

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 羽 生 航

犬では、重度脊髄損傷など従来の治療法では難治性を示す中枢神経疾患が多く発生する。近年、これらの疾患に対し神経分化能を持つ幹細胞や、そこから誘導した神経細胞を損傷組織に移植することで、喪失した神経細胞を補充し、組織学的・機能的な神経組織の再建を目指す神経細胞補充療法の開発が試みられてきた。間葉系幹細胞（MSCs）は骨・軟骨・脂肪などの間葉系細胞への多分化能を持つ細胞と定義されるが、近年、神経細胞への分化能を持つことも報告されており、獣医療でも利用しやすい幹細胞であることから、犬の神経細胞補充療法のセルソースとして期待されている。一方、最近犬の骨髄中脂肪細胞に付着する MSCs として骨髄脂肪細胞周囲細胞（BM-PACs）が新たに分離されたが、BM-PACs は従来の犬骨髄由来 MSCs（BMMSCs）と比較して骨・軟骨・脂肪への分化能に優れることが明らかとなり、神経細胞分化能にも優れることが期待される。本研究は、犬の神経細胞補充療法の開発を目指した基盤的研究であり、BM-PACs が神経細胞分化能に優れたセルソースであることを明らかにし、移植により神経組織の再建が可能であるかを検証することを目的として研究が遂行された。

提出された論文は3章から構成されている。第1章では、BMMSCs と BM-PACs の比較から BM-PACs が神経分化能に優れた細胞であるかが評価された。神経分化誘導により BMMSCs と BM-PACs は、それぞれ神経細胞様の形態を示し、遺伝子発現、免疫染色においても神経細胞としての特徴を示す細胞へ分化した。しかし、MAP2 や DCX などの神経細胞マーカーは BM-PACs のみで発現上昇がみられ、また、Ca イメージングにより BM-PACs から電気生理学的機能に優れた神経細胞が効率よく誘導される可能性が示され、従来の BMMSCs と比較して神経細胞分化能に優れ、セルソースとして有用であることを明らかとした。

第2章では、三次元的環境が細胞の神経分化能を促進させることから、三次元培養系で BM-PACs の神経分化誘導を行い、BM-PACs の神経細胞分化能のさらなる検討が行われた。BM-PACs を浮遊培養して細胞凝集塊を得たのち、神経分

化誘導を行い、ニューロスフェア（NS）を得た。NS 内部の細胞の神経細胞マーカー発現を第 1 章の接着培養で誘導された神経細胞と比較したところ、NS では TUJ-1 や MAP2 のほか、TH や ChAT、Hb9 などの神経サブタイプ特異的マーカーの遺伝子発現上昇がみられた。免疫組織学的評価からは NS 内部で神経細胞が成熟する所見が得られ、TH や ChAT 陽性細胞の存在も確認された。これらの結果から、三次元環境により BM-PACs の神経分化能が促進され、運動ニューロンやドパミン作動性神経細胞などの機能性を有する神経細胞にも分化しうることが示された。さらに、NS 内では SNP（シナプス前膜マーカー）/PSD95（シナプス後膜マーカー）共陽性の領域が認められ、Ca イメージングで NS 全域に同期的な Ca オシレーションが観察されたことから、BM-PACs 由来神経細胞により電気生理学的機能を有する神経組織の構築が可能であることを示した。

第 3 章では、BM-PACs から誘導した神経細胞の移植により中枢神経組織の組織学的・機能的再建が可能かを検討することを目的とした研究が行われた。BM-PACs から誘導した NS を 3D バイオプリンタで積層・融合させることで、神経構造体を作製し、ヌードマウス的大脑皮質に作製した欠損部に移植した。欠損部の補充が可能な大きさを持つ神経構造体を作製することが可能であったが、構造体中心部では細胞の壊死がみられた。移植後の構造体にはホストからの血管浸潤がみられたものの、マクロファージが浸潤しており、移植後 2 週目以降は構造体の残存は確認されず、構造体自体の生存能が低いことが課題となった。また、構造体とホストの境界にはグリア瘢痕が形成され、境界を超える軸索の伸長が阻害され、移植による神経組織の再建は困難であった。今後、未分化な細胞を含む構造体の構築や、構造体内部まで十分な栄養や酸素を供給できる培養法の検討、グリア瘢痕の抑制など移植モデルの検討が必要と考えられた。

以上の研究結果は、BM-PACs が神経細胞分化能に優れた MSCs であることを明らかにし、神経組織の組織学的・機能的再建に貢献する能力を有することを示したもので、犬の中枢神経疾患に対する再生医療の発展に繋がる研究成果であると評価された。また、犬で発生の多い脊髄損傷は運動ニューロンの消失を伴う疾患であり、BM-PACs が運動ニューロンを含む神経細胞のサブタイプに分化する可能性を見出したことは、脊髄損傷に対する再生医療の妥当性を裏付ける有用な知見であると評価された。神経構造体の移植による中枢神経組織の再建については、今後、作成方法の改善が求められたが、挑戦的な研究を遂行した結果であり、独自性の強い研究であることが評価された。したがって、本論文は博士（獣医学）の学位請求論文として合格と認められる。