

氏名	にしだあきひろ 西田明弘
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2293号
学位授与の日付	平成13年1月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Incorporation and Differentiation of Hippocampus - Derived Neural Stem Cells Transplanted in Injured Adult Rat Retina (成体ラット海馬由来神経幹細胞の損傷網膜への移植に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 川口三郎 教授 金子武嗣 教授 本田孔士

論文内容の要旨

目的：網膜は中枢神経であり，哺乳類では一旦網膜が変性するとその機能を回復することはない。変性網膜の機能を回復させる唯一の可能性は移植治療であると考えられるが，現在まで多くの動物実験が試みられている胎児網膜移植はドナーの供給量に限界があることが問題である。1990年代にその存在が確認された神経幹細胞は，凍結保存が可能である点，*in vitro*での増殖が可能である点，遺伝子導入等の操作が比較的容易な点で胎児網膜よりも有利であると考えられる。もし，神経幹細胞が胎児網膜と同様に網膜に移植可能であれば，網膜に対する移植治療の面では大きな前進であると考えられる。今回，海馬由来の神経幹細胞が成体損傷網膜に移植可能かどうかを検討した。

方法：ドナーには lac Z 遺伝子を組み込んだ成体ラット海馬由来神経幹細胞を，ホストには8週齢 Fischer 系ラットを用いた。注射針を用いて網膜に損傷を加え，直後に神経幹細胞の細胞懸濁液を硝子体中に注入した。術後1，2，4週で4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定し，凍結切片を作製した。蛍光抗体法および金粒子銀増感法にて免疫組織化学的検討を行った。一次抗体には移植細胞のマーカーとして β -galactosidase (β -gal)，神経系前駆細胞のマーカーとして nestin，神経細胞のマーカーとして microtubule associated protein (MAP) 2ab および MAP5，星状膠細胞および Müller 細胞のマーカーとして glial fibrillary acidic protein (GFAP)，稀突起膠細胞のマーカーとして myelin basic protein (MBP)，アマクリン細胞のマーカーとして HPC-1，水平細胞のマーカーとして calbindin，視細胞のマーカーとして rhodopsin の各抗体を用いた。

結果：移植された神経幹細胞は，術後1，2，4週のいずれの時点でも損傷網膜への侵入・生着がみられたが，非損傷網膜への侵入・生着はみられなかった。免疫組織化学的には，術後1週では移植細胞のうち56%が nestin 陽性であったが，他のマーカーはほとんど発現していなかった。術後2週では，nestin 陽性の移植細胞は55%とほとんど変わらなかったが，MAP2ab および MAP5 陽性細胞が，それぞれ5%，22%出現し，一部の移植細胞は神経細胞に分化したことが示された。術後4週では nestin 陽性細胞は36%に減少し，MAP2ab，MAP5，GFAP 陽性細胞がそれぞれ10%，25%，10%出現した。すなわち神経細胞に分化する割合がさらに増加し，星状膠細胞または Müller 細胞に分化するものも出現した。MBP，HPC-1，calbindin，rhodopsin についてはどの時点においても移植細胞での発現はみられなかった。また，電子顕微鏡的には，仮足または細胞突起による移植細胞同士，あるいは移植細胞とホスト細胞間での接触が観察された。内網状層のレベルにおいては，移植細胞とホスト細胞との間で puncta adhaerentia およびシナプス様構造を形成していることが観察された。

考察：ホスト網膜に侵入・生着した神経幹細胞は損傷網膜の微小環境に反応し，神経細胞およびグリア細胞に分化したと考えられる。また，電子顕微鏡レベルでは，移植細胞はホスト網膜への親和性を持つことが示された。しかし，アマクリン細胞や水平細胞，視細胞のマーカーは発現せず，網膜特異的な神経細胞への分化はみられなかった。その理由としては，移植された神経幹細胞が海馬由来であるという内的要因，ホストの成体損傷網膜が網膜神経細胞の分化に必要な微小環境を神経

幹細胞に提供できなかったという外的要因のいずれかあるいは両方が関与していると考えられる。網膜特異的な神経細胞への分化を誘導するためには何らかの内的あるいは外的因子を補充する必要があると考えられた。

論文審査の結果の要旨

網膜は中枢神経の一部であり、哺乳類で損傷または変性した網膜が再生したとの報告はみられない。機能再建という面から、将来的に移植治療が考えられているが、従来の動物実験レベルで行われていた胎児網膜移植は、移植源の絶対的不足と倫理的問題等から臨床応用にはかなりの距離がある。もし、神経幹細胞が胎児網膜と同様に損傷網膜に対して移植可能であれば、新しい移植源として大きな意味を持つ。本論文では、成体ラット海馬由来神経系幹細胞を、機械的損傷を加えた成体ラット網膜に移植するという手法をとっている。硝子体腔に注入された神経幹細胞は網膜損傷部位の周囲のみに侵入・生着し、損傷を加えない所には侵入しなかった。損傷部位周囲に生着した神経幹細胞の分化を各種細胞マーカーによる免疫組織化学的手法により調べた結果、移植後早期には未分化な細胞が大部分であるが、次第にニューロンやグリアに分化するものが出現することが示された。また、免疫電子顕微鏡的手法を用いて移植細胞の微細構造を調べた結果、シナプス様の膜肥厚が移植細胞と宿主細胞間に形成されていることが示された。この事は、移植された神経幹細胞が、特殊化した細胞膜を介して宿主細胞とシグナル伝達を行っている可能性を示唆している。

以上の研究は、神経幹細胞が損傷網膜に対する移植源として有用であることを示し、網膜を標的とした移植治療の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成12年10月25日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。