

氏 名	ゴ 吳 ン 朔 ハン 帆
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2561 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 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	Immunohistochemical and electron microscopic study of invasion and differentiation in spinal cord lesion of neural stem cells grafted through cerebrospinal fluid in rat. (脳脊髄液経由で移植した神経幹細胞の損傷脊髄への侵入と分化の免疫組織化学的, 電子顕微鏡的検討)
論文調査委員	(主 査) 教 授 笹 井 芳 樹 教 授 橋 本 信 夫 教 授 飯 塚 忠 彦

論 文 内 容 の 要 旨

脊髄損傷などの多くの神経系疾患の治療に神経幹細胞の有効性が期待されている。海馬には神経幹細胞が存在することが知られている。私達はこれまでの研究で、海馬由来の神経幹細胞を脊髄の損傷部へ直接注入したところ移植細胞は損傷部に生着し、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへ分化することを確認した。しかし損傷部への直接注入はそれ自体新たな損傷を引き起こす恐れがある。そこで本研究では、脳脊髄液経由で神経幹細胞を脊髄損傷部に移植できないかを検討した。

海馬由来の細胞は green fluorescent protein を発現しているトランスジェニックラットより採取し培養した。妊娠16日目のラットより胎児を取り出し、海馬を機械的に分離し個々の細胞にした。培養液は DMEM/F12 培地に N2 サプリメントとペニシリン、ストレプトマイシン、bFGF を加えたものを用い、 5×10^5 個/ml の細胞密度で培養を開始した。3～5 日目には培養細胞は浮遊したニューロスフェア（細胞塊）を形成し、これを移植に用いた。脊髄損傷モデルには4週令のラットを用いた。T8-9 のレベルで椎弓切除術を行ない、脊髄に 25g で90秒間の圧挫損傷を加えた。そしてこの脊髄損傷ラットの第4脳室へ培養したニューロスフェアを約 1×10^6 個注入した。移植したラットの評価は術後1, 2, 4, 8ヶ月に行なった。ジアミノベンジジンで全脊髄表面の移植細胞を染色したところ、注入された細胞は脳脊髄液と共にクモ膜下腔を移動し脊髄表面の軟膜に付着していた。2ヶ月目以降になると移植細胞は特に脊髄損傷部の表面に良く付着している傾向にあった。脊髄の断面を蛍光顕微鏡で観察したところ、損傷部では多くの移植細胞が脊髄実質へ侵入遊走し突起を出していた。免疫組織染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察では多くの移植細胞のアストロサイトへの分化が観察された。またオリゴデンドロサイトへ分化しているものもあった。神経根内に認められた移植細胞はシュワン細胞様の形状を呈していた。移植後4ヶ月まではオリゴデンドロサイトへの分化は認められなかったが、8ヶ月では認められるようになった。オリゴデンドロサイトへの分化には長い期間が必要であると考えられる。ニューロンへ分化している細胞はほとんどなかった。損傷脊髄は海馬由来の神経幹細胞をニューロンへ分化させるのには適切な環境ではないと考えられる。また、脊髄内にはシュワン細胞に分化した移植細胞は認められなかったが、神経根の部分には認められた。これらのことから周囲の環境により幹細胞の分化の方向が決定されると考えられる。

以上、脳脊髄液中に注入した神経幹細胞は損傷された脊髄および神経根の表面に付着し、さらに組織実質内に侵入、分化することが明らかとなった。この結果は、脳脊髄液細胞注入法が、新たな損傷を加えることなく移植細胞を脊髄損傷部に投与する有効な方法であることを示し、臨床応用の可能性を拓くものである。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

脊髄損傷などの多くの神経系疾患に対して、神経幹細胞の移植による治療の効果が期待されている。本研究では、神経幹

細胞を脳脊髄液経由によって脊髄損傷部に移植する可能性を検討した。green fluorescent protein 発現トランスジェニックラットの胎児 (E16-17) の海馬から細胞培養系において神経細胞塊 (neurosphere) を作成し、これを移植に用いた。4 週令のラットの T8-9 のレベルで脊髄に圧挫損傷を加えた。圧挫損傷直後に第 4 脳室に神経細胞塊を注入した。移植細胞は脳脊髄液内を移動し、脊髄の軟膜表面、特に損傷部表面に多く付着した。さらに損傷部では移植細胞は脊髄実質内に侵入し、長い突起を出して宿主組織に良く組み込まれた。免疫組織染色により、移植幹細胞からアストロサイトへの分化が多数観察された。またオリゴデンドロサイトへの分化も少数見られた。一方、神経根内に侵入した移植幹細胞はシュワン様細胞に分化した。これらの所見から、移植神経幹細胞の分化は周囲の微細環境により決定されることが示唆された。以上、脳脊髄液中に注入した神経幹細胞は、損傷された脊髄および神経根の表面に付着し、そこからさらに組織実質内に侵入、分化することが明らかとなった。本研究は、大きな手術的侵襲を与えることなく細胞を脊髄損傷部に移植する方法を導入したもので、中枢神経疾患の治療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、学位授与申請者は、平成14年12月4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。