

学 位 論 文 題 名

Experimental studies on the mechanism of regeneration of the telencephalon in *Xenopus laevis* larvae

（アフリカツメガエル幼生の終脳再生機構に関する実験的研究）

学位論文内容の要旨

脊椎動物の中樞神経系は再生しにくいと考えられており、哺乳類・鳥類・爬虫類ではたとえ脳の一部でも除去してしまうと、再生することはない。一方、魚類・有尾両生類では一生を通して終脳を再生することができると言われている。同じ両生類でも無尾両生類のアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の場合、オタマジャクシ（幼生）の時は終脳を再生することができるが、変態してカエル（成体）になると再生できなくなると報告されている。そこで、アフリカツメガエルの終脳再生について以下の2つのテーマで研究を行った。第1章では、この変態に伴う再生能力消失の原因を探るべく研究を行った。また、脳は情報処理器官であるので、形態的にのみ再生しても意味がなく、情報処理ができて初めて再生したと言える。そこで第2章ではオタマジャクシの時に再生した終脳が脳として機能できるかどうかを検討した。

I. 変態に伴う再生能力消失の原因

初めに、オタマジャクシとカエルの終脳前半部を除去し、その後の経過を組織学的に観察した。オタマジャクシでは除去によって開口した脳室が周辺の上皮細胞によって速やかに塞がれた後、これらの細胞が活発に分裂することで実質が肥厚し、脳が再生した。一方、カエルでは脳室開口部への上皮細胞の移動が全く見られず、その後30日経っても失われた領域の実質が再生することはなかった。

次に、再生能の差が細胞の分裂能の差によるものではないかと考え、終脳細胞の分裂頻度をオタマジャクシとカエルで比較した。その結果、再生能があるオタマジャクシだけではなく、再生能がないカエルでも脳室周囲には分裂細胞が分布しているのが観察された。通常状態ではカエルに比べてオタマジャクシの方が活発に分裂していたが、部分除去を行うとカエルでもオタマジャクシと同程度まで分裂が活発になった。分裂する細胞は哺乳類の神経幹細胞や前駆細胞のマーカーとして用いられている *Musashi1* に対して陽性であったことから、カエルにもオタマジャクシと同様に神経幹細胞（前駆細胞）は存在しており、カエルの脳が再生しない原因は細胞の分裂能が失われたためではないと結論した。

また、再生能がないカエル脳から単離した細胞集団を得て、終脳を除去した別のカエルに移植したところ、オタマジャクシの細胞を移植した場合と同様に移植細胞による脳の再構築が見られた。このことから、カエル終脳といえども潜在的な再生能力は持っていることが示唆された。

以上の結果から、カエルの脳では細胞や脳内環境で見える限り、再生できないという積極的な理由はなく、それ以外の何らかのメカニズムで再生が阻害されていることが示唆さ

れた。以上の議論をふまえて次のような作業仮説を立てた。カエルにも神経幹細胞は存在するが、脳を構成する神経およびグリアの細胞間や、それらと細胞外基質間の結合が強固に構築されてしまっているために神経幹細胞が自由に移動したり、組織を形成したりすることができないことが原因で再生できない。

II. 再生脳の形態と機能

まず、無傷個体と再生個体（カエルに変態した後）の終脳で、主要な構造について詳細に比較した。その結果、再生終脳においても嗅球に特有な層構造（嗅神経層、糸球体層、僧帽細胞層、顆粒細胞層）や、大脳に特有な層構造（上衣細胞層、灰白質、白質）が、無傷個体の脳と同じように見られた。次に、これらの層構造を形成する細胞種も適切に再生しているかどうかを検討するため、終脳の主な構成細胞である神経細胞と上衣細胞について免疫組織化学を用いて両者を比較した。抗 NeuN 抗体と抗 β -tubulin 抗体を用いて神経細胞の分布、形態を調べたところ、再生脳においても嗅球には僧帽細胞、顆粒細胞、大脳には錐体細胞が無傷個体と同様の分布・形態で観察された。また、抗 GFAP 抗体を用いて上衣細胞の分布・形態を調べたところ、再生脳でも無傷個体と同じような分布・形態の上衣細胞が観察された。これらのことから、大まかな組織構造や細胞の分布・形態などのレベルでは、再生脳は無傷個体の脳と大きな差は見出せず、ほぼ完全に再生しているように思われた。

次に、神経細胞同士の連絡が回復しているかどうかを検討するため、脂溶性色素 DiI による軸索束の追跡実験を行った。カエル終脳には嗅球の僧帽細胞が大脳に向かって軸索束を伸ばしていることが知られている。そこで、再生脳の僧帽細胞層に DiI の結晶を置いて追跡したところ、DiI でラベルされた軸索束が大脳の表層近くに無傷個体の脳と同じように観察された。逆に大脳の表層近くに結晶を置くと、僧帽細胞の細胞体がラベルされた。このことから、再生脳でも嗅球の僧帽細胞が適切な場所に軸索束を形成していることが示され、神経細胞間の連絡も回復している可能性が示唆された。

最後に、再生脳が機能しているかどうかを行動実験によって直接検討した。カエルの終脳は前方で嗅神経と結合しており、嗅覚系を処理しているといわれている。アフリカツメガエルは舌がないため餌を前肢で口に運ぶが、この給餌行動は餌の匂いだけでも引き起こすことができる（嗅覚応答）。そこで、この行動を嗅感覚の指標とすることにより、再生脳が嗅覚処理を行えるかどうかを調べた。無傷個体に匂い刺激を与えると、60 秒以内に全ての個体が嗅覚応答を示した。一方、普通の水を与えた場合や、嗅神経が切断された個体では応答が全く見られなかった。再生個体の場合は、半数の個体は無傷個体と同じように嗅覚応答を示したが、残りの半数はまったく行動を示さなかった。この差の原因を探るためにこれらのカエルを解剖したところ、嗅覚が回復していた個体では嗅神経が接続しており嗅球も大脳も再生していた。一方、嗅覚応答を示さなかったカエルでは、嗅神経が再生脳に接続しておらず、大脳は再生していたものの嗅球は再生していなかった。

