



Title	神経組織特異的線維芽細胞が末梢神経再生に及ぼす影響とその分子機構に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	原, 健人
Description	配架番号 : 2780
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15462号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90009
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	HARA_Masato_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 原 健 人

主査 教 授 近 藤 亨
審査担当者 副査 准教授 夏 賀 健
副査 准教授 和 田 は る か

学 位 論 文 題 名

神経組織特異的線維芽細胞が末梢神経再生に及ぼす影響とその分子機構に関する研究
(Elucidation of the role of Nerve Tissue-Specific Fibroblasts on Peripheral Nerve
Regeneration and Their Molecular Mechanisms)

本学位論文は、切断損傷を受けた末梢神経の再生に関わるメカニズムについて多臓器の再生に関与する線維芽細胞(Fb)に焦点を絞り、その役割と再生に関わる分子機構の一端を解明したものである。研究手法は、基本的な分子細胞生物学実験、1細胞遺伝子発現解析、免疫組織化学実験、ラットを用いた末梢神経切断・再生実験と多岐にわたる。申請者は、切断損傷を受けた末梢神経の再生効率が神経上膜のブリッジ形成に依存することを出発点とし、上膜に存在するFbの機能解析を進め、Fbの神経突起伸長促進作用とChordin like-1(CHRD1)の分泌によるマクロファージ由来のBMP4の阻害が血管内皮細胞の遊走を促進することを明らかにした。

審査にあたり、まず副査の夏賀健准教授から損傷後の状況を *in vitro* で観察する場合、扱っているFbは損傷下のFbとかけ離れているのではないかとの質問に対し、申請者は各Fbを採取する際に組織を粉砕していることから、実際の損傷とは異なるが模倣していると考えていると回答した。次に、Fbと後根神経節(DRG)の非接触共培養に関して、DRGのneuriteが膜孔を通り越してFbと接触している可能性はないかとの質問に対し、申請者はDRGから伸長したneuriteは平面上を伸びていき垂直方向には伸長しないため膜孔を通り越してFbに接触している可能性は極めて低いと回答した。また、提示しているタンパク質が実際に分泌されていることを確認するためにSandwich ELISAなどを検討してみてもどうかとのコメントに対し、申請者は使用しているFbが候補タンパク質を分泌しているかはwestern blottingで検討しているが、結果を確定するためにSandwich ELISAの検討も必要であると回答した。

次に和田はるか准教授から実験結果に提示している実験に関して説明が不足している印象がある。例えば、Fbの純度定量染色でなぜCD31を染めるのかとのコメントに対し、申請者はFbの純度を定量する目的でCD31とS100の染色を行なっているが、その二つを選んだ理由は血管内皮細胞とシュワン細胞の混在を否定するために行ったと回答した。次に、single cell RNA seq(scRNAseq)からPDGFR α に注目した流れで論文を記載しているが、実際にこの順番で実験を行ったのかの質問に対し、申請者は坐骨神経切断後の切片を用いた免疫染色によりPDGFR α 発現を検

出したことが始まりであり scRNAseq 解析の結果はその確認であるが、論文の論理展開を考えて順番を変えていると回答した。また、Fb 集団でどの程度 PDGFR α は特徴的であると言えるのかの質問に対し、Fb 集団でどの程度 PDGFR α が特徴的な発現遺伝子であるかについては明確に回答できないとした。各実験で n 数が足りているのかのコメントに対して、申請者は n=3 は実験結果の確実性・信頼性に十分ではないため、今後 n 数を増やすとともに実験を繰り返す必要があると回答した。最後に、Fb と軸索先端は本当に接していないのかの質問に対して、申請者は Fb が再生軸索先端と接しているという知見はなく、むしろ邪魔になる可能性が指摘されていること、近接している画像も観られるが確定できるデータは取得できていないと回答した。

主査の近藤亨教授から Fb の不均一性はすでに各臓器で指摘されているが、使用した Fb は本当に均質と言えるかとの質問に対して、申請者は代表的な Fb マーカーである 1 型コラーゲンと Thy1、血管内皮細胞とシュワン細胞のマーカーである CD31 および S100 に対する抗体を用いた免疫染色により、Fb を特定しているものの均一であることを確定できていないと回答した。次に、PDGFR α は間葉系幹細胞マーカーともされているが線維芽細胞のマーカーとして使用することについてどのように考えるのかについての質問に対し、申請者は間葉系幹細胞の混入を否定できるデータはないものの現在 Fb 特異的なマーカーは存在せず PDGFR α の発現を指標にした同定法しかないと回答した。また、PDGFR α や CHRDL1 などの因子は定常状態でも発現しているのかの質問に対し、申請者は PDGFR α -Cre GFP マウスを使用した実験から、損傷前と損傷後経時的に PDGFR α と CHRDL1 の発現を観察した結果、2つの因子が組織再生に必要な期間に限定して発現亢進していること発見していること、これら因子の発現制御のメカニズム解析が将来重要であると回答した。

全ての質問に対して申請者は文献的知見と実験結果をもって適切に回答した。また本研究で解明した研究成果の意義、今後解明すべき点を明確に理解し、次段階の研究指針や応用の方向性も十分把握していた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し大学院課程における研鑽や取得単位なども併せて申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。