

## 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	阿美古 将
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 <b>Rat cranial bone-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes functional recovery in ischemic stroke model rats</b> （ラット頭蓋骨由来間葉系幹細胞移植は虚血性脳卒中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	岡本 泰昌	印
審査委員	教授	杉山 一彦	
審査委員	講師	高橋 哲也	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>虚血性脳卒中によって引き起こされる機能障害は治癒困難である。近年血管内治療等の進歩はあるがその効果は限定的である。以前より中枢神経疾患に対する間葉系幹細胞（mesenchymal stem cells, MSCs）を用いた細胞移植は注目されてきた。脳卒中モデルにおいて、MSCs は神経栄養因子を分泌することや障害された神経組織に遊走し内因性神経再生を惹起することが示されている。また、MSCs の特性としてその供給源によって性質が異なることが報告されており、MSCs を用いた移植治療において供給源選択は重要である。骨由来 MSCs は通常げっ歯類では長管骨から、ヒトでは腸骨から分離され、それらは中胚葉由来である。これに対して、MSCs の供給源として神経堤由来の頭蓋骨に着目し、以前にヒト頭蓋骨由来 MSCs（cMSCs）は腸骨由来 MSCs に比べ神経分化傾向が強いことを報告した。このことから頭蓋骨は中枢神経系疾患に対する細胞療法において有効な供給源となり得ることが予想される。しかしながら、cMSCs の治療効果についてはいまだ詳細に検討されていない。</p> <p>本研究では、虚血性脳卒中モデルラットにおけるラット頭蓋骨由来 MSCs（rcMSCs）による治療効果の実証を目的とした。比較対象はラット長管骨由来 MSCs（rbMSCs）とした。rcMSCs は付着組織を除去したラット頭蓋骨を 5mm 角に細切し、増殖培地に播種することにより得ることができた。rbMSCs はラット脛骨・腓骨骨髓から培養した。まず rcMSCs と rbMSCs の両者において FACS（MSC positive marker として CD29, CD90, CD44, MSC negative marker として CD34, CD45）と多系統への分化能（骨、軟骨、神経）の評価を行った。FACS において両者共に CD29, CD90, CD44 は positive, CD34, CD45 は negative であった。また両者共に多系統への分化能力を示し、これらのことから両者共に MSCs であることが確認された。これらの基本的な細胞性格の確認後、この rcMSCs と rbMSCs を用いて以下の 3 系統の実験を行った。統計学的解析として、mRNA 発現と細胞生存率については Mann-Whitney の U 検定を用い、神経機能評価については繰り返しのある二元配置分散分析を用いた。有意水準 p 値が 0.05 未満を統計的に有意とみなした。</p> <p>実験①：両者において real-time PCR 法を用い神経堤関連因子である <i>Snail, p75, Slug</i> と神経栄養因子である <i>Bdnf, Gdnf, Ngf</i> の mRNA 発現の解析を行った。実験②：中大脳動脈閉塞(MCAO)モデルラットを作成し、これに対して Ctrl 群, n=8: PBS のみ, rcMSCs 群, n=8: rcMSCs <math>1.0 \times 10^6</math>, rbMSCs 群, n=8: rbMSCs <math>1.0 \times 10^6</math> の移植を尾静脈から MCAO の 24 時間後に行った。神経機能評価としては修正神経学的重症度スコア(mNSS)を用いた。また移植 24 時間後に脳を摘出して、遊走細胞に対する組織学的検討を行った。実験③ rcMSCs と rbMSCs の馴化培地をそれぞれ作成した。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 (NG108-15) にそれぞれの馴化培地を加えた群において生存率と real-time PCR 法を用い</p>			

