

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	清水 陽元
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
<p>論文題目 Impact of intravenously administered cranial bone-derived mesenchymal stem cells on functional recovery in experimental spinal cord injury （ラット頸髄損傷モデルにおける頭蓋骨由来間葉系幹細胞の静脈内投与が機能回復に与える影響について）</p>			
論文審査担当者			
主 査 教授 安達 伸生 印			
審査委員 教授 丸山 博文			
審査委員 准教授 仲 一仁			
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>現在の治療において、脳卒中や脳挫傷、脊髄損傷などの中枢神経障害に対して、一度障害された機能を回復する有効な治療法はない。そのため人工多能性幹細胞や間葉系幹細胞などを用いた細胞治療による再生医療に期待がもたれている。間葉系幹細胞は自己複製能、多分化能を有する細胞で、組織の修復に関わるとされている。当初骨髓から単離・培養されたが、現在は脂肪や臍帯組織、歯髄など様々な体組織に存在することが明らかにされている。我々は頭蓋骨が神経堤細胞由来であることに着目し、頭蓋骨骨髓から間葉系幹細胞を樹立することに成功した。頭蓋骨骨髓由来間葉系幹細胞は神経栄養因子の発現が高いことを明らかにし、脳梗塞や脊髄損傷などの中枢神経障害の機能改善に効果的であることを報告してきた。その中で、頭蓋骨骨髓由来間葉系幹細胞は通常の骨髓由来間葉系幹細胞と比較し、抗炎症作用や抗アポトーシス効果が高いことを報告した。本研究は、①頭蓋骨骨髓由来間葉系幹細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、その特徴を明らかにすること、②頸髄損傷ラットモデルに対して投与を行い、その機能予後改善効果を検証し、通常の骨髓由来間葉系幹細胞との違いを明らかにすることを目的とした。</p> <p>ラットの頭蓋骨と大腿骨のそれぞれの骨髓から間葉系幹細胞を樹立・培養した（それぞれ rcMSC, rbMSC）。3継代目の rcMSC と rbMSC より RNA を抽出し、RNA シークエンスを行った。またインパクトを用い、100kdyn で片側ラット脊髄損傷モデル（損傷レベルは C5）を作成した。受傷翌日に尾静脈より <math>1.0 \times 10^6</math> 個の rcMSC と rbMSC を経静脈的に投与し、PBS 投与群をコントロールとして、3群間比較を行った。評価項目は行動評価、組織学的評価、及び損傷7日目における損傷部位における遺伝子発現解析を行った。行動評価は受傷 0, 1, 4, 7, 14, 21, 28 日目に、前肢および後肢の機能、およびその協調運動について評価した。組織学的評価は、損傷 28 日目の組織で評価し、損傷中心部とその頭尾側における脊髄全体に対する空洞化率をそれぞれ算出し比較した。遺伝子発現解析は real time PCR を行い、TGF-<math>\beta</math>, IL-6, VEGF, TNF-<math>\alpha</math>, NOS2, IL-10 の発現量を比較した。</p> <p>RNA シークエンスの結果では rcMSC と rbMSC は、明らかに異なるプロパティを有していた。Log<sub>2</sub>FC の値を 1.5 をカットオフとして比較すると、rbMSC に比べ rcMSC で高く発現していた RNA は 227 種類あり、ALX1 や ALX4, ZIC1 など神経堤細胞由来を示唆する遺伝子の発現が高かった。逆に rbMSC で発現が高い RNA は 191 種類あり、HOXC8, 9, 10 など、rbMSC が中胚葉由来であることを示す遺伝子の発現が高かった。パスウェイ解析を行うと、rcMSC では白血球の遊走やケモカインシグナルに関連する経路の遺伝子発現が低かった。関連する mRNA をみても、rcMSC では CXCL12, CXCL2, CCL3, CCL2, CXCR4 の発現が低かった。行動評価では rcMSC 群、rbMSC 群はともに PBS 群と比較し、機能予後が優れていた。特に 21 日目、28 日目では rcMSC 群は rbMSC 群と比べても、機能予後が優れていた。脊髄損傷中心部およびその頭尾側における空洞化率に関しては、rcMSC 群と PBS 群の間でのみ有意な差を認め、rcMSC 群で空洞化率が有意に低かった。損傷 7</p>			

日目における損傷部位の mRNA の発現を比較した結果では、NOS2 の発現が rcMSC 群で、rbMSC 群や PBS 群と比較し有意に高く、また TGF- $\beta$  の発現は rcMSC 群で、PBS 群と比較し有意に上昇していた。

以上のことから発生由来に起因して rcMSC は rbMSC とは明らかに異なる性質を持つことが明らかになった。rcMSC は rbMSC と比べ、より強い抗炎症作用を有する可能性が示された。RcMSC の静注は頸髄損傷ラットモデルの機能改善効果をもたらした。損傷範囲の減少に関連していた。RcMSC を投与すると脊髄損傷部で NOS2 や TGF- $\beta$  の発現が高く、これらは抗炎症作用に関連することから、rcMSC の投与は脊髄損傷の機能改善に有利な抗炎症環境を誘導する可能性が示された。本研究では頭蓋骨髄由来間葉系幹細胞の抗炎症作用が、実際に脊髄損傷部で抗炎症環境をもたらすかどうかの直接の因果関係が示されていないため、さらなる研究の集積が必要である。しかしながら、頭蓋骨髄由来間葉系幹細胞が、中枢神経障害の機能回復に有利である可能性を示しており、頭蓋骨髄由来間葉系幹細胞が、中枢神経障害に対する細胞治療の有力な候補である可能性を示した有用な研究であると評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が清水陽元に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。