

乙 第 号

江浦 信之 学位請求論文

審 查 要 旨

奈 良 県 立 医 科 大 学

論文審査の要旨及び担当者

	委員長	教授	中瀬 裕之
論文審査担当者	委員	教授	川口 昌彦
	委員(指導教員)	教授	杉江 和馬

主論文

Brainstem organoids from human pluripotent stem cells

ヒト多能性幹細胞を用いた脳幹オルガノイドの開発

Nobuyuki Eura, Takeshi K. Matsui, Joachim Luginbühl, Masaya Matsubayashi,
Hitoki Nanaura, Tomo Shiota, Kaoru Kinugawa, Naohiko Iguchi, Takao Kiriyama,
Canbin Zheng, Tsukasa Kouno, Yan J. Lan, Pornparn Kongpracha,
Pattama Wiriyasermkul, Yoshihiko M. Sakaguchi, Riko Nagata, Tomoya Komeda,
Naritaka Morikawa, Fumika Kitayoshi, Miyong Jong, Shinko Kobashigawa,
Mari Nakanishi, Masatoshi Hasegawa, Yasuhiko Saito, Takashi Shiromizu, Yuhei
Nishimura, Takahiko Kasai, Maiko Takeda, Hiroshi Kobayashi, Yusuke Inagaki,
Yasuhito Tanaka, Manabu Makinodan, Toshifumi Kishimoto, Hiroki Kuniyasu,
Shushi Nagamori, Alysson R. Muotri, Jay W. Shin, Kazuma Sugie, Eiichiro Mori
Frontiers in Neuroscience. 2020 Jun 26;14:538. doi: 10.3389/fnins.2020.00538.

論文審査の要旨

脳幹は大脳皮質、大脳基底核などとのネットワークを形成する多くの神経核および線維路を有し、意識、心拍、血圧、呼吸などの生命維持に不可欠な機能を有している。したがって、変性疾患や脳血管障害、腫瘍など、脳幹を侵す疾患は死に直結する可能性がある。脳幹を侵す疾患の発症機序の解明および新たな治療法の確立のためには、ヒト脳幹組織を再現するモデルが必要である。近年、多能性幹細胞を分化誘導することにより様々な臓器を模したオルガノイドが開発されているが、脳幹オルガノイドは未開発であった。そこで、本研究では脳幹オルガノイドの作製を目的とし、得られたオルガノイドに対して定量 PCR、免疫組織化学染色、質量分析法、RNA-sequencing、一細胞 RNA-sequencing、パッチクランプ法を行うことにより、そのフェノタイプを評価した。

申請者はヒト ES 細胞に複数の成長因子を加え、振盪下での培養を行うことにより、1 か月という短期間で、特徴的な黒色成分を伴う脳オルガノイドを作製することに成功した。この黒色斑は、免疫組織化学染色 (IHC) によって、神経堤由来のメラノサイトであることがわかった。さらに、定量 PCR、IHC から中脳ドパミン産生細胞に由来する tyrosine hydroxylase、橋に由来する GBX2、延髄に由来する ChAT を同定した。質量分析法では、中脳、橋、延髄に特異的な蛋白の発現を同定した。パッチクランプ法では、得られたオルガノイドが電気生理学的活性を有していることが示された。RNA sequencing、一細胞 RNA sequencing では、脳幹成分に加え、大脳基底核や小脳、視床下部に関連する遺伝子の発現を同定した。以上の結果、申請者が作製したオルガノイドは脳幹成分を有し、かつ脳幹周囲に存在する神経堤由来の成分をも含有することが示唆された。脳幹オルガノイドを利用することにより、これまで疾患モデル化できなかった、脳幹を侵す神経疾患の再現が可能となり、病態解明や治療法開発における強力なツールとなることが期待される。公聴会では、審査委員から「新規脳幹モデルでありモデルの再現性」の問題や「病態モデルを作成の手順」等の質問があり、「ES 細胞ではある程度統一されたフェノタイ

プのオルガノイドが得られているが、iPS 細胞ではオルガノイド間で一定しないものがあり、品質を均一化することが今後の課題であること」や「「遺伝子をノックアウトした ES 細胞からオルガノイドを作製することで、そのオルガノイドが有する遺伝子や蛋白発現を wild type と比較することが可能」という答えであった。公聴会における質疑応答も納得できるもので、副論文も併せて学位に値すると認めます。

参 考 論 文

1. A juvenile sporadic amyotrophic lateral sclerosis case with P525L mutation in the FUS gene: A rare co-occurrence of autism spectrum disorder and tremor.
Nobuyuki Eura, Kazuma Sugie, Naoki Suzuki, Takao Kiriyama, Tesseki Izumi, Naoko Shimakura, Masaaki Kato, Masashi Aoki.
Journal of Neurological Sciences 2019 Mar 15;398:67-68.
2. Anti-cytosolic 5'-nucleotidase 1A (cN1A) positivity in muscle is helpful in the diagnosis of sporadic inclusion body myositis: A study of 35 Japanese patients.
Nobuyuki Eura, Kazuma Sugie, Kaoru Kinugawa, Hitoki Nanaura, Hiroya Ohara, Naoki Iwasa, Ryogo Shobatake, Takao Kiriyama, Tesseki Izumi, Hiroshi Kataoka, Satoshi Ueno.
Journal of Neurology and Neuroscience 2016 7:5
3. Characteristic dysphagia as a manifestation of dermatomyositis oropharyngeal muscle imaging.
Nobuyuki Eura, Kazuma Sugie, Takao Kiriyama, Satoshi Ueno.
Journal of Clinical Rheumatology 2015 Mar;21(2):105-6.

以上、主論文に報告された研究成績は、参考論文とともに臨床神経筋病態学の進歩に寄与するところが大きいと認める。

令和2年12月8日

学位審査委員長

脳神経機能制御医学

教授 中瀬 裕之

学位審査委員

侵襲制御・生体管理医学

教授 川口 昌彦

学位審査委員(指導教員)

臨床神経筋病態学

教授 杉江 和馬