




学位論文審査の結果の要旨

令和 3年 11月 16日

審査委員	主 査	上野 正樹			
	副主査	金田 繁治			
	副主査	伊藤 日加瑠			
願 出 者	専攻	医学	部門	(平成27年度以前入学者のみ 記入)	
	学籍 番号	17D711	氏名	國土曜平	
論 文 題 目	Ascending spinal tract formation in chick embryo originating from different spinal regions.				
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格 . 不合格 (該当するものを○で囲むこと。)				

〔 要 旨 〕

【背景・目的】

脊髄は脳と身体を結ぶ情報の通り道であり、身体各部からの情報の中継と、上位中枢からの命令の伝達を担っている。こうした上行性・下行性の伝導路の有り様については教科書的知識としてまとめられており、例えば、脊髄上行路には、脊髄小脳路、脊髄視床路、脊髄オリブ路などが知られている。これらを構成する脊髄神経がどのように産生されるのか、については精力的に研究されており、その機構の詳細が明らかになっている。しかしながら、個体発生の過程において、これら脊髄上行路を構成する神経群が産生された後、いつどのように軸索を伸ばして標的に到達するのか、すなわち、脊髄上行路の形成過程については、技術的困難もあってほとんど知られていない。そこで、我々は、発生中の脊髄にアクセス可能なニワトリ胚をモデルに、電気穿孔法による遺伝子導入を用いた特定の体節由来の神経軸索の高感度な可視化法を開発し、脊髄上行路形成過程の解析を進めてきた。これまでに、腰仙髄部の体節LS2から発する上行性脊髄神経群の軸索伸長過程について解析し報告しているが、脊髄は、頸部・上腕部・胸部・腰仙髄部の4つの領域に大別されており、それぞれを発する上行路の形成過程が全て同様とは限らない。そこで、頸部・上腕部・胸部・腰仙髄部を発する上行路の形成過程、すなわち、脊髄上行路形成過程の全容を明らかにする目的で、C7（頸部）・C14（上腕部）・T4（胸部）・LS2（腰仙髄部）に由来する上行性脊髄神経軸索の伸長過程の解析を行った。

【対象・方法】

ニワトリ胚脊髄のC7, C14, T4, LS2に対して、それぞれHH12, HH14, HH16, HH18（HH: Hamburger-Hamilton stage）において、in ovo エレクトロポレーションを行い、前述の各単体節の神経前駆細胞に局限して耐熱性ヒト胎盤アルカリホスファターゼ発現ベクターを片側性に導入した。それらの胚をHH26~HH40において固定し、65°Cで内在性アルカリホスファターゼを失活させたのちに、ホールマウントでのアルカリホスファターゼ活性染色により走行軸索を可視化し、脊髄上行神経の軸索伸長過程を解析した。さらに、本解析では軸索の伸長距離を単体節程度の分解能で計測できるため、HH26-HH30の各体節由来の軸索伸長速度を算出し、解析した。検定にはstudentのt検定を用い、 $p < 0.05$ の時、統計的に有意とみなした。

【結果】HH25までに、各体節由来の交連軸索が現れて伸長し、C14、T4、LS2に由来する軸索群は、背側と腹側の2つに大別できる経路をたどって上行していた。C7に由来する軸索は主として背側を走行し、一部の軸索が腹側を走行していた。上行性の非交連軸索はHH25-26より観察され、のちに背側を走行していた。HH28には腹側を走行する軸索の集団が出現し、HH29でより明瞭になった。HH29-30までに交連・非交連神経軸索は共に延髄に到達し、LS2・T4・C14に由来する軸索の一部は形成中の小脳に進入し、残りの大部分は上髄帆に到達した。小脳に進入した交連軸索群（前脊髄小脳路に相当する）は、LS2に由来するものはHH33に小脳正中線上で再交差し、T4、C14由来のものはHH35で再交差した。LS2に由来する前脊髄小脳路神経軸索については、以前報告したように、HH36からII-III葉への投射が観察されたが、T4に由来する前脊髄小脳路軸索は、同時期には外部からはほとんど視認されず、HH39になってIII葉への投射が観察されるようになった。C7、C14に由来する神経軸索の小脳への投射は、今回の手法ではほとんど観察されなかった。上行する神経

