

第 8 号様式

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)	氏名	光原 崇文
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論 文 題 目			
<p>Simulated microgravity facilitates cell migration and neuroprotection after bone marrow stromal cell transplantation in spinal cord injury</p> <p>(微小重力環境は脊髄損傷における骨髄間質細胞移植において細胞の遊走と神経保護を促進する)</p>			
論文審査担当者			
主 査 教 授	橋本 浩一		
審査委員 教 授	越智 光夫		
審査委員 教 授	瀧原 義宏		
〔論文審査の要旨〕			
<p>再生医療の細胞移植治療のソースとして、骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cells : 以下, BMSCs) は、間葉系幹細胞を含み多分化能を持つことが報告されており、神経再生医療分野でも注目されている。本研究では微小重力環境を応用して BMSCs を培養して誘導された細胞の性状を明かにし、その神経再生・保護効果をラット脊髄損傷モデルを用いて検討した。</p> <p>材料と方法としては 5 週齢 Fischer/F344 ラットの大腿骨と脛骨より骨髄細胞を採取し、接着細胞を培養細胞 (rBMSCs) として、1G 環境下にて 7 日間培養を行った群 (1G 群) と、3D-clinostat を使用した $10^{-3}G$ の模擬微小重力環境下にて 7 日間培養を行った群 (CL 群) に分けた。各群で形態学的観察を行うとともに、<i>Oct-4</i> (未分化マーカー)、<i>CXCR4</i> (細胞遊走因子受容体マーカー)、<i>NGF</i> および <i>BDNF</i> (神経栄養因子) の発現を RT-PCR で観察した。また各群で免疫染色にて <i>CXCR4</i> 陽性率を算出した。続いて成体雌ラットに Weight drop method により Th10 レベルに均質な脊髄損傷を作成し、1G/CL 両群で移植直前に PKH26 にて標識した rBMSCs を移植した。移植実験群 (n=29) は、①脊髄損傷直後に PBS の静脈注射を行ったラットをコントロール群 (以下, Cont 群, n=11)、②1G 環境下で 7 日間培養をした rBMSCs</p>			

を脊髄損傷直後に移植したラット(1G群, n=11), ③模擬微小重力環境下で7日間培養した rBMSCs を脊髄損傷直後に移植したラット (CL群, n=7) の3群に分けた。細胞移植は尾静脈より一匹あたり 3.0×10^5 個の rBMSCs を経静脈投与した。脊髄損傷から21日間, 後肢運動機能評価を BBB scale, inclined plane task score を用いて行い, その後脊髄を摘出して凍結標本とし H&E 染色にて形態観察した。また NF-H(神経細胞分化マーカー) と GFAP (グリア細胞分化マーカー) の蛍光免疫染色及びアポトーシス促進マーカーとして Bax, アポトーシス抑制マーカーとして Bcl-2 と Survivin を脊髄組織で免疫染色を行った。統計解析はマン・ホイットニーの U 検定を使用した。

結果は以下のごとくまとめられる。CL群では1G群に比べ小型で球形の細胞が多く, *Oct-4* と *CXCR4* の mRNA の発現が強くみられた。*NGF*, *BDNF* の発現は両群で差はみられなかった。CL群では免疫染色において *CXCR4* 陽性率が有意に高かった ($p < 0.01$)。移植後のラットの運動機能変化は CL群で他の2群と比較し有意な改善がみられた ($p < 0.01$)。脊髄損傷21日後の H&E 染色では, 3群共に脊髄後索から中心部の損傷と組織の空洞化が観察された。空洞面積率は CL群で有意に小さかった ($p < 0.05$)。細胞移植をした1G群と CL群では, 脊髄損傷部周囲に PKH26 の赤色蛍光を発する移植細胞が観察された。CL群では移植細胞がより多く集簇して観察された。移植細胞の一部では, NF-H および GFAP の発現が観察された。脊髄損傷領域及び周辺部において, CL群では Bax 陽性率が他の2群より有意に低く ($p < 0.01$), Survivin 陽性率は Cont群と比較して有意に高かった ($p < 0.01$)。

本研究では脊髄損傷直後に異なる重力環境下で培養した rBMSCs を移植し, その移植効果を検討した。微小重力下では未分化性が維持される可能性が示唆され, また *CXCR4* の発現が強くみられた。脊髄損傷後切片では, 標識された移植 rBMSCs 細胞が CL群で多く集簇して観察された。これらより, 微小重力環境下での培養は, rBMSCs の細胞遊走能を促進する可能性が示唆された。rBMSCs 移植を行ったラットの後肢運動機能は, 3週間の観察期間に CL群で有意に改善した。移植された rBMSCs 細胞には NF-H, GFAP の発現がみられ, 神経組織へ分化していることが確認された。両群で移植細胞は *NGF*, *BDNF* の神経栄養因子を発現しており, CL群では脊髄損傷後の空洞形成が有意に小さく, また損傷部脊髄においてアポトーシスがより抑制されていた。rBMSCs 移植による神経保護効果により神経組織の二次的損傷が抑制され組織の再生が促されている可能性が示唆された。

以上の結果から, 本論文は模擬微小重力環境下で培養した BMSC は未分化性と遊走能に優れ, 脊髄損傷モデルラットに移植することで, 損傷部の組織回復と運動機能回復を有意に改善することを明らかにした。今後の再生医療のアプローチとして大いに貢献されると判断する。よって審査委員会委員全員は, 本論文が申請者に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。