

氏 名	許 儀
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2804 号
学位授与の日付	平 成 17 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 生 理 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Isolation of Neural Stem Cells from the Forebrain of Deceased Early Postnatal and Adult Rats with Protracted Post-Mortem Interval (生後間もない幼若および成体のラット死体の側脳室からの神経幹細胞の分離)
論文調査委員	(主 査) 教 授 河 野 憲 二 教 授 金 子 武 嗣 教 授 鈴 木 茂 彦

論 文 内 容 の 要 旨

神経幹細胞が、成体側脳室の脳室下層と海馬歯状回に存在する事が知られている。一方で、神経幹細胞は移植細胞として組織再生への利用が注目されている。神経幹細胞のソースとして一般に胎児組織が利用されているが、実際には問題が大きい。本研究では、ラットの屍体から神経幹細胞の採取を試み、採取された神経幹細胞が損傷脊髄への移植によって、分化生着するかを検討した。

ラット (SD) は生後 1 日 (P1), 7 日 (P7), 4 週 (P4w), 3 ヶ月 (P3m) のものを用いた。動物は深麻酔によって殺し、冷蔵庫 (4°C) に保存した。死後 1-6 日にわたり、毎日 5 匹ずつ取り出し、P1, P7 の場合は側脳室周囲全体を、P4w, P3m の場合は側脳室の線状体周囲の組織を採取した。HE 染色による組織学的な検索では、低温下に保存された状態で、少なくとも死後 2 日までは脳室周囲組織の明らかな変性所見は見られなかった。採取組織はバラバラにして、EGF と bFGF を含む培養液で浮遊培養し、1-4 日で細胞塊 (neurosphere) の形成を得た。これらの neurosphere は継代が可能であった。neurosphere の数は、培養細胞数 10^4 当たり、P1 の死後 1-2 日 (D1, 2) で 500, D3 以後から急激に減少した。同じく P4w の D1, 2 で、100~150 であった。この neurosphere 形成率は生体から採った場合と同様であった。次にこれらの neurosphere の分化能を調べて、ニューロン (15-25%), アストロサイト (60-70%), およびオリゴデンドロサイト (10-20%) に分化することが分かった。これらのパーセントは P1, P3, P4w, P3m においていずれも同じであった。

P3m の D2 から得られた neurosphere を成体ラットの損傷脊髄に移植した。1 週後、移植細胞は損傷部位に生存し、多くはアストロサイトに分化し、まれにオリゴデンドロサイトに分化していた。また、一部は nestin 陽性のままとどまった。

ラットの脳で、少なくとも死後 2 日は低温下で神経幹細胞が生き残り、通常の生体由来の幹細胞と同じ性質を示すことが明らかとなった。死後一定時間を経た死体から、生体と同じように神経幹細胞が得られる事実は、細胞移植のための神経幹細胞のソースとして注目される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

神経幹細胞が、成体側脳室の脳室下層と海馬歯状回に存在することが知られている。一方で、神経幹細胞は移植細胞として組織再生への利用が注目されている。神経幹細胞のソースとして一般に胎児組織が利用されているが、実際に応用する場合には倫理的な問題が大きい。本研究では、ラットの屍体から神経幹細胞の採取を試み、採取された神経幹細胞が、移植によって、脊髄損傷部位に生着し、分化するかを検討した。

ラットは生後 1 日, 7 日, 4 週, 3 ヶ月の個体を用いた。動物はエーテルの深麻酔によって殺し、4°C に 1~6 日間保存した。

HE 染色による組織学的な検索では、少なくとも死後 2 日までは脳室周囲組織の明らかな変性所見は認められなかった。また、脳室周囲組織を浮遊培養をすることによって、細胞塊 (neurosphere) の形成を得た。Neurosphere の形成率は死後

2日までは生体から採った場合と同じであった。また血清を加えた培地で培養することによって、neurosphere からニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトが分化することを認めた。さらに、生後3ヶ月、死後2日の個体から得られたneurosphere を成体ラットの損傷脊髄に移植した。1週間後、移植細胞は損傷部位に生着し、多くはアストロサイトに分化し、稀にオリゴデンドロサイトに分化した。

死後一定時間を経た屍体から、生体と同じように神経幹細胞が得られる事実は細胞移植のための神経幹細胞のソースとして注目される。

以上の研究は、神経幹細胞の新しい採取源を明らかにし、細胞移植による損傷脊髄の治療法の発展に寄与するところが大きい。

従って、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16年11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。