

氏名	おおたまさよし 太田正佳
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2947号
学位授与の日付	平成18年3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	Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. (脊髄損傷モデルラットに、骨髄間質細胞を脳脊髄液経路に投与すると組織学的に空洞形成を抑制し、行動機能学的にも改善の効果を得た)
論文調査委員	(主査) 教授 河野 憲二 教授 橋本 信夫 教授 金子 武嗣

論 文 内 容 の 要 旨

近年、中枢神経再生の基礎研究により脊髄神経も再生する可能性が示唆された。その治療戦略としてES細胞、神経幹細胞、嗅神経鞘グリア細胞、脈絡膜上皮細胞などの細胞移植治療によりラットの脊髄再生が促される報告がある。我々も神経幹細胞を利用した脊髄損傷の治療法を探索してきた。しかし、神経幹細胞移植では一定の治療効果も得たが、移植細胞が長期間増殖し続けるという細胞移植治療の安全性を危惧させる所見を得た。また、一般的に上記の細胞移植治療には倫理的問題が立ちはだかっている。これまでの結果をふまえて、本研究では、より臨床的な治療を目指すことを主眼として、骨髄間質細胞を脳脊髄液中に投与する方法での急性期脊髄損傷の治療を検討した。

脊髄挫減損傷モデルは、Th8-9椎弓を骨弁として挙げ、New York University weight drop装置を使用した。金属製の10gで先端径が2mmの重りを、12.5mm(中程度損傷)もしくは25mm(重度損傷)の高さより落下させ、脊髄を挫減した。green fluorescent proteinを発現しているトランスジェニックSDラットと野生型Wistarラットを用い、大腿骨より骨髄間質細胞を機械的に採取、15%FBSを添加した α -MEM培地にて培養した。野生型Wistar由来細胞はGFPを組み込んだレトロウイルスを感染しGFPを発現させた。移植は4回継代した骨髄間質細胞(5×10^6 個, $50 \mu\text{l}$)を用い、同系のラットの脊髄損傷後すぐに第4脳室から脳脊髄液中に注入した。評価は注入細胞の分布、損傷部の組織学的検討と行動回復(BBBスコア)を経時的に5週間まで評価した。

注入された細胞は、移植後2週間までは脳と脊髄全体の軟膜に付着する他、脊髄損傷部内に進入、生着し、突起を伸長していた。しかし、移植後3~4週後には移植細胞は確認できなかった。ラットの行動はBBBスコアにより、0-21の数値で評価した。BBBスコアの評価は、中程度損傷モデルでは、1から5週間目まで、重度損傷モデルでは5週間目に、移植群の方が行動機能の改善を有意に認めた。5週後の脊髄損傷部に形成された空洞容積の計測では、いずれの損傷モデルでも、移植群の方が、空洞容積が有意に小さかった。さらに免疫組織学的に損傷部より尾側の神経組織が、移植群においては保存されているのに対して、コントロール群では保存されている神経組織は少なく、肉眼的にも萎縮していた。

次に、骨髄間質細胞移植後の脳脊髄液の変化を検討するために、以下の実験を試みた。骨髄間質細胞を脳脊髄液に投与した脊髄損傷ラットの投与2日後の脳脊髄液を採取した。この液を浮遊培養した神経細胞塊に投与したところ、治療群ラットの脳脊髄液には、神経細胞塊をシャーレに接着、細胞突起を伸長させる作用があったが、対照の脊髄損傷のみのラットの脳脊髄液にはそのような作用はなく、神経細胞塊は浮遊した状態を維持していた。このことより、骨髄間質細胞がなんらかの栄養因子を放出している可能性が示唆された。

以上、脳脊髄液中に投与した骨髄間質細胞は急性の脊髄損傷を治療できる可能性を示した。髄液投与法は二次的神経損傷もなく、移植細胞も自己の細胞を使用できる可能性があり、臨床応用の可能性を提示できる研究である。

論文審査の結果の要旨

脊髄損傷の治療戦略として神経幹細胞移植の研究が進められてきたが、倫理面や安全性の問題が残っている。本研究では、神経幹細胞の代わりに骨髄間質細胞の脳脊髄液中への注入による急性期脊髄挫滅損傷の治療の可能性を検討した。ラットの大腿骨より採取した骨髄間質細胞を培養し、同系の4週令のラットのTh 8-9のレベルで脊髄に挫滅損傷を加え、すぐに第4脳室から脳脊髄液中に注入した。注入細胞は、注入後2週間までは脳と脊髄全体の軟膜に付着する他、脊髄損傷部内に進入、生着し、突起を伸長していた。注入後3～4週後には注入細胞は確認できなかった。ラットの行動評価は、治療群が行動機能の改善を有意に認めた。組織学的検討では、5週後の脊髄損傷部に形成された空洞容積は治療群の方が有意に小さかった。免疫組織学的に損傷部空洞より尾側の神経組織が治療群においては保存されているのに対して、対照群では保存されている神経組織は少なかった。さらに、骨髄間質細胞を注入した脊髄損傷ラットの注入2日後の脳脊髄液中には、神経細胞塊に投与すると細胞突起を伸長させる作用があった。以上の研究は骨髄間質細胞を第4脳室に注入することで急性期脊髄損傷が治療できる可能性を示し、将来の脊髄損傷の治療方法の開発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17年12月26日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け合格と認められたものである。