

論文の内容の要旨

氏名：中野 令

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：犬骨髄間質細胞の機能を有するニューロンへの分化とそのメカニズムの解明

脊柱に強い外力が加わって脊椎が脱臼または骨折し、脊髄に損傷が生じる病態を外傷性脊髄損傷という。犬では、交通事故、落下、暴力などの結果として外傷性脊髄損傷が生じ、重症例においては車椅子での生活が余儀なくされる。脊髄損傷の重症例では現在の医療技術を駆使しても機能回復は困難であり、未だ画期的な治療法は確立していない。そのような背景から、人医療域においては、脊髄損傷の根治を目指して様々な新規治療法の開発が行われている。それらの中で、最も注目され多くの研究が行われているのが幹細胞を用いた脊髄再生医療である。犬においても、嗅粘膜神経鞘細胞、脂肪組織由来幹細胞、脱分化脂肪細胞、骨髄間質細胞（BMSCs）を用いた脊髄再生医療の研究が行われ始めている。これらの細胞の中で、採取および培養が容易で、自己移植が可能であり、倫理面での問題も少ないという理由から、BMSCs が最も臨床応用に近い細胞源と考え、今回の研究を行った。

BMSCs は、骨髄液から分離される非造血系の接着細胞であり多分化能を有している。犬 BMSCs を脊髄損傷モデル犬に移植すると運動機能が改善することが報告されており、臨床例においても同様の結果が得られている。しかし、犬 BMSCs の脊髄再生メカニズムについては不明な点が多い。これまで、損傷脊髄に移植された BMSCs から放出される栄養因子が脊髄再生にとって重要であると考えられているが、それだけでは完全な機能回復は得られない。外傷性脊髄損傷は、脊髄中心部の壊死を伴うことが多く、本病態を完全に回復させるためには、BMSCs を機能の有するニューロンへと分化誘導し、損傷を受けた中心部のニューロンと置換することも重要な治療戦略の一つとなり得る。しかし、現在のところ、犬 BMSCs が機能を有するニューロンへと分化するという報告はなく、またそのメカニズムも不明である。本研究では、犬 BMSCs が機能を有するニューロンへと分化することを明らかにし、さらにそのメカニズムについても検討した。

第1章 β-mercaptoethanol (BME) および butylated hydroxyanisole (BHA) を用いて犬 BMSCs を分化誘導した際の ニューロンに関する mRNA とタンパク質の発現および細胞機能解析

これまでに、犬 BMSCs を BME と BHA により処理すると、ニューロン様の形態へと変化し、ニューロンマーカーを用いた免疫染色に対しても陽性を示し、ニューロンと類似した微細構造を有することが報告されている。しかし、このような形態学的変化や免疫染色を用いた検討のみでは、犬 BMSCs が機能を有するニューロンへと分化するか否かについて明らかにすることはできない。ヒトやマウスの BMSCs では、ニューロン分化に伴うニューロンマーカーの mRNA 発現や細胞機能の解析が行われている。しかし、犬 BMSCs では過去にこのような検討は行われていない。そこで、本章では、犬 BMSCs を BME と BHA を用いて処理し、ニューロンに関する mRNA およびタンパク質の発現を real-time RT-PCR およびウエスタンブロッティングにて確認した。さらに、Ca²⁺イメージングにより細胞の機能解析も行った。

犬 BMSCs を BME と BHA を用いて処理したところ、その多くが時間依存的にニューロンに類似し

た形態へと変化した。免疫染色を行ったところ、ニューロン様細胞はニューロフィラメント L 鎖 (NF-L) や神経特異的エノラーゼ (NSE) といったニューロンマーカーに対して陽性であった。さらに、BME および BHA 処理後には、*SOX2*、*NES*、*TUBB3* といった神経幹細胞に関する mRNA の発現量が有意に減少し、*MAP2*、*NF-H*、*NF-L*、*SLC1A1*、*SLC2A3* といったニューロンに関する mRNA の発現量は有意に増加した。イオンチャネルの mRNA 発現においては変化しないものもあった。BME および BHA 処理後の犬 BMSCs では、*NES*、*NF-L*、*NSE* といったニューロンに関するタンパク質の発現量が有意に上昇した。しかし、今回得られたニューロン様細胞は、KCl に反応せずニューロン類似の機能は認められなかった。

本検討で用いた化学的な分化誘導法では、犬 BMSCs は機能の有するニューロンへと分化することができなかった。本研究では、一部のニューロンマーカーおよびイオンチャネルの mRNA 発現が上昇せず、成熟したニューロンへ分化誘導されていない可能性が示唆された。さらに、本検討で用いた方法では、犬 BMSCs が短期間で剥離してしまい機能を十分に検証できなかった。これらのことを解決するためには、他の因子やサプリメントを用いたより長期間培養が可能なニューロン分化法を検討することが必要であることが考えられる。

第 2 章 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) による犬 BMSCs の機能を有するニューロンへの分化

第 1 章の結果から、犬 BMSCs が機能を有するニューロンへ分化するか否かを明らかにするためには、分化誘導法の改善が必要であった。ヒトやマウスでは、成長因子を添加することで、BMSCs が機能を有するニューロンへと分化したことが報告されている。そこで、予備実験にて過去に報告のあるニューロン分化培地を検討したところ、犬 BMSCs は bFGF を添加することで生存が維持でき、ニューロン分化培地としても期待できる結果が得られた。bFGF は神経系組織に高発現しており、ニューロン再生や脊髄機能の改善に重要な機能を果たしている。本章では、bFGF を用いて犬 BMSCs が機能を有するニューロンへと分化することを検証した。

