

氏 名	むらかみ とおる 村上 徹
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学 専攻
学位論文題目	Schwann cells generated from human fibroblasts facilitate axonal regeneration and commit to re-myelination and functional recovery in the rat peripheral nervous system (ヒト線維芽細胞から誘導されたシュワン細胞はラット末梢神経系において軸索再生を促進し、再ミエリン化と機能回復を担う)
論文審査委員	主査 教授 出澤 真理 教授 山内 正憲 教授 加賀谷 豊

論文内容要旨

シュワン細胞は、神経再生を促進することから様々な神経疾患の治療に応用できる可能性がある。しかし、シュワン細胞の採取には侵襲が伴い、さらに細胞増殖活性が高くないことから、治療目的での内在性シュワン細胞の使用は現実的ではない。そこで本研究ではシュワン細胞の源として、安定した増殖能を持ち、容易に採取できる線維芽細胞に着目した。

正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) に β -メルカプトエタノール、レチノイン酸及び 4 種のサイトカイン (塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic-fibroblast growth factor, bFGF)、フォースコリン、血小板由来成長因子-AA (platelet-derived growth factor-AA, PDGF-AA)、ヘレグリン β 1-上皮成長因子ドメイン (heregulin- β 1-EGF domain ; HRG- β 1) を作用させることで、シュワン細胞に類似した形態の細胞が得られた。以前に報告されてきたシュワン細胞誘導法では、ウシ胎児血清 (fetus bovine serum, FBS) FBS の濃度は 10% が使われてきたが、今回の実験系では骨髄間葉系細胞より増殖の早い NHDF を使用しており、10% FBS では誘導後 2~3 日でコンフルエントに達し、誘導効率への影響が考えられたことから、FBS 濃度が誘導効率に与える影響を調べるため、サイトカイン処理の際に 10%, 5%, 1% 濃度の FBS を試したところ、5% FBS の時に最も多くのシュワン細胞様形態を持つ細胞が得られ、シュワン細胞のマーカーとして知られる p75 陽性の細胞の割合が最も高かった。こうして誘導された細胞 (NHDF-SC) は p75、S100B、GFAP、P0、O4、Sox10、Krox20 を最大 75% の細胞で発現していた。誘導されたシュワン細胞は、Multilineage-differentiating steress enduring (Muse) 細胞や神経堤由来幹細胞といった NHDF に含まれる幹細胞が起源となっている可能性があったので、NHDF を Muse 細胞とそれ以外の細胞 (non-Muse 細胞) や、CD271 陽性と陰性の細胞に FACS で分離して誘導を行う実験を行ったところ、いずれの実験でも特定の幹細胞が特異的にシュワン細胞のソースとなっているわけではなく、NHDF の多数を占める細胞群がシュワン細胞誘導に関与していた。

中胚葉性の NHDF が外胚葉性のシュワン細胞に分化する機序は ERBB3、ITGA4、TFAP2A、GFAP、Pou3f1 の発現解析によって示された。また、NHDF-SC のミエリン形成能は in vitro で PC12 細胞との共培養によって示された。

NHDF-SC をラット坐骨神経損傷モデルに移植した実験では、ヒトシュワン細胞と同程度の軸索再伸長作用と坐骨神経機能回復促進作用を示し、さらに再ミエリン化、ランヴィエ絞輪の形成、神経筋接合部の再形成に寄与していることが示唆された。

(書式12)

誘導されたシュワン様細胞の細胞移植治療のターゲットとなる疾患は多岐に渡り、誘導された細胞の末梢神経再生効果は、外傷による末梢神経損傷だけでなく、現時点では難治性である神経障害性疼痛の治療にも応用できる可能性がある。誘導されたシュワン様細胞においては、末梢神経だけでなく、中枢神経である脊髄の損傷への治療効果も報告されており、ミエリン形成能は脱髄疾患や髄鞘形成不全疾患において、ミエリンの再形成に寄与する可能性もある。皮膚から簡便に採取できる線維芽細胞からシュワン様細胞が簡便に比較的短期間で効率よく得られることは、上記の疾患に対する細胞移植治療への応用において高い期待を持たせるものである。

審査結果の要旨

博士論文題目 Schwann cells generated from human fibroblasts facilitate axonal regeneration and commit to re-myelination and functional recovery in the rat peripheral nervous system (ヒト線維芽細胞から誘導されたシュワン細胞はラット末梢神経系において軸索再生を促進し、再ミエリン化と機能回復を担う)

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 細胞組織学分野

氏名 村上 徹

ヒト線維芽細胞から複数種のサイトカイン刺激を経時的に組み合わせることでミエリン形成能を持つ機能的なシュワン細胞を作成することに成功した。線維芽細胞を beta-mercaptoethanol を 24 時間投与し、retinoic acid で 3 日間ほど培養すると細胞をリセットすることができる。その後 basic fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor, Heregulin, Forskolin 等のシュワン細胞分化に関わる 4 因子を同時投与することにより、成熟型シュワン細胞マーカーの発現と神経再性能、ミエリン形成能を持つシュワン細胞の誘導が確認された。誘導されたシュワン細胞を免疫抑制剤投与下のラット坐骨神経切断モデルに移植することにより、顕著な神経繊維の最伸長、歩行機能の改善、ミエリン数増加、神経-筋接合数の回復が確認された。

シュワン細胞は末梢神経だけでなく中枢神経の再生にも効果があるとされているが、その採取には現実的な困難がある。生体から得る場合には新たに末梢神経を損傷し、得られた組織片からシュワン細胞を増やさなくてはならないが、現実的には実施が難しく、仮にシュワン細胞を得たとしても増殖力も低いままである。ヒト線維芽細胞は皮膚バイオプシーや市販からも得られ、増殖力に優れ、現実的な利点がある。これらの細胞から機能的なシュワン細胞が得られた事は、今後末梢神経、中枢神経の神経線維の再生医療において役立つと期待される。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。