以上の結果から、再生過程で嗅神経が再生脳に再接続した場合は、少なくとも嗅覚で見る限り、再生脳は機能していることがわかった。

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 梶 内 新

副 査 教 授 小 池 達 郎

副 査 教 授 高 畑 雅 一

副 査 助 教 授 若 原 正 己

学 位 論 文 題 名

Experimental studies on the mechanism of regeneration of the telencephalon in *Xenopus laevis* larvae

(アフリカツメガエル幼生の終脳再生機構に関する実験的研究)

1998年、成人の脳にも神経幹細胞の存在が確認されたことから、従来再生することは決してないと考えられていたヒトの脳を再生させようと数多くの研究が行われるようになった。しかし、それらの研究の多くはヒトと同じように再生能がないマウスなどの哺乳類を研究材料に用いて行われており、まだ再生させることに成功していないばかりではなく、なぜヒトでは再生できないのかという説明もなされていない。

脳再生の研究がこのような現況にある中、著者は無尾両生類のアフリカツメガエルを用いて終脳再生現象を実験生物学的に研究した。アフリカツメガエルを含む無尾両生類は、一生のうちで脳を再生できる時期(幼生)とできない時期(成体)の両方を持っているほとんど唯一の動物群である。そのため、哺乳類の研究とは異なったアプローチができることが期待された。

第1章では、変態に伴う再生能力消失の原因を探るべく研究を行った。初めに、幼生と成体の終脳前半部を除去し、その後の経過を組織学的に観察した。幼生では除去によって開口した脳室が周辺の上皮細胞によって速やかに塞がれた後、これらの細胞が活発に分裂することで実質が肥厚し、脳が再生した。一方、成体では脳室開口部への上皮細胞の移動が全く見られず、その後30日経っても失われた領域の実質が再生することはなかった。

細胞の分裂能力や存在する細胞の種類などを詳細に検討した結果、脳を再生することができない成体にも神経幹細胞/前駆細胞は存在するが、それらの細胞が自由に移動することができないことが原因で再生できないことが示唆された。また、細胞移植実験では、成体の細胞でも自由に移動できるようにすることによって成体の脳を再構築させることに成功しており、成体の細胞に潜む再生能力を示した。

本研究をふまえて、著者は次のような作業仮説を提出した。成体にも神経幹細胞は存在するが、脳を構成する神経およびグリアの細胞間や、それらと細胞外基質間の結合が強固に構築されてしまっているために神経幹細胞が自由に移動したり、組織を形成したりすることができないことが原因で再生できない。

第2章では、幼生時に再生した終脳が脳として機能できるかどうかを検討している。アフリカツメガエルの幼生が終脳を再生できることは1950年頃から知られていた。しかし、過去の報告では終脳が形態的に再生することしか調べられておらず、組織構造が無傷個体と同じように再

生しているのか、機能は回復しているのか、ということについては未解明であった。しかし著者は、脳は形態的にのみ再生しても意味がなく、情報処理ができて初めて再生したと言えると考え、再生した終脳が脳として機能できるかどうかを検討した。

その結果、大まかな組織構造や細胞の分布・形態などのレベルでは、再生脳は無傷個体の脳と大きな差は見出せず、ほぼ完全に再生しているように思われたばかりではなく、再生脳でも嗅球の僧帽細胞が適切な場所に軸索束を形成していることが示され、神経細胞間の連絡も回復している可能性が示唆された。

さらに著者は組織学的だけでなく、行動実験をしても機能的な脳が再生していることを示した。再生個体では、半数の個体が無傷個体と同じように嗅覚応答を示したが、残りの半数はまったく行動を示さなかった。この差の原因を探るためにこれらの個体を解剖したところ、嗅覚が回復していた個体では嗅神経が接続しており嗅球も大脳も再生していた。一方、嗅覚応答を示さなかった個体では、嗅神経が再生脳に接続しておらず、大脳は再生していたものの嗅球は再生していなかった。

再生脳が正常に機能しているということは一見当たり前のことに見受けられがちであるが、脳再生の意味からみて非常に重要な事実であり、今後の脳再生研究への貢献は大きい。また、この研究の過程で大脳前方に位置する嗅球の再生には、嗅器官から延びてくる嗅神経が再生脳に接続することが必要条件であることも見出し、再生機構の解析に大きな前進となった。

近年、再生医療の研究が非常に活発であるが、細胞移植によって脳を大規模に再生させたと言う報告はまだない。哺乳類ではないとはいえ、同じ脊椎動物で本来は再生できない脳を再生させることができたというのは画期的なことである。また、ヒトにも神経幹細胞があるが、それらの細胞は成体脳の中では移動できないことも報告されており、無尾両生類の今回の報告と共通点が多い。このことから、著者が今回得た知見は哺乳類の研究にも何らかの形で結びつく可能性が高い。

博士研究において、著者はアフリカツメガエルを用いて脳の再生についての多くの新知見を得ており、脊椎動物とりわけヒトの中樞神経系を再生させようとしている数多くの研究グループに対しての貢献は大きい。

よって著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認める。