

## 審査の結果の要旨

氏名 林 杏怡

脊髄損傷は犬で発生頻度の高い疾患であり、損傷が重度である場合、従来の外科あるいは内科治療では十分な回復に至らず、生涯歩行不能に陥る症例も少なくない。近年、脊髄損傷に対する幹細胞投与が運動機能回復の促進に有用であることが示され、新たな治療法として注目されている。特に、骨髄や脂肪組織から得られる間葉系幹細胞（**Mesenchymal Stem Cells; MSCs**）は胚性幹細胞における倫理的問題や人工多能性幹細胞における造腫瘍性リスクも低く、比較的入手しやすいことから、獣医療での利用が始まっており、犬の脊髄損傷症例に対する **MSCs** 移植においても一定の効果が報告されている。しかし、その治療機転などは明らかにされておらず、より効果的な移植を行うためには、移植方法等を含め、科学的根拠に基づいた治療法の開発が望まれる。

**MSCs** 投与による運動機能回復機転としては、幹細胞自身の分化による組織修復ではなく、**MSCs** から分泌される栄養因子や成長因子、あるいは種々のサイトカイン等の液性因子が脊髄組織を損傷から保護し、修復を促進させることによりもたらされると考えられている。このような液性因子の中で、とくに肝細胞成長因子（**Hepatocyte Growth Factor; HGF**）は脊髄損傷に対しても、強力な組織保護効果と運動機能回復の促進をもたらすことが明らかにされていることから、**MSCs** 投与による脊髄損傷後の機能回復には **HGF** 分泌を介した治療機転大きくかかわっていることが示唆されている。

犬では、間葉系幹細胞として骨髄由来間葉系幹細胞（**Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells ; BMMSCs**）や脂肪組織由来間葉系幹細胞が用いられているが、増殖能や純度に問題があり、治療開始時期の遅延や移植効果の低下が予想される。従って、犬における幹細胞を用いた治療には、より高品質な間葉系幹細胞を用い、より効率的な増殖が可能な培養法を開発することが重要である。以上から、本研究ではまず、犬の新規間葉系幹細胞を探索し、得られた細胞の **HGF** 分泌能に注目して脊髄損傷に対する移植効果を検討した。

第 1 章では、犬の骨髄から得られた脂肪細胞を天井培養することにより、間葉系幹細胞の性質を示す細胞が得られることを明らかにした。この細胞は、骨髄脂肪細胞ではなく、骨髄脂肪細胞周囲に付着した小型細胞に由来し、従来の犬 **BMMSCs** と比較して、コロニー形成能、増殖能および多分化能に優れていた。また、表面抗原による分類では、**BMMSCs** と比較し、有意に高い **CD73** 発現を認めた。従って、新たに得られた細胞は、**BMMSCs** よ

り優れた間葉系幹細胞であり、骨髄脂肪細胞周囲細胞 (Bone Marrow Peri-adipocyte Cells; BM-PACs) と命名した。

第2章では、BM-PACsのHGF分泌能をBMMSCsと比較して評価した。通常の培養条件において、細胞内のHGFタンパク量はBM-PACsで有意に高かった。さらに、MSCsは炎症性サイトカインによる刺激によりHGF分泌が促進されることから、TNF- $\alpha$  およびIL-1 $\beta$ による刺激を行ったところ、BM-PACsはBMMSCsと比較して高い応答性を示し、HGF分泌は50倍以上上昇した。次に、HGF刺激を受けてScattering効果を示す、MDCK細胞に対し、サイトカイン刺激を受けたBM-PACsの培養上清を添加したところ、MDCK細胞におけるc-Met (HGF受容体) および、下流調節遺伝子であるERK1/2のリン酸化がみられ、リコンビナントHGFと同等のScattering効果もみられた。よって、BM-PACsはHGF分泌能に優れ、損傷部において炎症性サイトカイン発現が高いと予想される脊髄損傷急性期に移植すれば、HGFを介した高い治療効果が得られると考えられた。

第3章では、ヌードマウスに脊髄損傷を作製し、損傷後急性期にBM-PACsの局所投与および静脈内投与を行ったのち、運動機能評価、組織学的評価から移植の有効性を検討した。静脈内投与したBM-PACsを、In vivo imaging system (IVIS)により追跡したところ、投与直後は肺に留まったものの、1週間後には損傷部に到達した。移植後3週以降はIVISによる検出はできなかった。運動機能評価においては、局所投与群で有意な回復促進が得られたが、静脈内投与群では改善傾向を認めたものの、有意ではなかった。組織学的評価では静脈内投与後1週間で損傷部にBM-PACsが集簇しており、多くはミクログリアによる貪食を受けていたが、8週間においても少数のBM-PACsが残存していた。一方、局所投与群の損傷部位には、より多くのBM-PACsが残存していた。HGFによる損傷組織保護の指標として、ミエリンおよび軸索の残存、グリア瘢痕形成の抑制を評価したところ、局所投与では、ミエリン残存領域の増加傾向がみられたものの、その他の効果は認められなかった。以上から、BM-PACsからのHGF分泌と脊髄損傷治療効果の直接的な関係は明らかにできなかったが、急性期により多くのBM-PACsを損傷部に到達させることで、運動機能改善を促進しうることが示唆された。犬の脊髄損傷では、急性期から亜急性期において炎症性サイトカイン発現が上昇しており、増殖能の高いBM-PACsを利用すれば、移植適期を逸せず、投与を行えると考えられる。今後、髄腔内投与など、有効性および安全性に優れた移植方法の検討により、犬の新たな脊髄損傷治療法が確立されると期待される。

以上本研究により、犬の優れた間葉系幹細胞であるBM-PACsを発見しただけではなく、高いHGF産生能も見出し、未だ十分な治療法がない、犬の重度脊髄損傷に対する新たな治療法の可能性を示した。治療機序については十分明らかではなかったが、BM-PACsを損傷部に十分到達可能であれば、新たな治療法として期待される。

これらの研究成果は、学術上応用上に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。