

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 小田 康喬

題 目：脊髄損傷に対する骨髄間質細胞 (BMSCs) 移植治療法の検討

論文要旨：脊髄損傷(SCI)に対してこれまでに様々な治療法が研究されてきたが、周囲組織の安定化以外に有用な治療法は確立されていない。近年、中枢神経の再生を促す治療として、生体の幹細胞を用いた再生医療が注目され、中でも骨髄間質細胞(BMSCs)移植治療法の試みが数多くなされている。しかし、犬の BMSCs に関する報告は少なく、移植治療効果やその作用機序など不明な点が多い。

本研究の第一章では、犬の BMSCs の性状解析を実施し、人・マウスで報告されている骨髄間質細胞表面抗原と比較したところ、犬 BMSCs は CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>の接着細胞群であることが確認できた。また、犬 BMSCs は脂肪細胞および骨細胞にも分化誘導可能であることが確認できた。さらに、*in vivo*での治療効果を検討するために、重症免疫不全マウスを用いた SCI モデルに犬 BMSCs 異種移植治療を実施し、マウスのロコモーターニューロン運動機能について検討した。犬 BMSCs 治療群は未治療群に比べて、マウスの運動機能が有意に改善した。移植犬 BMSCs の動態を検索するために、ドナーには雄犬をレシピエントには雌マウスを用い、さらに犬 BMSCs を蛍光標識させたところ、レシピエントマウス脊髄中には少なくとも 2 週間は犬 BMSCs が存在し、雄犬由来 Sry 遺伝子に対する PCR 検査では移植 4 週間後でも検出可能であった。以上の結果から、犬 BMSCs は、SCI マウスに対して運動機能回復効果をもつことが示された。

BMSCs は外胚葉由来である神経細胞にも分化可能であり、神経細胞に分化誘導させた細胞源を用いた方が、より治療効果を高めるかもしれないことから、近年、*in vitro*において BMSCs を神経細胞へと分化誘導させたという研究が数多く報告されている。そこで、本研究の第二章では、現在までに数多く報告された NLCs への BMSCs 分化誘導の研究を参考にして犬 BMSCs の NLCs

(別紙様式第 3 号)

への分化誘導を行い、移植可能な細胞であるか、推測する視点から、形態的特徴、長期生存性、大量生産性および継代培養が可能かという点において評価した。本実験の結果から *in vitro* の適切な環境下で犬 BMSC から神経特有の形態を持ち、Nestin, MAP-2,  $\beta$ III-tubulin および GFAP などの神経マーカーを持つ細胞を能率的に分化誘導して作り出せることが示唆された。分化誘導した細胞の多くは Nestin 陽性であり、その後も数継代可能であったことから、未熟な細胞群であることが明らかになった。この結果は、移植治療先の標的組織内で増殖可能な細胞群が得られたという意味はあるかもしれないが、いっぽうで分化誘導が制御できていない可能性が示唆された。第三章では、BMSCs 移植治療の効果をより高めるために、分化誘導に依らない方法を検討した。ポリエチレングリコール(PEG)は、脊髄損傷モデル動物における急性期の神経組織の修復と機能回復に有用であり、犬の椎間板ヘルニア症に対して有用であると報告されている。SCI 急性期における BMSCs 細胞自体の保護、損傷脊髄の保護効果を期待して、BMSCs 移植治療と PEG 治療との併用効果について検討した。実験群として、無治療群、BMSCs 移植群、PEG 投与群および BMSCs +PEG 併用群に別け、移植細胞の動態検索、PCR による移植細胞の検出、免疫組織化学染色による神経細胞の評価および運動機能評価について比較検討した。無治療群以外のすべての治療群で運動機能の改善が認められた。しかし BMSCs+PEG 併用群では、相乗作用も相加作用も認められなかった。移植 BMSCs は細胞膜を PEG にシールされたことで、神経栄養因子や成長因子を分泌し、間接的に神経保護をし、神経再生を促すという機能が十分に果たせなかった可能性があり、急性期の SCI において PEG 投与は BMSCs の十分な効果を発揮させられないことが示唆された。BMSCs 移植と PEG 投与は BMSCs 移植時期を遅らせることで相加作用を惹起し、SCI マウスの運動機能の改善を導けるかもしれないと考えられた。

以上の結果から、犬 BMSCs は SCI に対する有力な治療法であることが確認された。また、犬 BMSCs は *in vitro* の適切な環境下で神経様特徴をもち、神経マーカーを発現する細胞に効率よく分化誘導可能なことも確認されたが、これらの NLCs は成熟神経細胞ではないことや、機能については不明であることから、移植細胞源とするためには、さらなる研究が必要である。今回の研究では、PEG 治療は BMSCs 移植治療効果を増強する効果は認められなかったが、BMSCs 移植時期を遅らせた研究が必要であり、さらに長期間の観察が必要であると考えられた。マウス異種移植モ

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

(別紙様式第 3 号)

