

氏 名 ぐえん ばん で
NGUYEN VAN DE

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富生命博甲第 97 号

学位授与年月日 平成 30 年 3 月 23 日

専 攻 名 認知・情動脳科学専攻

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

学位論文題目 PDGFR α controls the homeostasis of stem cell activities
of subventricular zone in adult mouse
(PDGFR α は、成熟マウスの脳室下帯の幹細胞の恒常性をコントロールする)

論文審査委員

(主査) 教 授 西条 寿夫

(副査) 教 授 二階堂 敏雄

(副査) 教 授 奥寺 敏

(副査) 教 授 中辻 裕司

指 導 教 員 教 授 笹原 正清

Abstract

The neural stem/precursor cells (NSCs) reside in the adult ventricular-subventricular zone (V-SVZ), and contribute to adult neurogenesis and gliogenesis; however, the mechanisms regulating NSC phenotype and functions remain to be elucidated. In the present study, we uncovered roles for PDGFR α in adult NSCs isolated from the V-SVZ. This was achieved through *Pdgfra* inactivation using a ubiquitous promoter-driven, tamoxifen-inducible Cre recombinase. Cultured adult V-SVZ-derived NSCs largely depended on PDGFR α for their self-renewal, migration, and differentiation towards oligodendrocyte-lineage cells and neurons. Formation of the neurosphere by V-SVZ-derived NSCs was eliminated upon *Pdgfra* inactivation in adult mice, with its subsequent regeneration attributed to the repopulation of *Pdgfra*-expressing NSCs. These repopulated NSCs allografted into adult mouse striatum demonstrated enhanced survival and multipotency when compared to control NSCs from *Pdgfra*-preserving mice. *Pdgfra* inactivation-induced depletion and subsequent regeneration of NSC activities in the V-SVZ was associated with upregulated Nestin and altered mitotic activities that were hallmarks of activated NSCs. The implication of PDGFR α in the control of NSCs may be exploited in regenerative medicine.

【学位審査の結果の要旨】

【はじめに】

側脳室外側壁に存在する脳室下帯（V-SVZ）に分布する神経幹細胞（NSC）は成熟脳における神経細胞やグリア細胞の新生に関与し、損傷脳の再生や修復に道を開く可能性が期待されている。NSCの制御には様々な因子の関与が示されているが制御機構の解明は不十分である。所属研究室の先行研究により血小板由来増殖因子β受容体（PDGFRβ）が培養されたNSCの生存や分化に関与することが示されている。一方、血小板由来増殖因子α受容体（PDGFRα）は、発達および成熟脳の稀突起膠細胞前駆細胞（OPC）や髄鞘を形成する稀突起膠細胞の細胞増殖や生存に中心的な役割を果たしている。さらに、PDGFRαは様々な幹細胞のマーカーや機能制御因子としても重要な役割を果たしているがNSCの機能制御におけるPDGFRαの役割は不明である。そこで Nguyen Van De 君は、NSCの機能制御におけるPDGFRαの関与を明らかにするため、Tamoxifen (TM) 誘導により *Pdgfra* 遺伝子をノックアウトして Neurosphere 形成過程で得られる種々のパラメーターを解析した。さらに、NSCの同種移植実験による検証を実施した。

【方法】

PDGFRα発現抑制を誘導するため、*Pdgfra*^{flox/flox} マウス（Flox マウス）と全身性にTM誘導により活性化される Cre recombinase を発現する CAGG-CreER マウスを交配して CAGG-CreER;*Pdgfra*^{flox/flox} マウス（CAGG-Flox マウス）を作製した。ついで成熟CAGG-FloxマウスのV-SVZに由来する細胞を培養しNeurosphere形成を誘導した。これら培養細胞にTMを投与して*Pdgfra*発現を抑制し、Neurosphere形成能、分化誘導実験における細胞遊走能、ならびに稀突起膠細胞、神経細胞および星状膠細胞への分化能を調べた。またCAGG-Flox マウスにTMを経口投与して全身性に*Pdgfra*の発現を抑制したマウス（iKOマウス）から、同遺伝子発現抑制後に経時的にV-SVZ由来細胞を採取してNeurosphere形成能を解析した。さらにiKO マウスに由来するV-SVZ細胞を用いた同種移植実験を実施してこれらのNSCとしての機能を評価した。

