

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 30 年度 博士課程入学

氏名 羽生 航

指導教員 西村 亮平

論文題目

Evaluation of neuronal differentiation and neural tissue formation abilities of canine bone marrow peri-adipocyte cells (BM-PACs) for neural tissue reconstruction
(神経組織再建を目指したイヌ骨髓脂肪細胞周囲細胞の神経細胞分化能および神経組織形成能の評価)

哺乳類において、成体における中枢神経系（CNS）組織の再生は難しいと考えられてきたが、成体の脳内で神経幹/前駆細胞(NSPCs)が発見されたことをきっかけに、成体 CNS における組織修復メカニズムが存在することが示唆された。その後、胚性幹細胞（ESCs）や人工多能性幹細胞（iPSCs）などの幹細胞が樹立され、これらの幹細胞から分化誘導したニューロンやオリゴデンドロサイトなどを移植することによる CNS 疾患に対する再生医療研究が進められ、ヒトでは一部臨床応用もなされている。

獣医療でも犬の脊髄損傷（SCI）や変性性脊髄症（DM）など、ヒトと共通した病態を持つ CNS 疾患が多く存在することから、それらに対する再生医療の開発・応用が期待されており、使用するセルソースについても様々な幹細胞が検討されてきた。NSPCs や ESCs、iPSCs などの多能性幹細胞は有力な候補であるが、NSPCs と ESCs の作製には胚や受精卵が必要で倫理的な問題が伴う。一方、iPSCs については倫理的問題が少ないが、腫瘍化の問題が解決されておらず、犬では臨床応用可能な iPSCs の樹立には至っていない。間葉系幹細胞（MSCs）は、脂肪や骨髓などの成体組織から比較的容易、安価に分離・培養可能で、倫理的問題が少なく、腫瘍化のリスクも低いことから、獣医療での応用の可能性が高い幹細胞と考えられる。MSCs は脂肪・骨・軟骨などの間葉系細胞への多分化能を有する体性

幹細胞と定義されるが、神経細胞への分化能を有することも示されており、CNS 疾患に対する再生医療のセルソースとして期待できる。近年、犬の骨髄由来間葉系幹細胞（cBMMSCs）から誘導した神経細胞様細胞が電気生理学的活動性を有することも示されており、MSCs が持つ神経細胞分化能をさらに詳しく検討することで、犬の CNS 疾患に対する再生医療が発展することが期待される。

これまで、犬における再生医療のセルソースとして様々な組織から分離された MSCs の幹細胞能が比較検討されてきたが、近年、犬の骨髄中の脂肪細胞に付着して存在する MSCs として、骨髄脂肪細胞周囲細胞（BM-PACs）が報告された。BM-PACs は増殖能、コロニー形成能、多分化能の全てにおいて cBMMSCs と比較して優れており、未分化性の高い MSCs であることが報告されている。従って、神経細胞への分化能にも優れることが予想され、犬の CNS 疾患に対する有用なセルソースとなると期待できる。

以上の背景から、本研究では、BM-PACs が犬の神経組織の組織学的・機能的再生に有用であるか検討するために、まず BM-PACs の神経分化能を cBMMSCs と比較した（第一章）。次に神経発生過程を模倣した三次元培養系を用いて三次元的な BM-PACs の神経分化能を検討した（第二章）。さらにバイオ 3D プリンタを用いて、BM-PACs を材料とした神経組織の作製と移植を行った（第三章）。

第一章では、まず BM-PACs と cBMMSCs の比較を行った。両細胞を塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)刺激を用いた神経分化誘導法を用いて 9 日間培養し、形態学的評価、遺伝子・タンパク発現解析、Ca²⁺ imaging による評価を行い、神経細胞分化能を比較した。その結果、両細胞とも誘導により神経細胞様の突起を持つ細胞へ形態変化を示した。また誘導の有無に関わらず Nestin（神経幹細胞マーカー）や TUJ-1（幼若ニューロンマーカー）の発現がみられた一方で、誘導により MAP2（成熟ニューロンマーカー）や NF-H（神経軸索マーカー）は有意に発現上昇した。さらに、BM-PACs では DCX（未熟ニューロンマーカー）の発現もみられた。また、BM-PACs では誘導後 GFAP（アストロサイトマーカー）のタンパクレベルでの発現はみられなかったが、一過性の遺伝子発現上昇がみられた。次に、誘導後の細胞を KCl で刺激し Ca²⁺ imaging を行ったところ、cBMMSCs と比較し、BM-PACs から誘導した細胞で顕著な Ca²⁺流入がみられ、Ca²⁺流入がみられた細胞の割合も有意に高かった。以上の結果から、BMMSCs 及び BM-PACs いずれも神経細胞分化能を有しており、Nestin 発現と誘導による神経細胞特異的タンパクの発現を認めることから、NSPCs 様の性質を有する細胞であることが示唆された。また、NF-H の発現や電気生理学的活性を持つ細胞が誘導されたことから、これらの細胞が CNS 疾患に対する再生医療のセルソースとして期待でき、特に BM-PACs は機能的により優れた神経細胞へ分化可能であることが示唆されたことから、次章以降さらに検討を加える価値が高いと考えられた。

第二章では、細胞凝集塊（スフェロイド）を形成した BM-PACs に神経細胞誘導を行ない、NSPCs の凝集塊からの神経発生を模倣することで三次元的な BM-PACs の神経細胞分化能を評価した。低接着プレート上で BM-PACs のスフェロイドを形成した後、第一章と同様の