デルは、これらの機能を明らかにしていく上で有用な実験系であると考えられた。

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏 名 小 田 康 喬

審査委員	主 査	山口大学・教授	田 浦 保 穂
	副 査	山口大学・准教授	谷 健 二
	副 査	鳥取大学・教授	岡 本 芳 晴
	副 査	山口大学・教授	中 市 統 三
	副 査	山口大学・准教授	板 本 和 仁

題 目 脊髄損傷に対する骨髄間質細胞 (BMSCs) 移植治療法の検討

### 審査結果の要旨

脊髄損傷(SCI)に対してこれまでに様々な治療法が研究されてきたが、周囲組織の安定化以外に有用な治療法は確立されていない。近年、中枢神経の再生を促す治療として、生体の幹細胞を用いた再生医療が注目され、中でも骨髄間質細胞(BMSCs)移植治療法の試みが数多くなされている。しかし、犬の BMSCs に関する報告は少なく、移植治療効果やその作用機序など不明な点が多い。

第 1 章では、犬 BMSCs の性状解析を実施し、人・マウスで報告されている骨髄間質細胞表面抗原と比較したところ、犬 BMSCs は CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> の接着細胞群であることが確認できた。また、犬 BMSCs は脂肪細胞および骨細胞にも分化誘導可能であることが確認できた。さらに、*in vivo* での治療効果を検討するために、重症免疫不全マウスを用いた SCI モデルに犬 BMSCs 異種移植治療を実施し、マウスのロコモーターニューロン運動機能について検討した。犬 BMSCs 治療群は未治療群に比べて、マウスの運動機能が有意に改善した。移植犬 BMSCs の動態を検索するために、ドナーには雄犬をレシピエントには雌マウスを用い、さらに犬 BMSCs を蛍光標識させたところ、レシピエントマウス脊髄中には少なくとも 2 週間は犬 BMSCs が存在し、雄犬由来 Sry 遺伝子に対する PCR 検査では移植 4 週間後でも検出可能であった。以上の結果から、犬 BMSCs は、SCI マウスに対して運動機能回復効果をもつことが示された。

第 2 章では、現在までに数多く報告された神経様細胞(NLCs)への BMSCs 分化誘導の研究を参考にして犬 BMSCs の NLCs への分化誘導を行い、移植可能な細胞であるかを推測する視点から、形態的特徴、長期生存性、大量生産性および継代培養が可能かという点において評価した。その結果、*in vitro* の適切な環境下で犬 BMSC から神経特有の形態を持ち、Nestin, MAP-2,  $\beta$ III-tubulin および GFAP などの神経マーカーを持つ細胞を効率的に分化誘導して作り出せることが示唆された。分化誘導した細胞の多くは Nestin 陽性であり、その後も数継代可能であったことから、未熟な細胞群であることが明らかになった。この結果は、移植治療先の標的組織内で増殖可能な細胞群が得られたという意味はあるかもしれないが、いっぼうで分化誘導が制御できていない可能性も示唆された。

第 3 章では、BMSCs 移植治療の効果をより高めるために、分化誘導に依らない方法を検

討した。ポリエチレングリコール(PEG)は、脊髄損傷モデル動物における急性期の神経組織の修復と機能回復に有用であり、犬の椎間板ヘルニア症に対して有用であると報告されている。SCI 急性期における BMSCs 細胞自体の保護、損傷脊髄の保護効果を期待して、BMSCs 移植治療と PEG 治療との併用効果について検討した。実験群として、無治療群、BMSCs 移植群、PEG 投与群および BMSCs + PEG 併用群に別け、移植細胞の動態検索、PCR による移植細胞の検出、免疫組織化学染色による神経細胞の評価および運動機能評価について比較検討した。無治療群以外のすべての治療群で運動機能の改善が認められた。しかし BMSCs + PEG 併用群では、相乗作用も相加作用も認められなかった。移植 BMSCs は細胞膜を PEG にシールされたことで、神経栄養因子や成長因子を分泌し、間接的に神経保護をし、神経再生を促すという機能が十分に果たせなかった可能性があり、急性期の SCI において PEG 投与は BMSCs の十分な効果を発揮させられないことが示唆された。BMSCs 移植と PEG 投与は BMSCs 移植時期を遅らせることで相加作用を惹起し、SCI マウスの運動機能の改善を導けるかもしれないと考えられた。

以上の結果から、犬 BMSCs は SCI に対する有力な治療法であることが確認された。また、犬 BMSCs は *in vitro* の適切な環境下で神経様特徴をもち、神経マーカーを発現する細胞に効率よく分化誘導可能なことも確認されたが、これらの NLCs は成熟神経細胞ではないことや、機能については不明であることから、移植細胞源とするためには、さらなる研究が必要である。本研究では、PEG 治療は BMSCs 移植治療効果を増強する効果は認められなかったが、BMSCs 移植時期を遅らせた研究が必要であり、さらに長期間の観察が必要であると考えられた。マウス異種移植モデルは、これらの機能を明らかにしていく上で有用な実験系であると考えられた。

本研究により、脊髄損傷(SCI)に対する犬の骨髄間質細胞(BMSCs)の移植治療法が、有力な治癒をもたらす治療法であることが確認されたことは、獣医学に大いに貢献するものである。従って、審査員一同は、博士(獣医学)の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。