

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	扇 田 秀 章
論文題目	Transplantation of bone marrow-derived neurospheres into guinea pig cochlea （骨髄由来ニューロスフェアのモルモット蝸牛への移植に関する研究）		
（論文内容の要旨）			
感音難聴に対する治療は限られたものしか存在せず、現在のところ、人工内耳、補聴器といったものがあげられる。一方、近年、感音難聴に対する細胞治療の可能性が示されている。今回、ラセン神経節の再生を目的とした蝸牛への移植実験を行った。ラセン神経節は有毛細胞からの信号を中枢に伝達する役割を担っており、また、人工内耳ではラセン神経節を直接電氣的に刺激することにより音の情報を伝達しており、人工内耳を使用する際にもラセン神経節の機能は重要となる。移植細胞として、自己の細胞を用いることが可能で、比較的倫理的問題の少ない、骨髄間質細胞を用いた移植実験を行った。これまでも骨髄間質細胞を蝸牛へ移植を行った実験は散見されるが、移植後神経に分化がみられたものはわずかであった。今回、移植細胞を効率よく神経に分化誘導を行うために、移植前に、骨髄間質細胞を、神経前駆細胞を含むニューロスフェアに分化誘導を行った後に移植を行った。 骨髄間質細胞のドナーとして用いたのはハートレー系モルモットである。モルモットの大腿骨および脛骨を採取し、培養液を用いて骨髄を培養皿に播種した。3回～5回の継代を行い、骨髄間質細胞を分離した。分離した骨髄間質細胞を bFGF、EGF を含む培地で、7日間培養を行い、ニューロスフェアを作製した。ニューロスフェアは神経前駆細胞のマーカである nestin および Musashi-1 陽性となり神経前駆細胞を含むと考えられた。ニューロスフェアの神経への分化能をみるため、ニューロスフェアを retinoic acid、dibutyryl cAMP を含む培地で7日間培養を行った。培養後、ニューロスフェアは突起の伸長を認め神経様の細胞へと形態が変化し、神経細胞のマーカである β-III tubulin 陽性となり、神経様細胞へ分化したと考えられた。 続いて、骨髄間質細胞由来ニューロスフェアの生体での有効性をみるため、ニューロスフェアを、骨髄間質細胞を採取したのと同種であるハートレー系モルモットの蝸牛に移植した。最初にニューロスフェアを正常モルモットの蝸牛に移植を行った。ニューロスフェアを DiI で標識を行い、蝸牛軸に移植を行い、移植4週間後に蝸牛を採取した。移植細胞の分布の評価および β-III tubulin で免疫染色を行い、移植した細胞の神経への分化の有無を確認した。移植した細胞は蝸牛内の鼓室階を中心に生着を認めた。さらに、移植細胞の $18.6 \pm 6.4\%$ が β-III tubulin 陽性となり、神経様細胞に分化したと考えられた。 つづいてニューロスフェアを蝸牛障害モデルに移植を行った。ウアバインを、微細ガラス管を用いて、正円窓より鼓室階に投与を行い、ラセン神経節に障害を与えた。ウアバイン投与1週間後に骨髄間質細胞由来ニューロスフェアを DiI で標識を行った後に蝸牛軸に移植を行った。 移植4週間後に蝸牛を回収し組織評価を行った。また、移植によるラセン神経節の機能の改善の有無を調べるため、細胞移植前および蝸牛回収前に e ABR の測定を行った。DiI 陽性の細胞は蝸牛軸および内耳道に多く存在した。また、移植細胞のうち $24.1 \pm 5.3\%$ が β-III tubulin 陽性となり、神経様細胞への分化を示した。e ABR では移植によるラセン神経節の機能の改善を認めなかった。 移植前に神経前駆細胞に分化誘導を行うことで、特段の分化誘導を行わない場合に比べ移植後高率に神経様細胞に分化することができた。 今後ラセン神経節の機能の改善を目指し、移植方法の改善等が必要と考えられた。			

(論文審査の結果の要旨) 本研究では、ラセン神経節の再生を目的として、骨髄間質細胞をニューロスフェアに分化誘導後に蝸牛軸に移植を行った。モルモット骨髄間質細胞を bFGF および EGF を用いて、ニューロスフェアに分化誘導を行った。ニューロスフェアは神経前駆細胞のマーカである nestin および Musashi-1 陽性となり神経前駆細胞を含むと考えられた。ニューロスフェアを一定の条件で神経への分化誘導を行ったところ、ニューロスフェアは突起の伸長を認め神経様の細胞へと形態が変化し、神経細胞のマーカである β-III tubulin 陽性となり、神経様細胞へ分化し、ニューロスフェアは神経様細胞への分化能を有すると考えられた。 続いて、このニューロスフェアを生体内での神経への分化能をみるため、正常モルモットおよびウアバインによるラセン神経節障害モデルのモルモットに移植を行った。移植4週間後に蝸牛を回収し、組織評価を行ったところ、いずれの蝸牛にも移植細胞の生着を認めた。さらに正常モルモットでは移植細胞の 18.6% が、ラセン神経節障害モデルでは移植細胞の 24.1% が β-III tubulin 陽性となり、移植後、神経様細胞に分化したと考えられた。これはこれまでの報告より高値であり、移植前に神経前駆細胞を含むニューロスフェアに分化誘導を行うことで、特段の分化誘導を行わない場合に比べ移植後高率に神経様細胞に分化することができた。 以上の研究は骨髄間質細胞のラセン神経節への移植方法の解明に貢献しラセン神経節の再生治療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のあるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成22年1月5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			