

審査の結果の要旨

氏名 向井 丈雄

本研究は、新生児の脳障害において臍帯由来間葉系細胞 (UC-MSCs) が有効な治療薬となり得るかどうかの基盤研究として、UC-MSCs の神経向性と、新生児脳障害モデルを用いた UC-MSCs の神経修復作用について検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. UC-MSCs を神経分化培地で単層培養することにより、軸索様突起を有する形態学的変化がみられ、神経特異的マーカーである MAP-2、Musashi-1、Nestin、GFAP の発現が上昇した。また、UC-MSCs を bFGF、EGF 含有培地で浮遊培養することにより Neurosphere の形成がみられた。この Neurosphere を神経分化培地で神経分化させると、単層培養で神経分化させた UC-MSCs よりも神経特異的マーカーが有意に上昇した。
2. ヒト神経芽細胞種 SH-SY5Y 細胞を Glucose depletion(GD)により障害し、Transwell を用いた共培養系において UC-MSCs の SH-SY5Y への遊走能を検討したところ、GD(-)群に比して GD(+ )群において有意に UC-MSCs の遊走が認められた。
3. 新生児の脳神経障害モデルとして Intraventricular hemorrhage (IVH)マウスモデルを確立し、Control 群、IVH 群、従来の 10%FBS 含有  $\alpha$ -MEM 培地で培養した UC-MSCs 投与群 (MEM 群)、Serum-free である RM 培地で培養した UC-MSCs 投与群 (RM 群) の 4 群で治療効果を検討した。IVH 群では行動機能の障害 (行動距離、Rearing 回数の有意な低下) が認められたが、MEM 群、RM 群で共に Rearing 回数の有意な改善がみられ、また、RM 群で行動距離の有意な改善が認められた。次に Control 群、IVH 群、RM 群の 3 群で検討したところ、病理所見では、IVH 群にみられた脳室周囲領域での Reactive gliosis、Hypomyelination、Apoptosis が RM 群において改善しており、全数ではないが RM 群の一部の血清、髄液、脳組織中で Human brain-derived neurotrophic factor (BDNF) と Human-hepatocyte growth factor (HGF) の上昇がみられた。また、*in vivo* imaging において、投与した UC-MSCs は投与 3 日後から 1 週間後にかけて肺から頭部や腹部に広がり、投与 3 週間後には全身から消失した。
4. BDNF と HGF の神経修復効果を検討するため、*in vitro* の神経障害モデルにおける UC-MSCs の治療効果を検討した。異なる 3 ロットの UC-MSCs 全てから BDNF と HGF が分泌されており、中和抗体によりそれらの濃度が低下することを確認した。マウス胎児皮質ニューロン初代培養において、Oxygen-glucose depletion(OGD)により認められた神経

細胞生存率の低下、軸索の萎縮、GAP43 発現の低下、Histone H3 陽性細胞と BrdU 取り込み細胞の減少、アポトーシス細胞・ネクローシス細胞の増加が、UC-MSCs との共培養によって改善された。BDNF と HGF 中和抗体を個別、或いは両者を添加した群では、上記項目の改善度が低下したが、その抑制効果は部分的であった。

以上、本論文は、UC-MSCs が Neurosphere 形成能と障害細胞への遊走能を含めた神経向性を有すること、また、新生児の脳神経障害モデルにおいて UC-MSCs 投与が行動機能の改善をもたらし、それが UC-MSCs 自体の神経細胞への分化・生着ではなく、UC-MSCs から分泌された HGF と BDNF に因るものであること、更に中和抗体での検討にて他の paracrine factor も神経修復に寄与していることを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、新生児の脳神経障害における UC-MSCs の機能解析に重要な貢献を成すと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。