

## 審査結果の要旨

氏名 武田 妙

犬では、椎間板ヘルニアや外傷を原因とした脊髄損傷 (SCI) の発生頻度が高く、生涯にわたる歩行困難や排泄障害に陥る例も少ない。近年幹細胞を用いた様々な再生医療の研究が進められており、獣医療においても重度 SCI 症例に対する応用が望まれている。この再生医療には、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を始めとして種々の幹細胞が用いられているが、獣医療では、細胞の分離・培養の簡便さやコスト等の理由から、骨髄や脂肪組織から得られる間葉系幹細胞 (MSCs) に対する期待が大きい。最近犬で見いだされた増殖能・多分化能に優れた新規 MSCs、骨髄脂肪細胞周囲細胞 (BM-PACs: Bone marrow peri-adipocyte cells) は再生医療における有望なセルソースとしてとくに注目されている。MSCs は損傷部へのホーミング機能や組織修復・炎症抑制に寄与する液性因子の分泌能 (trophic effects) を有することで、生体組織の恒常性を維持している。この性質を利用すれば、脊椎・脊髄にさらなる侵襲を加えることのない静脈投与による全身投与で損傷部へ MSCs を到達させ、trophic effects により神経再生や炎症が波及した周囲の脊髄組織における神経保護あるいは血管新生作用などが期待できる。以上の背景から、申請者は、犬における再生医療の効果が最も期待できる亜急性期の SCI をターゲットとした安全で効果的かつ汎用性の高い脊髄再生医療の開発を目標として、以下の検討を行った。

第 1 章では、BM-PACs が組織損傷修復に寄与可能な細胞であるかを非 MSCs の間葉系細胞である皮膚線維芽細胞 (DFs) と比較しながら検討している。損傷部へのホーミング能を評価するために、組織損傷部への細胞走化性因子として知られているケモカイン CXCL12 への走化性に注目して両者を比較したところ、いずれも CXCL12 の受容体である CXCR4 を同程度に発現し、CXCL12 に対する濃度依存的な走化性を示したが、BM-PACs はより低濃度の CXCL12 に対する走化性を示し、損傷部へのホーミング能に優れた細胞であることが示されたと述べている。

第 2 章では、BM-PACs の組織修復因子の産生や分泌能を 1 章と同様 DFs と比較しながら検討している。その結果、BM-PACs は DFs と比較して、血管内皮増殖因子 (VEGF) の産生や分泌能に優れることが、遺伝子およびタンパク発現解析、および HUVEC を用いた Tube Formation Assay から明らかになったと述べている。

第 3 章では、SCI に対して、BM-PACs がホーミング能および VEGF 分泌能を介して組織修復効果および治療効果を示すかを、ヌードマウスの重度 SCI モデルを用いて検証している。脊髄損傷部では亜急性期に CXCL12 発現が上昇することから、SCI 亜急性期に BM-PACs の静脈投与を行ったところ、1 週間後に損傷部へのホーミングが確認され、運動機能回復も有意に促進された。さらに組織学的評価からも、損傷部周囲の血管新生促進や残存組織の増加、軸索再生の促進が確認された。一方、DFs を投与したマウスでは、損傷部へのホーミングはみられたが、組織再生、運

動機能回復効果は得られず、この差は第 2 章で示された両細胞の VEGF 分泌能の差に起因すると考えられると述べている。

第 4 章では、犬における BM-PACs の静脈投与の安全性について評価している。健常ビーグルに  $1-5 \times 10^6$  個の自家 MSCs の投与を行ったところ、肺塞栓やアレルギー様症状はみられず、臨床上の安全性が確認された。また、BM-PACs に超磁性体を取り込ませ、損傷部へホーミングした細胞を MRI で検出可能かについても評価している。病理組織学的に皮膚損傷部へのホーミングは確認されたが、MRI では検出されず、これは検出感度の問題であると考えられた。今後、MRI での検出方法については改善が必要であるが、BM-PACs の静脈投与については、犬での安全性が示されるとともに、投与細胞が組織損傷部へホーミングすることが示され、犬の SCI 症例においても同様に脊髄損傷部へホーミングすることが期待されると述べている。

以上の結果から、申請者は亜急性期 SCI に対する BM-PACs の静脈投与により、BM-PACs の損傷部へのホーミングが得られ、VEGF を主とした液性因子分泌を介し、損傷部における血管新生促進を起因とした組織学的、機能的修復が得られることが期待でき、安全性も実験的に確認されたことから今後の臨床応用が期待されると結論付けている。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(獣医学)の学位論文として価値あるものと認めた。