

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	中 田 顕
論文題目	Regeneration of central nervous tissue using a collagen scaffold and adipose-derived stromal cells (コラーゲンの足場と脂肪由来間質細胞を用いた中枢神経組織の再生)		
(論文内容の要旨)			
コラーゲンの足場(scaffold)に、自己の脂肪由来間質細胞 (Adipose-derived stromal cells (ASCs)) を播種したものをを用いて、脳組織の再生を試みた研究である。ASCs の中には、様々な細胞に分化する能力を持った幹細胞が含まれており、in vitro では数多くの研究がなされている。しかし、in vivo での研究数はまだ少ない。本研究は、一旦損傷を受けた中枢神経組織の再生に、ASCs を播種したコラーゲンの足場が有効かを in vivo で検討したものである。 本研究を行うにあたっては、コラーゲンの足場内に ASCs を播種する技術の開発は必要不可欠である。通常、足場内に細胞を播種する場合、注射針等で細胞懸濁液を足場内へ注入するという方法が取られる。しかし、その場合、足場の内部構造を破壊してしまう恐れがあった。内部構造の破壊は、組織の再生にとって適当とは言えない。そこで、回転培養法と、ガラス棒で足場を軽く押し潰し、潰れた足場が元の形に戻る際に細胞懸濁液を吸収するという現象の二つを組み合わせて用いた。その結果、多量の ASCs をコラーゲンの足場内に、足場の内部構造を破壊することなく播種することに成功した。さらに、より ASCs が足場内に播種出来るよう、コラーゲンの足場の作製方法にも工夫を凝らし、コラーゲン塩酸水溶液の凍結温度を－20℃と定めた。凍結温度が－20℃の場合、コラーゲンの足場の pore size はおよそ 100 μ m となり、この場合、上記方法との組み合わせで、ASCs の播種効率は上昇した。 実験には、オスの Wistar ラット(16 匹)を用いた。左前頭葉の脳皮質に 3×4×3 mm の欠損部を作製し、そこに ASCs を播種したコラーゲンの足場を埋入した群と、コントロールとしてコラーゲンの足場のみを埋入した群をそれぞれ 8 匹ずつ作製した。埋入一ヵ月後に犠牲死させて、埋入部位の組織像を比較検討した。その結果、ASCs を播種した群に於いては、コントロール群に比べて新生血管が有意差をもって多くみとめられた。播種した ASCs の 0.2%は抗 MAP2 抗体と反応することも確認した。また、ASCs は血管内皮にも分化することが他の in vivo の実験で確かめられているが、本研究に於いても、脳実質内に侵入していった一部の ASCs が、血管内皮を構成しているように見える像を確認することが出来た。さらに、両群に於いて、足場埋入部位に gliosis の形成はみとめられなかった。Gliosis の形成は軸索の伸展を妨げると考えられている為、gliosis の形成が見られないコラーゲンの足場は、中枢神経組織再生の為に用いる足場として有効なのではと推察された。 以上より、本研究に於いて、コラーゲンの足場に ASCs を播種したものは、中枢神経組織の再生にとって有効に働くことが in vivo の実験によって確かめられ、この結果は、いわゆる in situ tissue engineering の概念と一致するものである。また、コラーゲンの足場は、gliosis の形成を阻害することが確認された。さらに、凍結温度が－20℃で作製されたコラーゲンの足場には、回転培養法と、ガラス棒で足場を軽く押し潰し、潰れた足場が元の形に戻る際に細胞懸濁液を吸収するという現象の二つの組み合わせによって、足場の内部構造を破壊することなく多量の ASCs を播種することが可能であることが判明した。			

(論文審査の結果の要旨) 脂肪由来間質細胞 (Adipose-derived stromal cells (ASCs)) の中には、多分化能を持った幹細胞が含まれている。本研究は、損傷を受けた中枢神経組織にコラーゲンの足場を置き、その場で ASCs が神経に分化するか否かを in vivo で検討したものである。実験には、オスの Wistar ラットを用いた。左前頭葉の脳皮質に 3×4×3 mm の欠損部を作製し、そこに ASCs を播種したコラーゲンの足場を埋入した群と、コントロールとしてコラーゲンの足場のみを埋入した群をそれぞれ 8 匹ずつ作製した。ASCs の播種方法は、回転培養法および細胞懸濁液中で足場を軽く潰し、再拡張の際に懸濁液を吸収させるという二つの方法を組み合わせて用いた。足場作製時の凍結温度は－20℃とした。足場埋入一ヵ月後、埋入部位の組織像を比較検討すると、ASCs 群に於いては、コントロール群に比べて足場内に新生血管が有意差をもって多くみとめられた。播種した ASCs の 0.2%は抗 MAP2 抗体と反応し、さらに、脳実質内に侵入していった一部の ASCs が血管内皮を構成しているように見える像も確認出来た。また、コラーゲンの足場が gliosis の形成を阻害することも確認出来た。以上の研究はコラーゲンの足場に播種された ASCs が、損傷を受けた中枢神経に与える影響の解明に貢献し、中枢神経組織の再生に寄与するところが大きい。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みとめる。 なお、本学位授与申請者は、平成 22 年 3 月 3 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。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			