

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（保健学）	氏名	大塚 貴志
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 Simulated Microgravity Culture Enhances the Neuroprotective Effects of Human Cranial Bone-Derived Mesenchymal Stem Cells in Traumatic Brain Injury （模擬微小重力培養は外傷性脳損傷におけるヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞の神経保護効果を高める）			
論文審査担当者			
主査	教授	田邊 和照	印
審査委員	教授	桐本 光	
審査委員	教授	砂川 融	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>再生医療に用いる細胞の有力な候補として，間葉系幹細胞（mesenchymal stem cells：以下，MSCs）が注目されている。諸家の研究において，MSCs の移植効果をより高めることを目的とした培養環境の検討が行われている。その中でも模擬微小重力（simulated microgravity：以下，MG）環境が注目されている。MG 環境での培養によって，細胞周期，増殖及び分化などの変化がもたらされることが知られている。</p> <p>また，脊髄損傷モデルに対し，MG 環境で培養した MSCs は，通常重力（以下，1G）環境で培養した MSCs よりも高い移植効果を示すことが報告されている。MG 環境での培養は，MSC の持つ能力をより高めると考えられるが，具体的な効果及び詳細な治療メカニズムについては不明である。</p> <p>本研究では，MG 環境で培養した MSCs を中枢神経疾患モデルに移植し，その効果の一つとして神経保護効果に着目して検討することを目的として以下の研究を行った。脳神経外科の手術の際に得られるヒト頭蓋骨片よりヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞(human cranial bone-derived MSCs：hcMSCs)を樹立し，1G 環境および MG 環境で培養した。その後，hcMSCs の遺伝子発現に重力環境の違いが与える影響について real-time PCR 法を用いて解析した。移植実験では，脳損傷モデルマウスを作成し，損傷翌日に細胞を経静脈移植した。実験群は，細胞を移植せず，生理食塩水のみを投与する群（PBS 群），1G 環境で培養した hcMSCs を移植する群（1G 群），MG 環境で培養した hcMSCs を移植する群（MG 群）の 3 群とした。細胞移植後に運動機能評価を実施した。移植後の脳損傷領域における炎症，酸化ストレスに起因する二次的損傷の変化を解析するため，移植翌日に脳を摘出した。脳損傷領域から mRNA およびタンパク質を抽出し，real-time PCR 法とウエスタンブロッティング法を用いて，炎症関連因子 Tnf-α およびアポトーシス関連因子 Bax および Bcl-2 の遺伝子およびタンパク質発現解析を行った。また，神経細胞 NG108-15 に対してリポ多糖によって炎症ストレスを，過酸化水素によって酸化ストレスを誘導し，中枢神経損傷後の二次的損傷を模した <i>in vitro</i> モデルを作成した。実験群は，ストレスに曝露された神経細胞に対して通常培地を与える群（コントロール群），1G 環境で培養した hcMSCs の培養上清を与える群（1G-CM 群），および MG 環境で培養した hcMSCs の培養上清を与</p>			

える群 (MG-CM 群)の 3 群とした。炎症および酸化ストレスに対する神経保護効果を生存率評価、遺伝子発現解析によって評価した。

MG 環境で培養した hcMSCs は、1G 環境で培養したものと比較して、神経栄養因子の一種である肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor : HGF)およびトランスフォーミング増殖因子- β (transforming growth factor- β : TGF- β)の遺伝子発現が高かった。*in vivo*での脳損傷モデルに対する移植研究では、PBS 群、1G 群と比較して、MG 群で有意に運動機能の改善が認められた。脳損傷領域の遺伝子発現解析およびタンパク質発現解析では、PBS 群と比較して、MG 群で炎症関連因子 Tnf- α の発現およびアポトーシスの指標である Bax/Bcl-2 比が抑制されていた。HGF はアポトーシスの抑制、TGF- β は抗炎症作用を有することが報告されており、MG 環境で培養した hcMSCs は HGF および TGF- β を介して急性期における二次的損傷の拡大を抑制し、その後の運動機能の改善に寄与した可能性が考えられる。*in vitro*では、コントロール群および 1G-CM 群と比較して、MG-CM 群で細胞生存率が高かった。また、遺伝子発現解析では MG-CM 群で炎症ストレスに対して炎症関連因子の発現が抑制され、酸化ストレスに対してはアポトーシスの指標である Bax/Bcl-2 比が抑制された。この結果は MG 環境で培養された hcMSCs のもたらす神経保護効果が高かったことを示唆しており、MG 環境での培養によって発現が増加した HGF および TGF- β が関与した可能性が示された。

以上、本論文はリハビリテーション医学に関係が深い中枢神経疾患に対する幹細胞を用いた新たな治療戦略において有益な示唆を与えるものと考えられる。このことから、本研究は保健学に資するものとして高く評価される。よって、審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (保健学) の学位を授与するのに十分な価値のあるものと認めた。