

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	黒瀬智之
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-cultured mesenchymal stem cells improve recovery following spinal cord ischemia in rats. （脊髄虚血-再灌流障害が引き起こす運動機能低下に対する微小重力培養間葉系幹細胞の効果）			
論文審査担当者 主査 教授 浦川 将 印 審査委員 教授 桐本 光 審査委員 教授 中西 一 義			
〔論文審査の結果の要旨〕 <p>胸腹部大動脈の手術時の虚血により，術後の患者に対麻痺が生じることが報告されている．このような虚血-再灌流による脊髄損傷後の運動機能低下は，間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cells:MSC）移植による改善が見込まれている．虚血-再灌流による脊髄損傷動物モデルにおいて，MSC がアポトーシスを抑制することで機能改善を導くことが報告されている．模擬微小重力環境で培養した間葉系幹細胞は，抗炎症作用や抗アポトーシス作用が高まることが報告されており，実験動物の中樞神経系損傷モデルに対して機能回復効果が示されている．ラットの脊髄虚血-再灌流モデルに対して，模擬微小重力で培養した間葉系幹細胞を移植し，運動機能改善のメカニズムを調べた．</p> <p>移植に使用したMSCは5週齢の雄性Sprague-Dawleyラットの大腿骨と脛骨の骨髓から採取した．採取した骨髓を増殖培養したのち，通常重力下で培養する群と模擬微小重力下で培養する群に分けて増殖させた．</p> <p>雄性SDラット（450-510g）をイソフルランで麻酔し，露出させた左大腿動脈からバルーンカテーテルを挿入した．鎖骨下動脈付近まで挿入後，バルーンを膨らませて脊髄を11分間虚血した．再灌流後，0.01Mリン酸緩衝生理的食塩水（Phosphate buffered saline: PBS, PBS群）か，MSCを血管内に注入した．移植に使用した細胞は，通常重力下（1G）で培養した細胞（MSC-1G群）か，模擬微小重力環境下（10^{-3}G）で培養した細胞（MSC-MG群）のいずれかを使用した．後肢の運動機能を観察し，Basso-Beattie-Bresnahan scale（BBBスケール）と傾斜板試験で評価した．虚血-再灌流術から1, 3, 7日後に脊髄を採取し，第5胸髄から脊髄円錐までを試料としてパラフィンブロックを作製した．パラフィン切片は，Hematoxylin & Eosin染色（HE染色）や免疫組織科学的染色による組織学的解析を行った．免疫組織科学的染色には，神経マーカーとしてマウス抗Tuj1抗体，アストロサイトマーカーとしてマウス抗GFAP抗体，アポトーシスマーカーとしてウサギ抗Caspase-3抗体，神経栄養因子のマーカーの一つとしてウサギ抗BDNF抗体を使用した．また別の個体から採取した脊髄からタンパク質を抽出し，ウェスタンブロットによる生化学的解析を行ってBDNFの量を調べた．培養細胞の一部はReal-time PCRによる生化学的解析を行って<i>Bdnf</i>mRNAの発現量を調べた．</p> <p>虚血-再灌流後，麻酔から覚醒したラット後肢の運動機能が著しく低下していた．両後肢</p>			

は弛緩性の麻痺を呈し、運動はみられなくなったが、MSC-1G 群や MSC-MG 群では徐々に後肢の関節運動がみられた。MSC-MG 群の後肢運動機能は、PBS 群に比べて有意な回復を示した。

HE 染色の顕微鏡観察では、虚血-再灌流 1 日後では、前角に小さい空洞化領域や浸潤細胞がわずかにみられた。3 日後には空洞化領域は拡大し、浸潤細胞は増加した。脊髓の損傷は限局的で、腰髄から仙髄で Tuj1 陰性部位が観察された。PBS 群に比べて、MSC-1G 群や MSC-MG 群の損傷領域は小さかった。

灰白質と白質の境界部付近でアストロサイトが多く観察された。MSC-1G 群や MSC-MG 群のアストロサイトに比べ、PBS 群のアストロサイトの突起は長かった。BDNF 陽性のアストロサイトが MSC-MG 群で多く観察され、ウェスタンブロットによる解析では、MSC-1G 群や MSC-MG 群で前駆体である proBDNF や成熟した mBDNF が増加していた。Caspase3 陽性細胞は、PBS 群に比べて MSC-1G 群や MSC-MG 群で少なかった。培養後の細胞の *Bdnf* mRNA の発現量は、MSC-1G 群と MSC-MG 群で有意差はなかった。

MSC を移植した群では後肢運動機能の改善がみられ、MSC-MG 群で PBS 群よりも有意な改善がみられた。PBS 群では脊髓前角の破壊が観察され、この部位の損傷が運動機能低下を起こしたと考えられる。MSC 移植群では PBS 群よりも Tuj1 陽性部位が保たれていたこと、つまり神経細胞や神経線維が残存したことや、Caspase3 陽性細胞数が減少していたことは、MSC のアポトーシス抑制効果により脊髓の破壊が抑えられ、後肢運動機能の改善に貢献したと考えられる。特に MSC-MG 群では BDNF が高発現しており、脊髓前角のアストロサイトが放出する BDNF が抗アポトーシス効果をもたらしたと考えられる。移植前の細胞の BDNF 発現量に差はなく、他の炎症性サイトカインや栄養因子が生体内でアストロサイトを活性化させたと考えられる。

以上の結果から、本論文は模擬微小重力環境下で培養した間葉系幹細胞が脊髓損傷後の機能回復に対して効果を有することを示唆し、脊髓損傷への治療に対する発展に寄与すると考える。

よって審査委員会委員全員は、本論文が黒瀬智之に博士(保健学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。