犬 BMSCs を 2% B27 supplement を含む Neurobasal-A medium に bFGF (100 ng/mL) を添加した培養液で培養後に、ニューロン (*MAP2*、*NEFL*、*ENO2*)、神経幹細胞 (*NES*)、グリア (*GFAP*) に関する mRNA 発現を real-time RT-PCR にて解析した。さらに、ニューロン (*NF-L*、*NSE*) に関するタンパク質の発現と局在をウエスタンブロッティングおよび免疫染色にて確認した。さらに、Fluo3-AM を用いた Ca^{2+} イメージングにて細胞機能の検討を行った。

犬 BMSCs は、bFGF で処理することにより細胞の生存を維持することができた。また、bFGF 処理によりニューロンに関する mRNA およびタンパク質の発現が上昇し、犬 BMSCs はニューロン様の形態へと変化した。一方で、神経幹細胞およびグリアに関する mRNA の発現は有意に低下した。これらの結果から、犬 BMSCs は bFGF で処理することにより、ニューロンマーカーを発現するニューロン類似の細胞へと分化することが示唆された。本検討で得られたニューロン様細胞を高濃度の KCl または L-glutamate で刺激すると、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。これらの結果から、bFGF 処理により、犬 BMSCs が脱分極および L-glutamate 刺激に反応する機能を有するニューロン類似の細胞へと分化したことが示唆された。

本研究において、bFGF は犬 BMSCs の生存維持と脱分極および L-glutamate 刺激に反応する機能を有するニューロン類似の細胞への分化に寄与することが明らかとなった。これらの結果は、重度の脊髄損傷等の神経疾患に対する新規の細胞移植治療法の発展に貢献するものと考えられる。

第3章 犬 BMSCs のニューロン分化における FGFR-2/PI3K/Akt/GSK-3 β 経路の関与

第2章で、bFGF が犬 BMSCs の機能を有するニューロンへの分化に寄与する可能性を示したが、犬でのニューロン分化における bFGF の位置づけやそのメカニズムについては未だ明らかになっていない。これまでに、ヒトやマウスでは bFGF が種々のシグナル伝達経路を活性化することで BMSCs の機能を有するニューロンへの分化に寄与することが報告されている。本章では、bFGF による犬 BMSCs のニューロン分化の細胞内シグナリングについて検討を行った。

細胞内シグナリングを検討するために、FGFR、PI3K、Akt、MEK、PLC の各阻害剤を用いて前処理を行い、ニューロンマーカーである *MAP2* の mRNA 発現を real-time RT-PCR にて解析した。GSK-3 β および Akt の活性化については、それぞれの抗リン酸化抗体を用いてウエスタンブロッティングにて検討した。FGFR のサブタイプの発現を RT-PCR およびウエスタンブロッティングにて検討し、bFGF と FGFR サブタイプの結合を cross-linking and immunoprecipitation (CLIP) 法にて確認した。さらに、FGFR-2 の siRNA を用いて FGFR-2 のノックダウンを行った。

犬 BMSCs は、bFGF にて処理した後にニューロンマーカーである *MAP2* の mRNA の発現が有意に上昇した。その発現は、FGFR、PI3K、Akt 阻害剤にて有意に低下した。一方で、MEK および PLC 阻害剤は bFGF 誘導性の *MAP2* mRNA 発現には影響しなかった。また、bFGF 処理後の犬 BMSCs はニューロン類似の形態へと変化した。FGFR、PI3K、Akt の各阻害剤を用いることで形態変化は抑制された。Akt の基質である GSK-3 β は bFGF 処理後、時間依存的にリン酸化された。bFGF 誘導性の GSK-3 β のリン酸化は FGFR、PI3K、Akt の各阻害剤を用いることで抑制された。また、Akt は bFGF 処理後、時間依存的にリン酸化され、FGFR、PI3K、Akt の各阻害剤を用いることで Akt のリン酸化は低下した。犬 BMSCs においては、FGFR-1 および FGFR-2 の発現が確認された。bFGF と FGFR サブタイプの結合を確認したところ、bFGF は FGFR-2 と強く結合することが示された。さらに、siRNA を用いて FGFR-2 をノックダウンしたところ、bFGF 誘導性の Akt のリン酸化は抑制された。

本章では、犬 BMSCs における bFGF によるニューロン分化には FGFR-2/PI3K/Akt/GSK-3 β 経路が大きく関与することが明らかとなった。過去のマウスにおける BMSCs のニューロン分化には FGFR-1/MEK/ERK 経路が報告されているが、犬 BMSCs のニューロン分化は過去の報告と異なった新規のメカニズムが関与することが明らかとなった。

総括

本研究では、犬 BMSCs の機能を有するニューロンへの分化能を明らかにした。さらに、bFGF による犬 BMSCs のニューロン分化には、新規のメカニズムである FGFR-2/PI3K/Akt/GSK-3 β 経路が関与することを示した。これらの結果は、犬の脊髄損傷に対してより効果的な脊髄再生医療を提供し、BMSCs の移植効果のメカニズムを明らかにするために非常に重要であり、獣医療における脊髄再生医療の発展に大きく貢献することが期待される。