

# 障害された神経細胞に対する骨髄間質細胞の 神経保護効果・修復メカニズムの解明

## 学位論文内容の要旨

最近、骨髄間質細胞(Bone marrow stromal cell: BMSC)の移植によって、障害された中枢神経機能が改善したとの動物実験の報告が数多くみられる。BMSCは自己から安全に採取可能であることより、ES細胞などと異なり倫理的問題や免疫抑制剤を使用しなくて良いなど、臨床応用する際に多くの利点を持っている。しかしながら、BMSCが神経症状を改善させるメカニズムとして、神経細胞への‘分化’、神経細胞との‘細胞融合’、そして‘栄養因子分泌’などが考えられているものの、いまだに十分解明されているとは言えないのが現状である。十分なメカニズムの解明を待たずヒトで臨床応用を行うのは拙速であると言わざるを得ない。そこでわれわれは、このメカニズムを解明するために、BMSCと神経細胞の共培養実験を2種類の方法で行った。

一つ目の共培養実験は、green fluorescent protein (GFP)で標識されたBMSCとPKH-26で標識された神経細胞の混合共培養実験である。これによって‘分化’と‘細胞融合’を共焦点蛍光顕微鏡による観察によって検証した。GFPトランスジェニックマウスから採取したBMSCとPKH-26で標識された神経細胞を同一平面上のシャーレで混合共培養を行った。共培養3日後には、GFP陽性かつPKH-26陰性を示す細胞集団の一部が、形態学的に神経細胞様に変化していた。蛍光免疫染色では、神経系細胞の表現型であるMAP-2やTuj-1、神経幹細胞の表現型であるnestin、グリア系細胞の表現型であるGFAPの表現型を獲得していることが認められ、これらは‘分化’の所見と考えられた。さらに、共培養する神経細胞にグルタミン酸(100  $\mu$ M)を暴露させると、GFP陽性かつPKH-26陰性の細胞のTuj-1陽性率が有意に上昇した。これは神経細胞に障害を与えると、‘分化’の所見が促進されることが示唆された。また、GFP陽性かつPKH-26陽性の二重陽性の細胞も認められた。これらの細胞は、PKH-26は細胞移行しない蛍光標識であることより、‘細胞融合’したとみなされ、これらの細胞はGFP陽性細胞のうちの約20から30%にも及んだ。しかしこれらの‘細胞融合’所見はグルタミン酸暴露により促進されず、臨床的にどのような意義を持っているのかは不明であった。

もう一つの共培養実験は、BMSCと神経細胞の3次元共培養実験である。これは、液性因子のみ透過できるが細胞は移動できないポアサイズを持つ膜を隔てて、神経細胞とBMSCを共培養することで、BMSCが分泌する液性因子による神経保護効果を検証するために行った。神経細胞をグルタミン酸暴露した際の生存率は、BMSCと3次元共培養を行うことにより有意に上昇し、アポトーシスを起こす神経細胞の割合は有意に低下した。細

胞培養上澄み液を ELISA で分析することにより、BMSC は NGF, BDNF, SDF-1 $\alpha$ , HGF, TGF $\beta$ -1, IGF-1 を分泌していることが判明し、これらの液性因子を分泌することで、神経保護効果を発揮したと考えられた。とりわけ NGF と BDNF は、グルタミン酸負荷した神経細胞と共培養することで産生を増加させていることがわかり、これらの因子を分泌することと神経保護効果は深く関与していると思われた。

以上の結果により、‘分化説’、‘細胞融合説’、‘栄養因子説’など多系統のメカニズムによって、BMSC は障害された神経細胞を修復・保護することが強く示唆された。今回の結果は異なる 2 種類の共培養実験によって得られた。共培養実験という手法は、いまだ歴史は短くさらなる改良が必要であるが、BMSC と神経細部の相互作用を解明する助けになる可能性があると思われた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 岩 崎 喜 信  
副 査 教 授 佐々木 秀 直  
副 査 教 授 安 田 和 則  
副 査 准教授 飛 驒 一 利

