

論文審査の結果の要旨

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

審査委員：（主 査） 教授 中 山 智 宏

（副 査） 教授 杉 谷 博 士 教授 森 友 忠 昭

犬の外傷性脊髄損傷の主な原因は、交通事故、落下、暴力などであり、重症例では車椅子での生活が余儀なくされてしまう。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、その中で最も注目されているものが幹細胞を用いた脊髄再生医療である。本論文においては、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理由から、犬の再生医療のための基礎研究として、骨髄間質細胞（BMSCs）に着目した。これまで、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、また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。現在のところ、犬 BMSCs が機能を有するニューロンへと分化したという報告はなく、またそのメカニズムも不明である。本論文では、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。

犬 BMSCs を β -mercaptoethanol (BME) および butylated hydroxyanisole (BHA) で処理すると、ニューロン様の形態へと変化し、なおかつ免疫染色によるニューロンマーカーに対しても陽性を示すことと、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したかどうかは証明できない。本論文では、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。さらに、ニューロンマーカーは陽性を示し、ニューロンに関する mRNA およびタンパク質の発現が観察された。しかし、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。このことから、BME および BHA を用いた化学的な分化誘導法では、犬 BMSCs を機能するニューロンへと分化させることは出来ないことが判明した。

次に塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を用いることで、犬 BMSCs が機能を有するニューロンへと分化可能であるのかを検証した。犬 BMSCs は、bFGF で処理することにより細胞の生存が維持された。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。さらに、このニューロン様細胞を高濃度の KCl または L-glutamate で刺激した結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。これらのことから、bFGF 処理により、

犬 BMSCs が機能を有するニューロン類似の細胞へと分化することが明らかとなった。

犬 BMSCs は bFGF により、機能を有するニューロン類似細胞へと分化したが、そのメカニズムについては不明である。そこで、bFGF が犬 BMSCs のニューロン分化を誘導する細胞内シグナリングについて検討を行った。その結果、犬 BMSCs におけ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。この経路の存在から、犬 BMSCs はこれまでの報告とは異なった新規のメカニズムでニューロン分化が誘導されると考えられた。

本論文では、犬 BMSCs が機能を有するニューロンへ分化することを明らかにした。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。以上の成果は、犬の脊髄損傷に対するより有効な脊髄再生医療法の開発と BMSCs の移植効果のメカニズムを明らかにする上で非常に重要であり、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。

よって、本論文は、博士（獣医学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成27年1月21日