

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鍾 承澍

近年、重度の脊髄損傷（SCI）に対する幹細胞移植療法が注目されている。用いる幹細胞として、間葉系幹細胞（MSCs）は採取が比較的容易で、倫理的問題や腫瘍原性も少なく、経済的側面からも獣医療で最も実用的な細胞と考えられる。SCI への MSCs 移植は神経細胞の補充や神経栄養因子の分泌などの効果が報告されているが、近年、MSCs を神経幹/前駆細胞の集合体であるニューロスフェア（NS）へ分化させると、より効率的に神経細胞を誘導できることが示された。一方、MSCs の細胞源として骨髄や脂肪組織が広く研究されているが、SCI 治療に最適な細胞源は不明である。そこで、本研究では犬の骨髄由来間葉系幹細胞(cBMMSCs)と脂肪組織由来間葉系幹細胞(cADMSCs)、および両 MSCs から誘導した NS を用い、神経細胞分化および神経栄養因子の分泌を評価・比較し、犬の SCI 治療への有用性を検討した。

まず第 2 章では、幹細胞としての性質を評価するため、cBMMSCs と cADMSCs の増殖能および Nestin、βIII-tubulin、GFAP、NCAM（神経系マーカー）と NANOG、OCT4、SOX2（幹細胞マーカー）の発現を比較した。さらに脂肪・骨・軟骨への分化誘導を行った。その結果、両細胞で Nestin、βIII-tubulin、NCAM、OCT4、SOX2 の発現が確認され、脂肪・骨・軟骨へも分化した。以上より、両細胞は幹細胞特性を持ち、神経系細胞への分化能を内在することが示唆された。一方 cADMSCs の細胞倍加時間は cBMMSCs より短く、短期間でより多くの細胞を得られる利点が示された。

次に第 3 章では、cBMMSCs と cADMSCs から NS を誘導し、その作製効率と第 2 章と同様のマーカー発現を比較した。Nestin、OCT4、SOX2 は定量的 RT-PCR により誘導前後の発現量も比較した。さらに、NS から神経細胞を誘導し、βIII-tubulin、GFAP、NF200、S100、MAP2、MBP、Nestin の発現を蛍光免疫染色で評価すると同時に、パッチクランプ法で電気生理学的評価を行った。その結果、両細胞から Nestin 陽性の NS が誘導され、Nestin、NANOG、OCT4、SOX2 の発現が上昇した。cADMSCs の作製効率は cBMMSCs の約 2 倍であった。神経細胞誘導により神経細胞様の形態を示す細胞が得られ、βIII-tubulin、GFAP、S100、NF200、MAP2 の発現も確認されたが、電気生理学的活性は陰性であった。機能的神経細胞の誘導には至らなかったが、NS で幹細胞マーカー発現が上昇し、神経様の細胞が誘導されたことから、NS 誘導による神経細胞分化能の上昇が示唆された。

第 4 章では cBMMSCs、cADMSCs および両 MSCs から誘導した NS (B-NS および A-NS) における NGF、BDNF の遺伝子発現と細胞外分泌を比較した。さらに、両 MSCs と PC12 の共培養系を用い、神経形成に対する効果を検討した。その結果、NS 誘導により、NGF の発現が低下した。BDNF 発現は cADMSCs のみで検出された。両 MSCs からの BDNF 分泌は検出されなかったが NGF 分泌は検出され、cADMSCs はより高い分泌能を示した。

また、両 MSCs は PC12 の神経形成を促進させたが、効果に差はなく、NGF 以外の因子の存在も考えられた。

最後に第 5 章では、B-NS および A-NS の *in vivo* での分化を評価した。健常ビーグル犬の第 2 腰椎レベルの脊髄に Hoechst33342 で標識した NS を移植後、14 日目に移植部位を摘出し、H&E 染色と MAP2、GFAP、MBP に対する蛍光免疫染色を行った。その結果、移植部位に Hoechst 陽性細胞が観察され、MAP2 陽性細胞は B-NS 群で 15%、A-NS 群で 8%、GFAP 陽性細胞は B-NS 群のみでみられ、3%が陽性であった。MBP 陽性細胞は観察されなかった。また、移植した細胞は 4mm 以上脊髄内を移動しており、高い運動能が示された。*in vitro* の結果と分化傾向は異なったが、犬 SCI でも NS 移植が有用である可能性が示された。

以上の結果から、犬の骨髄および脂肪由来間葉系幹細胞から誘導した NS では神経細胞分化能が上昇し、脊髄損傷に対する移植治療に有用である可能性が示された。また、細胞の増殖能や NS の作製効率、神経栄養因子の分泌能から cADMSCs はより有用性が高い細胞源と考えられた。

以上本研究は、脊髄損傷に対する間葉系幹細胞移植療法の有用性を、神経細胞分化能および神経栄養因子分泌能の面から示したものであり、学術上、臨床応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。