

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	寺西 正貴
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
論文題目 Hypergravity enhances RBM4 expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and accelerates their differentiation into neurons (過重力環境はヒト骨髄由来間葉系幹細胞における RBM4 発現を高め神経分化を促進する)			
論文審査担当者			
主査	教授 桐本 光	印	
審査委員	教授 藤田 直人		
審査委員	准教授 宮崎 充功		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>これまでに様々な物理的刺激が、幹細胞の増殖や分化に関与する分子カスケード内の生化学的シグナルを制御し、組織の構造や機能が変化することが明らかにされてきた。近年、物理的刺激の中でも重力に着目した研究が注目されている。宇宙空間での重力環境を再現した模擬微小重力（MG：$10^{-3}G$）環境が細胞レベルで人体に影響を与え、幹細胞の分化制御や形態構造の変化にも関与しているという報告が増加している。先行研究において、幹細胞の分化制御が幹細胞の移植効果を向上させるために極めて重要であることが指摘されている。これまでに、MG 環境が間葉系幹細胞（MSCs）の未分化維持に有用であること、中枢神経系疾患モデルの運動機能改善効果を高めること、MSCs の神経分化に影響を与える可能性があることが示されてきた。</p> <p>一方、通常重力（1G）環境よりも重力負荷を加えた過重力環境が、MSCs の分化制御において、骨および筋芽細胞への分化を促進するという報告があるものの、神経再生に関わる神経分化に及ぼす影響については明らかにされていない。そこで、本研究では 1G または過重力（3G）環境下で、MSCs の神経分化を誘導し、それぞれの神経分化能を比較、検討した。</p> <p>ヒト骨髄由来 MSCs（hbMSCs）を実験に使用し、重力制御装置 Gravite®を用いて、1G または 3G 条件下で 10 日間の神経分化誘導を行い、それぞれを 1G 群および 3G 群とした。誘導 3、10 日後にそれぞれの条件下で分化誘導した hbMSCs を回収し、トリパンブルー染色により細胞数と生存率を計測した。また、回収した hbMSCs から total RNA を抽出し、相補的 DNA（cDNA）を作製した。リアルタイム-ポリメラーゼ連鎖反応（Real time-PCR）を用いて、神経細胞関連遺伝子としてネスチン（NES）、クラス IIIβ チューブリン（TUJ1）、ASCL1、微小管結合タンパク質 2（MAP2）、ニューロフィラメント中鎖（NF-M）、ニューロフィラメント重鎖（NEFH）の発現を、神経分化制御遺伝子として RNA 結合タンパク質 4（RBM4）、ポリピリミジン配列結合タンパク質（PTB）、ピルビン酸キナーゼ M1、2（PKM1、2）の発現量を解析した。さらに、蛍光免疫染色を用いて、誘導 10 日後の hbMSCs における NF-M 陽性細胞率を評価した。統計学的解析には JMP Pro 16 を使い、細胞数および生存率評価、遺伝子発現解析に対して二元配置分散分析および事後検定として Student's t 検定を行なった。また、NF-M 陽性細胞率評価では対応のない Student's t 検定を行なった。有意水準は 5%とした。</p> <p>10 日間神経分化誘導した hbMSCs において、神経細胞関連遺伝子 NES、TUJ1、ASCL1 の mRNA 発現は、1G 群と 3G 群ともに分化誘導に伴う有意な変化はみられなかった。一方で、MAP2、NF-M、NEFH の mRNA 発現は分化誘導に伴い有意に増加し、誘導 10 日後では 1G 群よりも 3G 群で有意に高値を示した。さらに蛍光免疫染色による NF-M</p>			

陽性細胞率は、誘導 10 日後において 1G 群よりも 3G 群で有意に高値を示した。また、神経分化制御に関与する RBM4 および PKM1 の mRNA 発現も分化誘導に伴い有意に増加し、誘導 10 日後において 1G 群よりも 3G 群で有意に高値を示した。

本研究では、hbMSCs の神経分化誘導に過重力環境がどのような影響を与えるか検討した。1G 環境下よりも 3G 環境下において、神経細胞関連遺伝子 MAP2、NF-M、NEFH の mRNA 発現量や NF-M 陽性細胞率が有意に高値を示した。MAP2、NF-M、NEFH は神経分化の後期に成熟した神経細胞で特異的に発現することが知られている。MSCs の神経分化に関連するシグナル伝達や遺伝子発現の制御に、物理的刺激による培養環境の変化が関与し、神経分化に影響を与えることが報告されている。したがって、3G 環境が神経分化後期における遺伝子発現に影響を及ぼす可能性が示唆された。

さらに、3G 環境下において、MSCs の神経分化において重要な役割を担う RBM4 および PKM1 の発現が 1G 環境下よりも有意に増加することが明らかになった。RBM4 は、スプライシング制御による PKM1 の発現増強を介して MSCs の神経分化を促す役割を果たすことが報告されている。本研究により、3G 環境下での神経分化誘導は RBM4 の発現を活性化し、hbMSCs の神経分化を促進する可能性が示唆された。

以上のことから、過重力 (3G) 環境下での神経分化誘導は、hbMSCs における RBM4 および PKM1 の発現増強を介して神経関連遺伝子 MAP2、NF-M、NEFH の発現を高め、神経分化を促進する可能性が示唆された。hbMSCs は神経再生医療分野で臨床応用される幹細胞の一つであり、その神経分化メカニズムに過重力環境が関与する可能性があるという新たな知見を得た。このことは、幹細胞の分化制御に関して、過重力環境を用いた新規的な分化誘導手法の開発および分化誘導の効率化に貢献する研究として高く評価される。

よって審査委員会全員は、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があるものと認めた。