神経分化誘導培地を用いて 9 日間培養した。このスフェロイドに対して第一章と同様の評価を行うとともに、ニューロンサブタイプ特異的な遺伝子の発現やスフェロイド内でのシナプス形成についても検討を行った。その結果、BM-PACs のスフェロイドは誘導により径の縮小がみられたが、平面培養時と比較して有意な TUJ-1 や MAP2 の遺伝子発現上昇が認められた。また、Tyrosine hydroxylase (TH; ドパミン作動性ニューロンマーカー)、Choline acetyltransferase (ChAT; コリン作動性ニューロンマーカー)、Glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67; GABA 作動性ニューロンマーカー)、Hb9(運動ニューロンマーカー)遺伝子発現の有意な上昇と TH と ChAT のタンパク発現も認めた。免疫組織化学染色による評価では、スフェロイド内部に Nestin や GFAP 陽性細胞がわずかにみられ、DCX や TH、ChAT 陽性を示す細胞も散発的にみられた。TUJ-1 は表層に発現し、継時的に発現が減弱した。一方、成熟ニューロンマーカーである MAP2、NeuN は全域で発現を認め、継時的な発現増強がみられた。NF-H も全域に発現を認めたが、表層で強い発現を示した。また、シナプスマーカーである Synaptophysin や PSD95 の発現を示す細胞も確認された。さらに、 Ca^{2+} imaging を行ったところ、全域で律動的な細胞内 Ca^{2+} の増減(Ca^{2+} oscillation)が認められた。以上の結果から、三次元培養系で神経細胞誘導を行うことにより、BM-PACs の神経細胞分化が促進されたと考えられ、BM-PACs は様々なサブタイプのニューロンへの分化能を持つことも示唆された。また、シナプス形成を示唆するタンパクの発現や同期的な Ca^{2+} oscillation は、スフェロイドを形成する細胞間での神経伝達ネットワークの存在を示唆するものであり、BM-PACs が持つ神経細胞分化能は CNS の組織学的・機能的再建を目的とした再生医療に利用できる可能性が示唆された。

第三章では、BM-PACs で形成したスフェロイドをさらにバイオ 3D プリンタを用いて積層培養することで三次元構造体を作製し、神経様組織の構築を試みた。また、作製した構造体をヌードマウス的大脑皮質へ移植し、CNS 組織への生着、成熟やホスト組織との融合がみられるかについても検討を加えた。実験には第二章と同様に、神経細胞分化培地で 3 日間培養した BM-PACs のスフェロイドを用い、バイオ 3D プリンタを用いて 3×3 個、3 層に積層した。積層後 6 日間誘導を行ったのち、組織を採取して H&E 染色と免疫染色による組織学的評価を行った。また、ヌードマウス大脑皮質欠損モデルを作製し、欠損領域に構造体を移植し、移植後 6 週目まで 2 週間ごとに継時的に組織学的評価を行った。その結果、バイオ 3D プリンタを用いて積層したスフェロイドは積層から 3 日後に融合が見られ、一塊の構造体が形成されたが、構造体内部は核の断片化がみられ、壊死が示唆された。一方、スフェロイド同士の接合部では Nestin や TUJ-1 といったより未分化なマーカーの発現がみられた。すなわち、スフェロイド同士の融合は認められるものの、単純な接着によるものであり、スフェロイド間での細胞移動を伴う融合ではないことが示唆された。MAP2、NF-H、NeuN や TH、ChAT の他、Synaptophysin、PSD95 の発現はスフェロイド単体と同様に構造体全域で認められた。ヌードマウス大脑皮質欠損モデルに移植した構造体は移植後 1 週目では肉眼的、組織学的にホスト組織への生着が認められたが、2 週目以降では残存して

いなかった。免疫組織染色の結果、移植1週後の構造体では、MAP2やNF-Hの発現低下がみられた。宿主脳との境界部において、軸索伸長や血管浸潤はみられなかった一方で、Iba-1陽性を示すミクログリアあるいはマクロファージの浸潤が認められた。また、境界部でGFAPが強く発現し、グリア瘢痕が形成されており、構造体の生着や成熟が阻害されたと考えられた。以上の結果から、異種移植による宿主の免疫応答により構造体が排除された可能性は否定できないが、構造体はスフェロイドと同じく大半が成熟ニューロンとして分化した細胞から構成されており、生体内での生存能、増殖能が乏しいために移植後に一時的に残存したが組織の構造が崩壊し、組織として定着できなかったと考えられる。

以上、本研究では、犬BM-PACsが優れた神経細胞分化能を持つMSCsであることを明らかにし、三次元培養における検討から機能性を有するニューロンのサブタイプへも分化可能であることが示唆された。特に、運動ニューロンへの分化能が示唆されたことは、犬のSCIやDMなどの運動ニューロンの喪失を伴う疾患に対する細胞補充療法の開発に繋がることが期待され、これらのサブタイプへの分化能について、今後、それぞれのサブタイプに特化した分化誘導法の検討によるさらなる研究が必要と考えられた。また、スフェロイド内でシナプス形成が示唆され、同期的な Ca^{2+} oscillationが見られたことは、神経伝達機能を有する組織の再構築に寄与することを示唆し、伝導障害を伴う神経疾患に対する再生医療のセルソースとして、BM-PACsの有用性を示す結果と考えられた。しかし、本研究で作製したスフェロイド/構造体は主に成熟したニューロンから構成され、生存能と増殖能に乏しい点から宿主組織に生着することができず、実際に組織学的・機能的な神経組織の再建は明らかにすることはできなかった。今後、構造体作製時には神経栄養因子の添加による生存能、増殖能の上昇、分化の程度の調節など、移植モデルにはさらに重度の免疫不全マウスの使用や移植床におけるグリア瘢痕形成の抑制などを検討する必要がある。