

学 位 論 文 要 約

博士論文題目 ラット脳梗塞モデルに対するヒト皮膚線維芽細胞由来

新規多能性幹細胞 (Muse 細胞) 移植療法 治療効果と細胞動態の解析.....

.....東北大学大学院医学系研究科..... 医科学..... 専攻

.....神経・感覚器病態学..... 講座..... 神経外科学..... 分野

氏名..... 森田..... 隆弘.....

背景：脳梗塞に対する細胞移植療法は、新規治療法として期待される。しかし、現在までに施行された骨髄間葉系細胞等を用いた臨床試験では十分な有効性が示されず、今後の臨床応用が期待される胚性幹細胞や人工多能性幹細胞についても安全面や倫理的問題などの解決が待たれる。そのため細胞移植療法は移植用細胞の選択も含めて更なる検討が必要な段階である。Muse 細胞は成人ヒト間葉系組織に存在する新たに発見された多能性幹細胞であり、多能性幹細胞マーカーである stage specific embryonic antigen-3 (SSEA-3) を表面抗原としたセルソーティングで分離できる。多分化能と自己複製能を有する一方、腫瘍形成能を示さず、自家移植可能なため倫理的問題も少ない。安全性と多分化能を兼ね備えた Muse 細胞は他の幹細胞と比較して優れた移植用材料となり得るが、脳梗塞に対する有効性は明らかでない。

方法：本研究では Muse 細胞を用いてラット脳梗塞モデルに対する移植治療を行い、その治療効果とメカニズムを明らかにすることを目的とした。Fluorescent activated cell sorter (FACS) を用いて、ヒト皮膚線維芽細胞から抗 SSEA-3 抗体陽性の Muse 細胞および抗 SSEA-3 抗体陰性の non-Muse 細胞を分離した。In vitro 実験系では、単一 Muse 細胞からのクラスター形成、蛍光免疫染色による自発的な 3 胚葉性分化と神経系細胞への分化について検討した。In vivo 実験系では、脳梗塞モデルとして 60 分間のラット中大脳動脈閉塞-再灌流モデルを作成し、再灌流 2 日後に Muse 細胞、non-Muse 細胞、または PBS を定位的手法により虚血境界領域に直接移植した。移植後 84 日間にわたり、modified neurological severity score (mNSS) と rotarod test による行動学的評価を行った。移植 87 日後に脳切片を作成し、以下の実験に使用した。脳梗塞サイズおよび腫瘍形成の有無を hematoxylin & eosin (H&E) 染色で評価した。蛍光免疫染色により、抗 human mitochondria marker (hMit) 抗体を用いて移植細胞の生着数を検討した。更に、抗 β -tubulin 抗体と抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体を用いて hMit との二重陽性細胞を検出し、移植細胞の神経系細胞分

(書式18) 課程博士
化について検討した。逆向性軸索トレーサーである hydroxystilbamidine を移植 84 日後に脳幹部へ定位的に投与し、抗 hydroxystilbamidine 抗体を用いた蛍光免疫染色によって移植細胞の宿主脳内への軸索伸長について評価した。体性感覚誘発電位 (somatosensory evoked potential : SEP) の測定により、移植細胞による神経回路再建について電気生理学的に検討した。

結果 : *in vitro* 実験系では、ヒト皮膚線維芽細胞より 4.05 ± 0.96 % の Muse 細胞が分離された。約 30 % の Muse 細胞がクラスターを形成し、自発的な 3 胚葉由来細胞および神経系細胞への分化が確認された。*In vivo* 実験系では、Muse 細胞移植群は non-Muse 細胞移植群や PBS 群と比較して 70 日目以降の慢性期に有意な機能改善促進を認めた ($p < 0.05$)。脳梗塞サイズは各群間で有意差を認めなかった。腫瘍形成はいずれの群でも認めなかった。Muse 細胞は non-Muse 細胞と比較して主に脳梗塞の境界領域で有意に高い生着率を示した ($p < 0.05$)。移植された Muse 細胞は神経細胞 (11.15 ± 4.69 %) および星状膠細胞 (6.75 ± 5.94 %) へ分化した一方、non-Muse 細胞では神経系細胞への分化を全く認めなかった。また、Muse 細胞移植群でのみ 4.37 ± 0.96 % の hydroxystilbamidine 陽性移植細胞が検出され、移植した Muse 細胞が宿主脳内で軸索を伸長し、神経回路を形成している可能性が示唆された。SEP による電気生理学的検討では、Muse 細胞移植群で潜時遅延の改善傾向を認めたが統計学的有意差を検出できなかった。

結論 : 新たに発見された多能性幹細胞である Muse 細胞は神経系細胞への分化能と宿主神経回路への高い生着能を有し、脳梗塞後の機能改善を促進することが示された。入手容易な皮膚線維芽細胞より分離可能な Muse 細胞は倫理的ハードルが低く、高い安全性を示すことから、今後の脳梗塞に対する細胞移植療法の臨床応用化に向けて有用な移植用材料になり得ると考えられた。