

氏 名 黒田 杏理

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 博士甲第 867 号

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項

学位授与年月日 令和 2 年 3 月 1 0 日

学位論文題目 Minocycline directly enhances the self-renewal of adult  
neural precursor cells

(成体神経細胞の自己複製へのミノサイクリンの直接的作用)

審査委員 主査 教授 勝山 裕

副査 教授 後藤 敏

副査 教授 遠山 育夫

## 論文内容要旨

*整理番号	876	(ふりがな) 氏名	くろだ あんり 黒田 杏理
学位論文題目	Minocycline directly enhances the self-renewal of adult neural precursor cells (成体神経幹細胞の自己複製へのミノサイクリンの直接的作用)		
<p>&lt;研究の目的&gt;          ミノサイクリンはテトラサイクリン系の抗生剤としてよく知られているが、抗生剤以外の薬理作用も多数報告されている。筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病などの神経変性疾患や多発性硬化症などの脱髄性疾患においてミノサイクリンの抗生剤以外の機能を期待した治験が行われているが、そのメカニズムについてはまだ明らかになっていない。我々は、本研究においてミノサイクリンが成体神経幹細胞に与える影響を検討した。</p> <p>&lt;方法&gt;</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) ミノサイクリンの神経幹細胞の増殖への影響の解析: 成体(20-30週齢)および胎生14.5日のマウスを用い、ニューロスフィアアッセイ法と呼ばれる脳室周囲の神経幹細胞の培養を行った。それぞれ3種類または4種類の濃度のミノサイクリンを投与し、解析した。成体のニューロスフィアにはテトラサイクリンおよびドキシサイクリンを投与し、解析した。</li> <li>2) ミノサイクリンの神経幹細胞への影響にミクログリアが関与するかについての検討: ミクログリアの単独培養を行った後、ニューロスフィアと混合培養し、ミノサイクリンを投与し、解析した。</li> <li>3) ミノサイクリンの神経幹細胞の分化への影響の解析: ニューロスフィアを分化条件で培養し、ミノサイクリンを投与し、解析した。</li> <li>4) ミノサイクリンが影響を及ぼすシグナル伝達系の検討: Notch シグナル、Wnt シグナル、MAPK ファミリーに注目し、RT-PCR およびウェスタンブロッティング法により解析した。Notch シグナルのターゲットとして Hes1、Hes5、CyclinD1 また Notch の活性型細胞内ドメインとして NICD を RT-PCR で、さらに NICD はウェスタンブロッティング法で解析した。Wnt シグナルのターゲットとして Axin2 を RT-PCR で解析した。MAPK ファミリーの下流因子として JNK/SAPK1、p38/MAPK、ERK1 および ERK2 をそれぞれ RT-PCR とウェスタンブロッティング法で解析した。</li> <li>5) <i>In vivo</i> でのミノサイクリンの神経幹細胞の増殖への影響: 浸透圧ポンプをマウスの脳室に埋め込み、マウスの脳室内の脳脊髄液にミノサイクリンを7日間投与する <i>in vivo</i> の系を作成し、その後ニューロスフィアアッセイを行い、ミノサイクリンの神経幹細胞への影響を解析した。</li> </ol>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

## &lt;結果&gt;

- 1) ヒトの抗生剤としての治療域濃度のミノサイクリンを成体のニューロスフィアに直接投与した *in vitro* の系において、ミノサイクリンはマウスの成体神経幹細胞に直接作用し、自己複製能を促進した。ヒトの治療域濃度よりも高い濃度でのミノサイクリンの投与は逆に自己複製能の抑制を示した。治療域濃度でのミノサイクリンの効果は胎生期のニューロスフィアに対しては観察されず、またテトラサイクリンやドキシサイクリンといった他のテトラサイクリン系抗生剤でも神経幹細胞への影響は観察できなかった。
- 2) ミノサイクリンが存在しないニューロスフィアに対してはミノサイクリンを投与することで有意な神経幹細胞の増殖がみられたが、ミクログリアの共存下ではミノサイクリンの影響がみられなかった。
- 3) ミノサイクリンを投与することにより、神経幹細胞はニューロンへの分化が抑制されオリゴデンドロサイトへの分化が促進された。
- 4) ミノサイクリンの投与による Notch シグナル、Wnt シグナル、MAPK ファミリーに対する影響はいずれも観察されなかった。
- 5) ミノサイクリンを *in vivo* の系で投与した場合も神経幹細胞の有意な増殖効果が観察された。

## &lt;考察&gt;

ヒトの治療域濃度のミノサイクリンの投与を *in vitro* の系、*in vivo* の系のいずれの方法で行った場合にも、神経幹細胞の自己複製能の促進がみられた。この効果は胎生期には観察されず、成体期に特異的にみられ、神経幹細胞の分化傾向にも影響を与えた。また、ミノサイクリンの神経幹細胞に対する影響は、ミクログリアを介さず、神経幹細胞に直接作用するものであった。本研究ではミノサイクリンの神経幹細胞に対する作用は Notch シグナル、Wnt シグナル、MAPK ファミリーを介さずに作用することがわかった。今後、胎児期とは異なる成体神経幹細胞に特異的なシグナル伝達経路に着目することで、より詳細なミノサイクリンの神経幹細胞に対する作用メカニズムが解明できると考える。

## &lt;結論&gt;

ミノサイクリンは、様々な神経変性疾患や脱髄性疾患について治験が行われているが、使用する薬剤の濃度は定まっておらず、またどのような機序で作用しているのかもまだ明確な結論は出ていない。本研究において、我々はヒトの抗生剤としての治療域濃度でのミノサイクリンが神経幹細胞に直接的に作用し、自己複製能を促進することを見出した。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	876	氏名	黒田 杏理
論文審査委員			
<p>ミノサイクリンは中枢神経系の疾患への効果が報告されているが、その作用機序はあきらかではない。本研究ではマウスで実験を行い、ニューロスフェアアッセイによって神経幹細胞へのミノサイクリンの効果を調べた。その結果、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. ミノサイクリンは成体脳の神経幹細胞の増加に顕著な効果を示した。</li><li>2. 神経幹細胞とミクログリアの共培養はミノサイクリンの効果を増強しなかった。</li><li>3. ニューロスフェアの二次培養実験より、ミノサイクリンが幹細胞の自己複製を亢進していることが示された。</li><li>4. 培養へのミノサイクリンを添加によりニューロン分化が低下し、オリゴデンドロサイトの分化が亢進した。</li><li>5. ミノサイクリンの投与は神経幹細胞増殖に関与する既知のシグナル経路には影響を与えていないことが示唆された。</li><li>6. マウスの側脳室へのミノサイクリンの灌流投与により、コントロール実験に比べて形成されるニューロスフェア数が増えた。</li></ol> <p>本論文は、培養下のみならず、マウス脳への直接の投与実験でミノサイクリンの効果を示し、臨床的に投与する場合と同等の濃度でミノサイクリン効果があった。ミノサイクリンが示す中枢神経系への効果は、神経幹細胞が標的であることを示唆しており、神経幹細胞を標的とした治療の開発に貢献するものと考えられる。最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 594字)</p> <p style="text-align: right;">(令和 2年 1月28日)</p>			