

(様式 3 号)

学 位 論 文 の 要 旨

氏名 前田 敏彦

〔題名〕

Establishment and characterization of spinal cord microvascular endothelial cell lines:

A new *in vitro* blood-spinal cord barrier (BSCB) model

(脊髄微小血管内皮細胞株の樹立とその細胞学的特徴：新たな血液脊髄関門 *in vitro* モデル)

〔要旨〕

血液脊髄関門 (blood-spinal cord barrier, BSCB) は脊髄実質の内部環境を維持するバリアーシステムである。多発性硬化症や外傷性脊髄障害ではBSCBが破綻するとされ、BSCBの保護が治療ターゲットになり得る。バリアー破綻の病態を分子レベルで詳細に明らかにするためには、培養細胞を用いた*in vitro*の実験系が有用であるが、研究が先行している血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) に比べ、BSCBについてはこれまで *in vitro*モデルが樹立されたことがなく、BBBと対比したバリアーの特性は明らかになっていない。今回我々はBSCBの首座である脊髄微小血管内皮細胞 (spinal cord microvascular endothelial cell, SCMEC) の細胞株を樹立し、その細胞学的特性を解析した。

ラット頸髄からSCMECを単離した。温度感受性SV40 large T抗原をレトロウイルスベクターを用いて導入し細胞の不死化を行い安定して増殖するコロニーを単離し、rBSCB-1と命名した。rBSCB-1は特徴的な細胞形態 (spindle fiber morphology) を呈し、vWF, VE-cadherin, PECAM-1などの内皮細胞マーカーを発現した。また、培養温度依存的な増殖速度とバリアー機能を示した。免疫染色でoccludin, claudin-5, ZO-1などのtight junction関連分子の細胞境界への分布がみられ、p-gpの阻害剤を用いることでrhodamine123の細胞内への取り込みが増加した。脳由来内皮細胞と比べ、同程度の電気抵抗値と、FITC-dextran (MW=4kDa) に対する高い透過性を示した。アストロサイトとの共培養でtight junction分子の増加を伴ってバリアー機能が強化された。これらより、得られた細胞株は中枢神経バリアーの特徴を保持し十分なバリアー機能を有していることが確認された。この細胞株は、脊髄疾患の病態解明に有用なツールとなり得る。

学位論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 第 1335 号	氏 名	前田 敏彦
論文審査担当者	主査教授	田 口 敏 彦	
	副査教授	松 本 美 志 也	
	副査教授	神 田 隆	
学位論文題目名 (題目名が英文の場合、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。)			
Establishment and characterization of spinal cord microvascular endothelial cell lines: A new <i>in vitro</i> blood-spinal cord barrier (BSCB) model (脊髓微小血管内皮細胞株の樹立とその細胞学的特徴：新たな血液脊髄関門 <i>in vitro</i> モデル)			
学位論文の関連論文題目名 (題目名が英文の場合、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。)			
Establishment and characterization of spinal cord microvascular endothelial cell lines (脊髓微小血管内皮細胞株の樹立とその細胞学的特徴)			
掲載雑誌名 Clinical and Experimental Neuroimmunology 第 4 巻 第 3 号 P.326 ~ 338 (2013 年 12 月 掲載・掲載予定)			
(論文審査の要旨)			
<p>血液脊髄関門 (blood-spinal cord barrier : BSCB) は脊髄実質の内部環境を維持するバリアーシステムである。多発性硬化症や外傷性脊髄障害では BSCB が破綻するとされ、BSCB の保護が治療ターゲットになり得る。バリアー破綻の病態を分子レベルで詳細に明らかにするためには、培養細胞を用いた <i>in vitro</i> の実験系が有用であるが、研究が先行している血液脳関門 (blood-brain barrier) に比べ、BSCB についてはこれまで <i>in vitro</i> モデルが樹立されたことがなく、BBB と対比したバリアーの特性は明らかになっていない。今回、BSCB の首座である脊髓微小血管内皮細胞 (spinal cord microvascular endothelial cell : SCMEC) の細胞株を樹立し、その細胞学的特性を解析した。</p> <p>ラット頸髄から SCMEC を単離した。温度感受性 SV40 large T 抗原をレトロウイルスベクターを用いて導入し細胞の不死化を行い安定して増殖するコロニーを単離し、rBSCB-1 と命名した。rBSCB-1 は特徴的な細胞形態 (spindle fiber morphology) を呈し、vWF、VE-cadherin、PECAM-1 などの内皮細胞マーカーを発現した。また、培養温度依存的な増殖速度とバリアー機能を示した。免疫染色で occludin、claudin-5、ZO-1 などの tight junction 関連分子の細胞境界への分布がみられ、p-gp の阻害剤を用いることで rhodamine123 の細胞内への取り込みが増加した。脳由来内皮細胞と比べ、同程度の電気抵抗値と、FITC-dextran (MW=4kDa) に対する高い透過性を示した。アストロサイトとの共培養で tight junction 分子の増加を伴ってバリアー機能が強化された。これらより、得られた細胞株は中枢神経バリアーの特徴を保持し十分なバリアー機能を有していることが確認された。この細胞株は、脊髄疾患の病態解明に有用なツールとなり得る。</p> <p>本論文は、温度感受性 SV40 large T 抗原を用いてラット脊髓微小血管内皮細胞株を樹立し、バリアー構成内皮として十分な機能を有していることを示した論文である。SCMEC の細胞株の報告は他になく、今後、脊髄疾患の病態解明に有用となり得る報告であり、学位論文として価値のあるものと認めた。</p>			
備考 審査の要旨は800字以内とすること。			