た *Bax/Bcl2* 比の解析を行った。

結果は以下の如くまとめられる。実験① *Snail* と *p75* の発現が rcMSCs で有意に高く (*Snail*: n=6, p<0.01; *p75*: n=6, p<0.05, *Slug*: n=6, p=0.083), 同様に *Bdnf* と *Ngf* の発現が rcMSCs で有意に高かった (*Bdnf*: n=6, p<0.01; *Gdnf*: n=6, p=0.057; *Ngf*: n=6, p<0.05)。実験② MCAO 後 4 日, 7 日, 14 日, 21 日, 28 日にて rcMSCs 群で Ctrl 群, rbMSCs 群に比し mNSS の有意な改善が見られた。移植 24 時間後に摘出した脳組織切片における脳梗塞部位に, PKH でラベルした rcMSCs と rbMSCs は, 共に遊走していることが確認できたが, その細胞数はわずかであった。実験③ rcMSCs 馴化培地を加えた群において生存率は有意に高かった (酸化ストレス暴露: n=6, p<0.05; 炎症性ストレス暴露: n=6, p<0.01)。また, rcMSCs 馴化培地を加えた群において *Bax/Bcl2* 比は有意に低かった (酸化ストレス暴露: n=6, p<0.01; 炎症性ストレス暴露: n=6, p<0.01)。

BDNF, NGF の炎症抑制, アポトーシス抑制効果は過去の文献にて散見される (Matsuda, et al., 2015; Liu, et al., 2010; Sekine, et al., 2012; Kirkland, et al., 2007)。実験①にて rcMSCs は神経栄養因子を豊富に発現することが示唆され, これは rcMSCs が神経堤由来であることに起因すると考えられた。実験②にて MCAO モデルに対する rcMSCs の移植効果は rbMSCs よりも高く, rcMSCs の豊富な神経栄養因子分泌に起因する可能性が示唆された。実験③にて rcMSCs 馴化培地には rcMSCs から分泌された豊富な神経栄養因子の存在が示唆され, 虚血模擬環境に暴露された NG108-15 におけるアポトーシスの抑制と高い生存率につながったものと考えられた。

rcMSCs は, 豊富な神経栄養因子を分泌する能力を持ち, 虚血性脳卒中モデルラットへの移植にて有効な機能改善効果を示した。このことから頭蓋骨由来 MSCs は中枢神経障害に対する細胞移植において有力な選択肢となり得ることが示唆され, 今後ヒト頭蓋骨由来 MSCs を用いた更なる検討が期待される。

以上の結果から, 本論文は, 頭蓋骨由来 MSCs は中枢神経障害に対する細胞移植において有力な選択肢となり得る可能性を提示し, 今後の中枢神経疾患に対する頭蓋骨由来の未分化間葉系幹細胞による細胞移植療法への臨床応用の道を開いたことで高く評価される。

よって審査委員会委員全員は, 本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	阿美古 将
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
<p>論文題目</p> <p><b>Rat cranial bone-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes functional recovery in ischemic stroke model rats</b></p> <p>（ラット頭蓋骨由来間葉系幹細胞移植は虚血性脳卒中モデルラットにおいて機能回復をもたらす）</p>			
<p>最終試験担当者</p> <p>主査 教授 岡本 泰昌 印</p> <p>審査委員 教授 杉山 一彦</p> <p>審査委員 講師 高橋 哲也</p>			
<p>〔最終試験の結果の要旨〕</p> <p style="text-align: center;">判 定 合 格</p> <p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年8月2日の第75回広島大学研究科発表会（医学）及び平成30年7月31日本委員会において最終試験を行い、主として次の試験を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 先行する発表された論文(Honmou et al, 2011)結果の解釈</li> <li>2 ラット脳梗塞モデルにおいて移植早期から神経学的改善が得られる理由</li> <li>3 移植後脳梗塞周辺に遊走した後の移植細胞からの神経栄養因子の分泌の持続性</li> <li>4 骨髄由来の未分化間葉系幹細胞の採取部位による差異</li> <li>5 頭蓋骨由来骨髄間葉系幹細胞の多分化能に対する多面的評価方法</li> <li>6 ラット脳梗塞モデルの神経症状の改善の具体的評価法</li> </ol> <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			