

Title	MicroRNA-based separation of cortico-fugal projection neuron-like cells derived from embryonic stem cells(Abstract_要旨)
Author(s)	Sunohara, Tadashi
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2020-03-23
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k22340
Right	the article remains open access in accordance with the Creative Commons Attribution License (CC BY). doi: 10.3389/fnins.2019.01141. eCollection 2019.
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士 (医 学)	氏 名	春 原 匡
論文題目	MicroRNA-based separation of cortico-fugal projection neuron-like cells derived from embryonic stem cells (マイクロ RNA スイッチを用いた胎児幹細胞由来神経細胞からの皮質投射ニューロンの選別法の開発)		
(論文内容の要旨) 背景 iPS 細胞や ES 細胞の多能性幹細胞から各組織を誘導することが可能になってきたものの、誘導した細胞群は Heterogenous な集団であり、再生医療や疾患モデルに使う際に、腫瘍化や特異度の観点からこの Heterogeneity が問題になってくる。それゆえに細胞特異的な選別法が望まれ、表面抗原の探索やセルソーターを用いた戦略などが報告されている。 大脳皮質投射ニューロン(CFuPN)は、皮質脊髄路を構築し、脳卒中や ALS などの疾患に対する再生医療の材料として、また、Amyotrophic lateral sclerosis や Primary lateral sclerosis などの疾患モデルを考えるさいに主要な細胞として、関心が持たれている。しかしながら、CFuPN に特異的な表面抗原は確認されておらず、その単離はできていなかった。 近年、表面抗原での細胞選別に代わる方法としてマイクロ RNA を用いる細胞選別がマイクロ RNA スイッチとして報告され、心筋細胞や膵島細胞、または iPS 細胞の選別に有用であることが報告されている。 そこで、CFuPN に対するマイクロ RNA を用いた選別について開発することとした。 方法・結果 皮質形成期における CFuPN におけるマイクロ RNA のプロファイルを調べる目的で CFuPN のマーカーとされる転写因子の BCL11B に対し EGFP で蛍光ラベリングしたトランスジェニックマウスを作成し、セルソーターを用いて胎生 14 日目と胎生 16 日目のマウス胎児脳から CFuPN を単離し、マイクロアレイを用いてマイクロ RNA のプロファイルを調べた。 胎生期の CFuPN では microRNA124-3p を含む 30 種類マイクロ RNA の特異的な上昇が確認された。そこで、microRNA124-3p と過去に神経に関連するとされた 2 つのマイクロ RNA を含む 32 種類のマイクロ RNA でマイクロ RNA スイッチを作成し、胎児幹細胞由来神経細胞の分離を試みたところ、microRNA124-3p および microRNA9-5p, microRNA219-5p で細胞の分離が確認できた。 分離された細胞群について免疫組織学的検討を行なったところ、microRNA124-3p で特に CFuPN のマーカーである vGlut1/ Bcl11b/ Emx1 トリプルポジティブな細胞の濃縮 (6.5% =>42%) が確認された。qPCR を用いて CFuPN のサブタイプの解析をおこなったところ、Bcl11b の増加とともに Ldb2 の増加が確認され、とくに Subcerebral projection neuron が選別されていると考えられた。 結語 胎生期皮質投射ニューロンでの microRNA124-3p の特異的な上昇と、microRNA124-3p マイクロ RNA スイッチを用いた胎児幹細胞由来神経細胞からの皮質投射ニューロンの細胞選別が可能であることが示された。			

(論文審査の結果の要旨) 多能性幹細胞から各組織を誘導することが可能になってきたが、再生医療や疾患モデルに使う際に、腫瘍化や特異度の観点から、分化誘導細胞の不均一性が問題となる。 Corticofugal projection neuron(CFuPN)は、皮質脊髄路を構築する Subcerebral projection neuron を含み、脳卒中などの疾患に対する細胞移植治療の材料として、また、Amyotrophic lateral sclerosis などの疾患モデルを考える際の主要な細胞として関心が持たれているが、特異的表面抗原は確認されておらず、従来のセルソーティングによる CFuPN の単離はできていない。 近年、表面抗原に代わる方法として microRNA を用いる細胞選別法(microRNA スイッチ法)が報告され、心筋細胞や膵島細胞の選別に有用であることが報告された。そこで、本研究では microRNA を用いた CFuPN の選別を試みた。 CFuPN のマーカーである bcl11b という CFuPN のマーカーを蛍光タンパクで標識した Knock-in mouse を用いて、大脳皮質形成期における CFuPN をマウス胎仔脳から単離し、microRNA のプロファイリングを行なったところ、CFuPN には microRNA124 ファミリーが特異的に発現していることが明らかになった。そこで microRNA124-3p スイッチを作製し、多能性幹細胞から分化誘導した大脳皮質細胞集団から CFuPN の性質をもつ細胞集団を濃縮することを可能にした。 さらに、microRNA124-3p スイッチにより分離された細胞集団には、CFuPN のうち皮質脊髄路を形成する Subcerebral projection neuron が多く含まれることが分かった。 この技術は皮質脊髄路を構成する Subcerebral projection neuron の選別を可能にするため、脳梗塞等による皮質脊髄路障害に対する再生医療分野での応用が期待される。 したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、令和2年2月20日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降