

京都大学	博士（医学）	氏 名	小柳 正臣
論文題目	Inhibition of the Rho/ROCK pathway reduces apoptosis during transplantation of embryonic stem cell-derived neural precursors (Rho/ROCK 経路の阻害は ES 細胞由来神経前駆細胞移植の際の移植細胞のアポトーシスを減少させる。)		
(論文内容の要旨)			
パーキンソン病をはじめとする神経難病に対する治療法として幹細胞移植治療に期待が寄せられているが、機能改善のためには十分な量の細胞を生着させる必要がある。しかし移植細胞の90%以上は移植後数日以内に細胞死に至るとされ、その原因として細胞分散、神経栄養因子の不足、炎症反応、低酸素などが挙げられる、細胞分散により細胞がバラバラになると細胞間接着によるシグナルが途絶えて細胞死が起こり、特にanoikisと呼ばれる。 本研究では、マウスES細胞由来神経前駆細胞におけるanoikisのメカニズム解明と細胞生着率向上を目的として、細胞接着分子インテグリンが関与するRho/ROCK経路と細胞死との関係を検討した。 まず、マウスES細胞から神経前駆細胞を誘導しそれらを分散したところ、1時間後にはRhoの活性化が起こり、12時間後に約50%の細胞で細胞死がみられた。この細胞死は、Rho阻害剤のC3毒素、およびRho経路の下流にあたるROCKの選択的阻害剤Y-27632での処理により有意に減少した。さらに、ROCK阻害剤投与により、アポトーシス初期過程にみられる細胞膜構造変化(ブルブ形成)、活性型カスパーゼ3の発現、チトクロームcの細胞体内への放出がいずれも抑制された。以上より、神経前駆細胞の分散後には内因性のアポトーシス経路が活性化され、Rho/ROCK経路がそれに関与していることが明らかとなった。ただし、Rho/ROCK経路阻害剤の投与で細胞死が完全になくなるわけではなく、汎カスパーゼ阻害剤(z-VAD-fmk)の投与でさらに活性型カスパーゼ3の発現が抑えられたので、anoikisにおけるRho/ROCK経路以外の関与も示唆された。 次に、細胞移植後早期における細胞死へのRho/ROCK経路の関与を検討した。神経前駆細胞をマウスの脳内へ移植する際にRho/ROCK経路の阻害剤を同時投与したところ、24および48時間後の細胞死が有意に減少した。移植後には移植片周囲に炎症性サイトカインであるTNF-alphaが発現しており、in vitroの系においてTNF alphaによる細胞死がROCK阻害剤により抑制された。また、移植片周囲には中枢神経障害の際にみられるproNGFも発現していた。proNGFはp75受容体を介して細胞死を誘発し、p75はRhoを活性化することが知られている。神経前駆細胞にはp75が発現していることから、Rho/ROCK経路の阻害によりproNGFを介した細胞死も抑制されることが示唆された。これらの結果より、Rho/ROCK経路は、神経前駆細胞の分散ならびに炎症性サイトカインによる細胞死に関与していることが明らかとなり、これらを阻害することで細胞移植治療における細胞生着率が向上する可能性が示された。 ES細胞からの神経分化誘導における初期導入には細胞分散が必要である。また、ES細胞移植の大きな問題ある腫瘍形成を抑制するためにはセルソーティングなどを用いて神経系細胞のみを選択的に移植する必要があるが、この際にも細胞分散が必要である。本研究によって明らかになったROCK阻害剤による細胞死抑制効果は、ES細胞を用いた細胞移植治療のさまざまな局面での効率化に寄与すると考えられる。さらに、ROCK阻害剤はくも膜下出血後の脳血管れん縮予防薬としてすでに臨床で使われており、実現可能な手段として再生医療への応用が期待される。			

（論文審査の結果の要旨）			
神経前駆細胞移植治療における問題点の一つに移植細胞のアポトーシスがあり、その原因には細胞分散による細胞骨格制御の破綻や宿主脳の炎症反応などが挙げられる。			
本研究では、細胞移植の際のアポトーシスのメカニズムを解明することを目的に、まず細胞骨格制御と関係が深いRho/ROCK経路とアポトーシスとの関係を検討した。マウスES細胞由来の神経前駆細胞を分散すると、細胞間接着の破綻によりRho/ROCK経路が活性化され、細胞膜構造変化(ブルブ形成)などアポトーシスに特徴的な変化が生じた。さらにこれらの変化がRhoおよびROCKの阻害剤によって抑制されたことから、神経前駆細胞分散後のアポトーシスにはRho/ROCK経路が関与している事が明らかとなった。			
次に宿主脳の炎症反応の関与を検討する目的で移植細胞周囲脳の免疫染色を行うと、炎症系サイトカイン TNF-αが発現しており、細胞移植に際してROCK阻害剤を投与すると2日後のアポトーシスが有意に減少した。さらに、神経前駆細胞培養時のTNF-α添加によるアポトーシスをROCK阻害剤が抑制したことから、神経前駆細胞移植の際には分散のみならず炎症によるアポトーシスにもRho/ROCK経路が関与していることが示唆された。			
以上の研究は、神経前駆細胞移植におけるアポトーシスのメカニズム解明に貢献し、神経前駆細胞を用いた再生医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20年7月25日実施の論文内容とそれに関連した試問をうけ、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			