軸索群の伸長速度は50~100 $\mu\text{m}/\text{h}$ であり、各体節間において顕著な差異は認められず、それぞれ発生の進行に伴って加速する傾向を認めた。ただし、一部の体節に由来する軸索群は、特定の発生ステージにおいて顕著な速度変化が観察された。例えば、LS2に由来する交連および非交連神経軸索群の伸長速度はHH27と比較してHH28で有意に増加した（交連背側： $p < 0.001$ ；交連腹側： $p = 0.006$ ；非交連： $p = 0.049$ ）。一方でT4に由来する軸索群においては、非交連神経では有意に低下していた（非交連： $p < 0.001$ ）。

【結論】 脊髄上行路形成の初期過程について、ニワトリ胚をモデルとしてその全容を明らかにした。その結果、脊髄上行路を構成する神経群は、基本的には由来する領域・体節間で類似した経路を取る一方で、その伸長過程や小脳への投射には差異が存在することが明らかになった。また、伸長速度が調節されることによって、異なる領域由来の軸索群が上腕部や延髄・小脳へタイミングを揃えて進入できているように見えることから、こうした調節は、適切な神経回路の構築に重要な役割を果たしていることが想定された。今回明らかになった軸索伸長の過程や標的の差異は体節固有のアイデンティティを反映していると推測される。こうした解析結果をもとにして、体節固有のアイデンティティがどのように付与されているのか、Hox遺伝子群などの体節アイデンティティの決定に関わる因子群の役割等の解析が進められることが期待される。

令和3年11月16日に行われた学位論文審査委員会において、以下に示す質疑応答が行われた。

- (1) 今回観察された脊髄小脳路の背側路が、ヒトでいう後脊髄小脳路に相当すると考えてよいのか。
→そのように認識している。
- (2) 脊髄視床路はラベリングされているのか。
→今回の系においてもラベリングされている可能性があるとは考えているが、投射位置が深部となるため、追跡できておらず、今回の系では確認はできていない。
- (3) ヒトでいう後索路を走行する経路は観察されていないという認識であっているのか。
→相同する位置を走行する軸索群は観察されなかった。
- (4) 軸索伸長速度が増加する理由として何が考えられるのか。
軸索ガイダンス因子等により伸長が制御されているのではないかと考えている。
- (5) C7の軸索のラベリングが不十分であった理由は何が考えられるのか。ステージを変えることはできるのか。
→エレクトロポレーションを行うステージの問題でエレクトロポレーション効率が低下したためと考えているが、早いステージだと胚が小さすぎてエレクトロポレーションが困難で、遅いステージだと首が太くなりまた首がねじれてくるので、技術的に困難であった。
- (6) 上位頸髄で腹側と背側の経路が合流し、再度脳幹部で背側と腹側に別れる経路について、腹側と背側が交差しているのか、それとも、そのままなのか。また、脳幹部で経路が分離するメカニズムはどういうことが考えられるか。
→交差するのかどうかということは今回確認できていない。脳幹部での経路のメカニズムとしては、roboが関与するという報告があり、軸索反発因子が関与が考えられる。
- (7) HHステージは1ステージほどの程度の時間に相当するのか。
→HH25頃においては約12時間程度である。より遅いステージだと幅が増えていき24時間程度となる。
- (8) エレクトロポレーションを行う時期はどのように決定したのか。
→体節が形成される次期を選択した。
- (9) 今回EGFPは使用しているか。
→EGFPの配列が組み込まれていたプラスミドの骨格を使用した。最終的にEGFP部分は切り出しており、今回の解析には使用していない。
- (10) 非交連神経より交連神経が先行して伸長する意義はどういったものが考えられるか。
→先行する交連神経を足掛かりにして非交連神経が伸長するのではという仮説を考えているが、それだけでは説明困難な部分もあり、今後の課題と考えている。
- (11) N数が3-15と大きく違う理由は何か。
→特にC7のエレクトロポレーションが技術的に困難で、観察に適したサンプル数が限られた、という経緯がある。
- (12) 下降路もラベリングされているのか。
→今回の解析結果には含めていないが、この系において下降路も観察された。
- (13) ソニックヘッジホグなどの濃度勾配によって軸索伸長が制御されている可能性はあるか。
→軸索ガイダンス因子の濃度勾配により軸索伸長が制御されている可能性があると考えている。
- (14) 今後どのようにこの研究を発展させていくのか。
→脊髄損傷等に対する脊髄再生医療への応用の礎になればと考えている。特にHoxとの関連について解析していきたい。

など、多くの質疑・応答が行われた。申請者はそのいずれにも適確に応答し、医学博士の学位授与に値する十分な見識と能力を有するものと認められた。

掲 載 誌 名	Brain Research 第1768巻, 第147595号		
(公表予定) 掲 載 年 月	2021年	10月	出版社(等)名 Elsevier

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。