

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	前田 雄洋
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 Transplantation of rat cranial bone-derived mesenchymal stem cells promotes functional recovery in rats with spinal cord injury (ラット頭蓋骨由来間葉系幹細胞移植は脊髄損傷モデルラットにおいて機能回復をもたらす)			
論文審査担当者			
主査	教授 東 幸仁	印	
審査委員	教授 橋本 浩一		
審査委員	准教授 亀井 直輔		
〔論文審査の結果の要旨〕 脊髄損傷は、恒久的な機能障害を引き起こす重症な疾患であるが、効果的な治療方法は確立されていない。近年、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) を用いた細胞移植による再生医療が脊髄損傷に対する新たな治療戦略として注目されている。また、MSCs は、骨髄や脂肪組織など様々な組織から樹立が可能である一方で、その供給源によって性質が異なることが報告されている。MSCs を用いた再生医療において、供給源選択は重要である。我々はすでに、神経堤由来である頭蓋骨から MSCs を樹立することに成功し、その性質として、骨髄や脂肪組織由来の MSCs と比較して、神経栄養因子の発現が高いことを報告している。頭蓋骨由来 MSCs は、脊髄損傷など中枢神経系疾患への応用が期待されるが、脊髄損傷モデルへの移植効果は証明されていない。本研究では、脊髄損傷モデルラットにおけるラット頭蓋骨由来 MSCs (rat cranial bone-derived MSCs, rcMSCs) による急性期移植効果の実証と、その作用機序の解明を目的とした。比較対象は、ラット長管骨由来 MSCs (rat bone marrow-derived MSCs, rbMSCs) とした。rcMSCs と rbMSCs は、それぞれラットの頭蓋骨と脛骨・腓骨骨髄から樹立した。 この rcMSCs と rbMSCs を用いて以下の 4 系統の実験を行った。 実験①では、rcMSCs と rbMSCs の両者において、real-time PCR 法を用い神経栄養因子である Bdnf, Gdnf, Ngf, Vegf と抗炎症サイトカインである Tgf- β と Tsg-6 の解析を行った。結果として、rcMSCs は rbMSCs と比較して Bdnf, Gdnf, Vegf の発現が有意に高かった。 実験②では、脊髄損傷 (SCI) モデルラットを作成し、control 群(n=11: PBS 投与のみ)、rcMSCs 群(n=11: rcMSCs 移植)と rbMSCs 群(n=11: rbMSCs 移植)の 3 群に振り分けた。MSCs の移植は、尾静脈から SCI 作成の 24 時間後に行い、移植細胞数は 1.0×10^6 個とした。神経機能回復の評価には行動学的評価として、BBB scale と inclined plane task score を、電気生理学的評価として、motor evoked potential (MEP)を測定し波形の振幅の回復率を計算、それぞれ 3 群間で比較をおこなった。また移植後 28 日目の脊髄組織を回収し、損傷部位の評価として脊髄での空洞形成の程度から、cavity rate を計算し、3 群間で比較を行った。結果として、行動学的評価、電気生理学的評価において rcMSCs 群は他の 2 群と比較して有意な改善を認めた。組織学的評価に関しても、rcMSCs 群は他の 2 群と比較して、cavity rate が有意に小さい結果を認めた。 実験③では SCI モデルラットを作成し実験②同様に、control 群(n=7)、rcMSCs 群(n=6)と rbMSCs 群(n=6)の 3 群に振り分けた。MSCs の移植は尾静脈から SCI 作成の 24 時間後に行った。移植後 24 時間後に損傷部の脊髄組織を摘出し、real-time PCR 法を用い Bax/Bcl2 比、Caspase-3, TNF- α や IL-1 β の解析を行った。結果として、rcMSCs 群では control 群と比較して TNF- α や IL-1 β の発現が有意に低かった。 実験④では rcMSCs と rbMSCs の馴化培地(conditioned medium, CM)をそれぞれ			

れ作成した。酸化ストレスおよび炎症性ストレスに暴露したマウス神経芽細胞腫/ラットグリオーマ細胞 (NG108 細胞) にそれぞれの馴化培地を加えた rcMSC-CM 群と rbMSC-CM 群, 通常の増殖培地のみ control 群をそれぞれ作成し, 3 群間で生存率を比較した。さらに, real-time PCR 法を用い, アポトーシス経路に参与する因子である Bax/Bcl2 比, caspase-3 やネクロトーシス経路に参与する因子である Tnfrsf1, TLR4, MLKL の解析をおこなった。結果としては, 炎症ストレス, 酸化ストレス暴露双方において, rcMSC-CM 群は, control 群と比較して, NG108 細胞の生存率は有意に高値であった。また, rcMSC-CM 群は, control 群と比較して, 炎症ストレス下では, Tnfrsf1, TLR4 や MLKL が有意に低く, 酸化ストレス下では, Bax/Bcl2 比や caspase-3 が有意に低値であった。

本研究では, 既知の報告同様に, rcMSCs の性質として高い神経栄養因子の発現が確認できた。また, SCI に対する rcMSCs の急性期移植効果を, すでに確立されている行動学的評価項目で実証するとともに, 我々が, 近年報告している経時的な MEP 測定技術を応用し, 電気生理学的に, rcMSCs 移植による神経機能回復効果を確認することができた。rcMSCs の脊髄損傷組織への作用機序については, 実験③, ④の結果から, アポトーシス経路やネクロトーシス経路への抑制作用を介した抗細胞死効果が示唆された。実験①で, rcMSCs において, 高い発現を認めた Bdnf, Gdnf, Vegf といった神経栄養因子については, 炎症抑制, 神経保護作用だけでなく, 上記した細胞死経路への抑制作用が既に報告されている。急性期移植を行った rcMSCs は, その高い神経栄養因子の発現を介し, 急性期脊髄損傷組織において, 抗炎症・抗細胞死作用を発揮することで, 脊髄損傷による組織破壊を抑制し, 高い神経機能回復や最終的な脊髄組織における cavity rate の縮小につながったものと考えられた。

本研究は, 頭蓋骨由来 MSCs の脊髄損傷への急性期移植効果の有用性を示し, 今後の頭蓋骨由来 MSCs の臨床応用への礎となる治験であった。よって審査委員会委員全員は, 本論文が前田雄洋に博士(医学)の学位を授与するのに十分な価値あるものと認めた。