

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 内田彩子

本研究は多能性の機能を有すると考えられているヒト羊膜上皮細胞の神経細胞死抑制作用を明らかにするため、培養ラット皮質ニューロン・培養ラット網膜神経節細胞を用いて、中枢神経細胞の細胞死抑制作用の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒト羊膜上皮細胞と羊膜組織には、RT-PCRにより、神経栄養因子である brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), nerve growth factor (NGF)が検出された。また、酵素免疫法により、ヒト羊膜上皮細胞の培養上清中には BDNF と NT-3 が検出された。羊膜の凍結切片を用いた免疫組織化学染色では、抗 NGF 抗体と抗 NT-3 抗体により、羊膜上皮が特異的に染色された。以上のことから、ヒト羊膜上皮細胞は神経栄養因子を合成・分泌することが判明した。
2. ヒト羊膜上皮細胞の培養上清は、ラット大脳皮質ニューロンに対して、神経細胞死抑制作用を有することが示された。その他の因子では epidermal growth factor (EGF)と activin A に神経細胞死抑制作用が認められたが、培養上清の神経細胞死抑制作用の方が統計学的に有意に高かった。BDNF、NT-3、NGF、basic fibroblast growth factor (bFGF)、insulin like growth factor (IGF- I)、ciliary neurotrophic factor (CNTF)、interleukin-2 (IL-2)には神経細胞死抑制作用

用は認められなかった。ヒト羊膜上皮細胞が分泌すると報告されている神経伝達物質 dopamine、norepinephrine と、BDNF、NT-3 を同時に添加した場合、神経細胞死抑制効果は認められなかった。ヒト羊膜上皮細胞の培養上清の神経細胞死抑制効果は、既知の生理活性物質の相乗効果であることは否定できないが、培養上清中には新規の生理活性物質が含まれている可能性が示唆された。

3. ヒト羊膜上皮細胞培養上清で培養したラット大脳皮質ニューロンは、TUNEL 染色陽性細胞が減少した。ヒト羊膜上皮細胞培養上清はアポトーシス抑制効果を有することが示唆された。
4. 単離精製した培養ラット網膜神経節細胞に対して、ヒト羊膜上皮細胞の培養上清は神経細胞死抑制効果を有することが示された。培養上清には BDNF, NT-3, CNTF より顕著な神経細胞死抑制効果が認められた。このことから、ヒト羊膜上皮細胞は BDNF, NT-3, CNTF 以外の何らかの生理活性物質を分泌することが示唆された。
5. これら 2 種類の培養中枢神経細胞（大脳皮質ニューロンと網膜神経節細胞）に対し、ヒト羊膜上皮細胞培養上清中の低分子分画 (< 30 kDa) に神経細胞死抑制活性が存在することを明らかにした。

以上、本論文はヒト羊膜上皮細胞が神経栄養因子を合成・分泌する能力を有することを明らかにした。また、ヒト羊膜上皮細胞の培養上清が培養中枢神経細胞に対し、神経細胞死抑制効果を有することを明らかにした。本研究は、免疫原性が少ないことが報告されているヒト羊膜上皮細胞による中枢神経変性疾患（網膜神経節細胞変性疾患を含む）の新たな治療法の発展に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。