HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	新規透明化法を用いたマウス脳における新生ニューロンの分布に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	青柳, 佑佳
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(情報科学)
Dissertation Number	甲第13518号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74207
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuka_Aoyagi_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　博士 (情報科学)　氏名　青柳佑佳

審査担当者　主　査　教　授　根本 知己
副　査　教　授　西野 吉則
副　査　准教授　西川 淳

学位論文題名

新規透明化法を用いたマウス脳における新生ニューロンの分布に関する研究
（Study on distribution of immature neurons in mouse brain using novel optical clearing protocol）

近年、様々な生体組織の深部観察に向けた顕微鏡技術の開発は盛んに行われている。特に、低い侵襲性と優れた深部到達性を有する 2 光子励起顕微鏡法や、ホルムアルデヒド溶液等で化学固定した脳組織を透明にする手法は、神経科学の分野において非常に注目されている。一方で近年、限られた領域のみではあるが、生後も神経幹細胞から未成熟なニューロン (新生ニューロン) は生まれ続けることが明らかになり、新生ニューロンに関する研究は広く行われるようになっている。特に、脳室下帯で生まれた新生ニューロンは、移動能を有することから再生医療への応用が期待されている。脳室下帯由来の新生ニューロンの詳細を記述するためには、新生ニューロンが移動の際に形成する rostral migratory stream (RMS) を含む広範囲を 3 次元的かつ高精細に観察する必要がある。しかしながら、従来は観察標本として脳を薄くスライスした標本を使用していたため、脳内に広く分布する新生ニューロンの全体像は得られていなかった。

本論文では、マウスの脳内の神経細胞を広範囲に渡り 3 次元的かつ高精細に観察するための新たな透明化手法を確立し、その手法を新規の画像解析手法と組み合わせて、新生ニューロンの解析に応用している。よって、本論文は複数の分野における知識と技術を融合した非常に学際的な研究である。

まず、厚い標本の深部における神経細胞を 3 次元的に観察する手法を確立するため、透明化試薬の候補としてグリコール誘導体の一つである 2,2’- thiodiethanol (TDE) に着目している。異なる濃度の TDE 溶液 (30%TDE、60%TDE、97%TDE) を調整し、ホルムアルデヒド溶液で化学固定した脳標本を各種 TDE 溶液に浸漬することで、TDE の濃度効果を検討している。その結果、標本の透過率は TDE の濃度依存的かつ極めて迅速に上昇することを明らかにしている。また、一部の神経細胞に蛍光タンパク質を発現するマウスの脳を用いて、共焦点レーザー顕微鏡および 2 光子励起顕微鏡観察における深部到達性の評価も行っている。その結果、97% TDE を用いた場合は蛍光シグナルが減弱するのに対し、30% TDE および 60% TDE に浸漬した場合は、蛍光シグナルは保たれ、深部到達性も向上することを示している。さらに、60% TDE に浸漬した全脳を 2 光子励起顕微鏡により観察した際には、脳の表面から深さ 2 mm に渡る全ての深さにおいて、単一の細胞レベルで神経細胞を観察することに成功している。よって、確立した手法は、簡便かつ迅速な利点を有しており、蛍光タンパク質で標識した細胞を 3 次元的かつ高精細に観察する目的において非常に有用である。さらに、TDE 溶液に浸漬することで脳以外の臓器や植物も透明になることが報告されていることから、確立した手法は、多くの分野における研究の効率化に貢献するところがある。

さらに本論文では、異なる週齢のマウスの RMS およびその周囲を観察し、若齢マウスの RMS の周囲に、新生ニューロンのマーカーである Dcx を発現した細胞が多く存在することも明らかにしている。これまでの新生ニューロンに関する研究の多くは、新生ニューロンの主要な移動経路である RMS に着目していたのに対し、本論文は RMS の周囲に着目している点で独創的である。そして、新生ニューロンに蛍光タンパク質 EGFP を発現するマウス (Dcx-EGFP マウス) を用いて、EGFP 陽性細胞の分布や形態を 3 次元的に解析している。まず、TDE 溶液に浸漬することで透明にした固定脳ブロック標本を、2 光子励起顕微鏡を用いて観察した結果、脳室下帯から嗅球に至るまでの RMS 全体を 3 次元再構築することに成功している。次に、得られた大規模画像から EGFP 陽性細胞の位置を自動で検出するための画像解析手法を新たに確立し、RMS 周囲における EGFP 陽性細胞の分布を定量的かつ網羅的に解析することを行っている。EGFP 陽性細胞の分布を俯瞰的に調べた結果、EGFP 陽性細胞は RMS の急激に曲がった領域の Lateral 側に偏って存在することを明らかにしている。最後に、RMS 周囲における EGFP 陽性細胞がどこに向かって移動しているのかという点に着目し、個々の細胞の移動方向を推測している。新生ニューロンは先導突起の方向に移動すると考えられていることから、EGFP 陽性細胞の細胞体から見た先導突起の方向を移動方向と仮定して計測している。その結果、RMS 周囲における EGFP 陽性細胞は様々な方向に先導突起を伸ばしており、領域依存的に方向を示す分布は変化することを明らかにしている。これらの結果より、RMS 周囲には多数の EGFP 陽性細胞が偏在し、それらは様々な方向に移動していることが示唆される。

これを要するに、著者は、脳組織を透明にした新たな顕微鏡観察手法を確立し、その手法を新規の画像解析手法と組み合わせることで、神経科学の分野において解剖学的に重要な新知見を得たものであり、新生ニューロンに関する今後の理解の促進に貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士 (情報科学) の学位を授与される資格あるものと認める。