【結果】

- 1) 培養したNSCへのTM投与は効率よく*Pdgfra*の発現を抑制した。これらの*Pdgfra*発現が抑制されたNSCではNeurosphere形成、および分化誘導にともなう細胞遊走が顕著に抑制された。さらに稀突起膠細胞および神経細胞への分化は顕著に抑制されたが星状膠細胞への分化は増加した。
- 2) iKO マウスではTM投与直後には効率よく脳中のPDGFRα発現が抑制されたが、1～2週間の後にはPDGFRα陽性OPCが回復した。これらに並行してV-SVZの増殖活性がTM投与直後に減少した後回復した。回復と同時に活性化されたNSCの指標であるNestinが発現した。
- 3) iKO マウスのV-SVZに由来する細胞のNeurosphere 形成はTM投与直後にはほぼ完全に消失した。同投与の1～2週間後のiKO-マウスから分離したV-SVZ細胞ではNeurosphere形成および稀突起膠細胞と神経細胞への分化がそれぞれ経時的に回復した。これらの回復はTM投与後に再生した*Pdgfra*を有するNSCにより誘導された。V-SVZ由来細胞によるNeurosphere形成はV-SVZの神経幹細胞活性を反映する。以上から、V-SVZにおけるNSCの可塑性にPDGFRαが関与することが明らかになった。
- 4) 同種移植実験では、iKO マウスでTM投与の2週間後に回復したNSCは、Flox マウス由来NSCに比較して線条体で生存、稀突起膠細胞、神経細胞および星状膠細胞への分化のいずれもが亢進した。また、iKO マウスで2週間後に回復したNSCを、TMを投与した1週間後のiKO マウス

スに移植実すると稀突起膠細胞への分化がさらに豊富に誘導された。以上から当該レシピエント脳の微小環境に稀突起膠細胞への分化誘導作用があることが明らかになった。

【総括】

本研究で Nguyen Van De君は、1)培養下で*Pdgfra*遺伝子発現の抑制を誘導した後にNeurosphere形成を解析し、成熟脳における神経幹細胞（NSC）の自己複製、遊走、および稀突起膠細胞と神経細胞への分化が、培養細胞におけるPDGFR α 発現に依存していることを初めて明らかにした。2)同様に*Pdgfra*遺伝子発現を生体で抑制したマウスから採取したNSCのNeurosphere形成を解析した実験では、PDGFR α 発現は*Pdgfra*遺伝子発現抑制の誘導直後にほぼ消失し、漸次回復した。また、これと並行してNeurosphere形成が遺伝子発現抑制直後に消失し、ついで*Pdgfra*を発現する細胞の再生に依存して回復したことからNSCの再生・増殖性にPDGFR α が関与することを明らかにした。3)移植実験では、*Pdgfra*遺伝子発現を生体で一過性に消失させた後に再生したNSCには強い幹細胞活性が認められ、また*Pdgfra*遺伝子の発現を抑制したレシピエント脳にも稀突起膠細胞への分化を誘導する作用が認められた。以上からPDGFR α が成熟脳のNSCにおける増殖・分化等の機能制御に関与していることが明らかになり、神経再生に寄与する可能性が示された。

以上から、PDGFR α が培養したV-SVZの幹細胞特有の機能を制御していることを初めて明らかにした点は新規性があり、さらにPDGFR α が成熟脳における脳室下帯のNSC活性に関与することを明らかにした点は、NSC活性低下が脳の老化に関与することを考慮すると医学における学術的重要性も高いと評価された。さらに、再生したNSCに強い幹細胞としての特性が見出されたことは当該細胞の再生医療に応用できる可能性が示唆され、臨床的発展性も期待された。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。