表面を観察した。その結果、老齢ゼブラフィッシュでは、RMS に沿って多繊毛が配列する様子が観察された。これらの多繊毛の機能を調べるために、老齢ゼブラフィッシュのスライス培養でライブイメージングを行ったところ、脳室壁に存在する多繊毛が、前側に向かって協調的にビーティングを行う様子が観察された。さらに、繊毛運動が液流を生み出すかどうかを調べるために、蛍光ビーズを用いて脳室壁周囲の液流を調べた。その結果、脳室壁近傍において、前側に向かう方向性のある液流が存在することが明らかとなった。以上の結果から、老齢ゼブラフィッシュの腹側脳室帯に出現する多繊毛性細胞は、繊毛運動によって脳脊髄液流を生じさせることが示唆された。繊毛によって生じる脳脊髄液流は、マウスの研究で報告されているのと同様に、RMS の新生ニューロン移動を促進している可能性がある。老化に伴って出現する多繊毛性細胞を同定するために、透過型電子顕微鏡観察によって、腹側脳室帯の細胞構成を調べた。その結果、老齢ゼブラフィッシュ腹側脳室帯の背側領域において、マウスの上衣細胞と同様の特徴を持つ細胞が観察された。一方、腹側領域においては、若齢期・老齢期のいずれでも、上衣細胞は観察されなかった。一次繊毛、および核内の濃縮したクロマチン構造を特徴とする放射状グリアは、若齢期・老齢期において、腹側脳室帯全体に観察され、これらの近くには、長細い細胞核、および厚みが少なく暗色を帯びた細胞質を持つ移動性の未熟ニューロンが分布していた。老齢期に見られた上衣細胞は、不規則な形状の細胞核、繊毛に特徴的な根元構造を有していた。繊毛基部周囲には、多量のミトコンドリアと粗面小胞体が観察された。また、上

衣細胞は、脳実質側に細長い突起を伸ばしており、放射状グリアから、上衣細胞への移行段階である可能性も示唆された。以上の観察結果から、老齢ゼブラフィッシュの腹側脳室帯背側領域には、多繊毛を持つ上衣細胞が出現し、脳室帯の細胞構成が成体マウスの脳室下帯と類似することが明らかとなった。マウスにおいては出生直後に生じる放射状グリアから上衣細胞への移行が、ゼブラフィッシュにおいてはタイミングが遅れて、成体期になってから生じることが示唆された。

(1866 字)

論文審査の結果の要旨

【目的】 発生期のマウスの脳室壁は、神経幹細胞である放射状グリアによって覆われており、脳内のニューロンが盛んに産生されている。発生期における高いニューロン産生能は生後すぐに低下し、ニューロン新生領域は一部に限られるようになる。これに伴い、放射状グリアは、アストロサイト様神経幹細胞と上衣細胞に分化する。アストロサイト様神経幹細胞は脳室下帯に分布し、新生ニューロンを産生する。新生ニューロンは吻側移動経路(rostral migratory stream, RMS)を通過して嗅球に到達し、成熟ニューロンへ分化して神経回路に組み込まれる。放射状グリアは不動性の一次繊毛を持つが、上衣細胞に分化すると運動性の多繊毛を持つようになる。上衣細胞の繊毛運動は、脳室内に脳脊髄液流を生じさせる。マウスでは、生後に以上のような変化が生じるが、成体期のニューロン新生は生物種によって異なる。ゼブラフィッシュでは、成体においても放射状グリアが維持されており、マウスの発生期に相当する高いニューロン新生能が保たれている。成体ゼブラフィッシュの脳室帯構造が、発生期マウスの脳室周囲領域に類似するため、マウスにおいて生じる放射状グリアから上衣細胞への分化が、ゼブラフィッシュでは老化に伴って生じるのではないかと仮説を立て、実験を行った。

【方法】 研究室において飼育したゼブラフィッシュにおいて実験を行った。若齢魚として、生後3から10ヶ月、老齢魚として、生後12から24ヶ月のゼブラフィッシュを用い、免疫組織染色、走査型電子顕微鏡観察、透過型電子顕微鏡観察によって、脳室帯の構造を比較した。免疫組織染色では、繊毛マーカー (Acetylated α tubulin) 、グリア細胞マーカー (s100) を用いた。繊毛運動を観察するために、高速カメラを用いたライブイメージングを行った。

【結果】 老齢ゼブラフィッシュの脳室帯には、一次繊毛の減少と多繊毛の出現が背側領域特異的に観察された。走査型電子顕微鏡観察によって、これらの多繊毛がRMSに沿って配列すること、さらにライブイメージングによって、前側に向かって協調的な繊毛運動を行うことが明らかとなった。蛍光ビーズによって液流を可視化したところ、脳室壁の周囲には前側に向かう流れがあることがわかった。さらに透過型電子顕微鏡によって細胞の形態的特徴を観察すると、老化に伴って出現する多繊毛を持つ細胞は、複数の繊毛、細胞内の多数の液泡、ミトコンドリアの存在などによって、上衣細胞であることが明らかとなった。

【結語】 ゼブラフィッシュでは、老化に伴い多繊毛を持つ上衣細胞が出現することが明らかとなった。このことから、マウスにおいて生後に生じる放射状グリアから上衣細胞への分化が、ゼブラフィッシュでは遅れて生じることが示唆された。

【審査の内容】 学位申請者の発表に対して、審査員から以下の質問があった。主査(齊藤教授)からは、①若齢から老齢に至るゼブラフィッシュの脳の変化は、発生過程であるのか、老化過程であるのか?②放射状グリアから、上衣細胞への分化をもたらすトリガーは何か?③繊毛発生の研究をゼブラフィッシュで行うことの利点は何か?など計16項目の質問、第一副査(飛田教授)からは、①電子顕微鏡を用いた二つの手法の違いは何か?②電子顕微鏡解析によって、繊毛の運動方向まで特定することが可能か?③研究を通して学んだことは何か?などの計9項目の質問、第二副査(松川教授)からは、①ヒトの進化の過程で、放射状グリアから上衣細胞への分化が成長の早い時期に生じるようになったことの意義は何か?②水頭症と繊毛異常の関連性はどの程度わかっているのか?③脳傷害後に傷害部に向かって新生ニューロンが移動する。この過程で脳脊髄液流を変化させることで、移動方向を制御しうるか?などの計4項目の質問がなされた。

これらに対して、申請者は、おおむね適切に答え、学位論文の内容を理解していると判定され、博士号取得に相当する学力を備えていると認められた。本研究は、繊毛の未知の発生機構解明につながるとともに、繊毛形成異常との関わりが示唆される水頭症などの疾患の治療法開発の基盤になると期待される。以上により、学位申請者は、博士(医学)の学位を授与されるに相当すると判定された。

論文審査担当者 主査 齊藤貴志 副査 飛田秀樹 松川則之