学 位 論 文 題 名

## 障害された神経細胞に対する骨髄間質細胞の 神経保護効果・修復メカニズムの解明

最近、骨髄間質細胞(Bone marrow stromal cell: BMSC)の移植によって、障害された中枢神経機能が改善したとの動物実験の報告が数多くみられる。しかしながら、BMSCが神経症状を改善させるメカニズムとして、神経細胞への‘分化’、神経細胞との‘細胞融合’、そして‘栄養因子分泌’などが考えられているものの、いまだに十分解明されているとは言えないのが現状である。十分なメカニズムの解明を待たずヒトで臨床応用を行うのは拙速であると言わざるを得ない。そこでわれわれは、このメカニズムを解明するために、BMSCと神経細胞の共培養実験を2種類の方法で行った。一つ目の共培養実験は、green fluorescent protein (GFP)で標識されたBMSCとPKH-26で標識された神経細胞の混合共培養実験である。これによって‘分化’と‘細胞融合’を共焦点蛍光顕微鏡による観察によって検証した。GFPトランスジェニックマウスから採取したBMSCとPKH-26で標識された神経細胞を同一平面上のシャーレで混合共培養を行った。共培養3日後には、GFP陽性かつPKH-26陰性を示す細胞集団の一部が、形態学的に神経細胞様に変化していた。蛍光免疫染色では、神経系細胞の表現型であるMAP-2やTuj-1、神経幹細胞の表現型であるnestin、グリア系細胞の表現型であるGFAPの表現型を獲得していることが認められ、これらは‘分化’の所見と考えられた。さらに、共培養する神経細胞にグルタミン酸(100  $\mu$ M)を暴露させると、GFP陽性かつPKH-26陰性の細胞のTuj-1陽性率が有意に上昇した。これは神経細胞に障害を与えると、‘分化’の所見が促進されることが示唆された。また、GFP陽性かつPKH-26陽性の二重陽性の細胞も認められた。これらの細胞は、PKH-26は細胞移行しない蛍光標識であることより、‘細胞融合’したとみなされ、これらの細胞はGFP陽性細胞のうちの約20から30%にも及んだ。しかしこれらの‘細胞融合’所見はグルタミン酸暴露により促進されず、臨床的にどのような意義を持っているのかは不明であった。もう一つの共培養実験は、BMSCと神経細胞の3次元共培養実験である。これは、液性因子のみ透過できるが細胞は移動できないポアサイズを持つ膜を隔てて、神経細胞とBMSCを共培養することで、BMSCが分泌する液性因子による神経保護効果を検

証するために行った。神経細胞をグルタミン酸暴露した際の生存率は、BMSCと3次元共培養を行うことにより有意に上昇し、アポトーシスを起こす神経細胞の割合は有意に低下した。細胞培養上澄み液をELISAで分析することにより、BMSCはNGF, BDNF, SDF-1 $\alpha$ , HGF, TGF $\beta$ -1, IGF-1を分泌していることが判明し、これらの液性因子を分泌することで、神経保護効果を発揮したと考えられた。とりわけNGFとBDNFは、グルタミン酸負荷した神経細胞と共培養することで産生を増加させていることがわかり、これらの因子を分泌することと神経保護効果は深く関与していると思われた。以上の結果により、‘分化説’、‘細胞融合説’、‘栄養因子説’など多系統のメカニズムによって、BMSCは障害された神経細胞を修復・保護することが強く示唆された。

公開発表において、佐々木教授から、神経再生における細胞融合の役割についてと、分化誘導因子と細胞保護因子の関係についての質問があった。次いで安田教授より、グルタミン酸による神経障害とそのタイミングについて、2つの共培養実験の比較検討の可否について、などの質問があった。次いで飛騨准教授からは、栄養因子による神経保護効果の重要性についてと、BMSCが多種多様な細胞集団であることについての質問があった。また主査の岩崎教授からは、神経保護と分化誘導との関係について、治療の時期について、などの質問があった。最後に一般聴衆より、臨床応用についての問題点についても質問があった。約25分にわたり非常に活発な質疑応答が行われ、いずれの質問に対しても申請者は自らの研究に基づく経験や過去の論文の内容を引用し、適切な回答をした。

この論文は、BMSCの治療メカニズムの解明に一石を投じており、大変有益な知見を提供している点で高く評価され、今後の神経疾患に対する幹細胞移植治療を考えた場合の重要な結果を含んでおり、臨床応用の根拠になりうるものとして期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。