

る細胞シートの脱着の両方を可能とするヘパリン固定化温度応答性培養表面の開発を行った。この新規温度応答性表面を用いた培養システムは、細胞シート作製の加速化手法として有用であり、迅速な細胞シート治療を達成するための応用が期待される。

### 論文審査の要旨

申請者は、温度応答性培養表面上にヘパリンを効果的に導入した新しい表面を作製した。これにより、ヘパリンと塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) との強い相互作用を利用して表面に有効な bFGF の固定化を行った。この表面上で、細胞増殖の促進に加え、温度低下によって速やかに細胞を脱着させることを表面の活性点の構造制御を動的構造観点から世界に先駆けて成功させた。すなわち、線維芽細胞シートの作製時間を著しく短縮し、しかも表面から剝離を行う手法を成功させた。この表面構造の分子設計によって、細胞増殖の加速と 37℃ から 20℃ に温度を低下することで機能を持った剝離の実現、表面と細胞シートの両方の構造および機能を詳細に解析した。これにより細胞シートの迅速な作製を可能にする表面構造特性を明確にし、細胞シート工学の基盤を確立した。以上により、申請者の主論文は学位論文に相応しいものと判断された。

54

氏名	ワタ ナベ ヨリ カツ 渡 辺 頼 勝
学位の種類	博士 (医学)
学位授与の番号	甲第 559 号
学位授与の日付	平成 25 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 (医学研究科専攻, 博士課程修了者)
学位論文題目	<b>Differentiated and undifferentiated adipose-derived stem cells improve nerve regeneration in a rat model of facial nerve defect</b> (脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いたラット顔面神経再生)
主論文公表誌	Tissue Engineering 投稿予定
論文審査委員	(主査) 教授 岡野 光夫 (副査) 教授 櫻井 裕之, 松岡 雅人

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

脂肪組織由来間葉系幹細胞 (adipose-derived mesenchymal stem cell : ASC) は、脂肪、骨、軟骨、筋肉、さらには神経への分化・誘導が可能であり、現実的に採取が大量かつ簡便なため、临床上利用可能な細胞ソースである。本研究では、未分化な undifferentiated ASC (uASC) から末梢神経再生に不可欠な Schwann 細胞 (differentiated ASC : dASC) を分化誘導させ、uASC と dASC の末梢神経再生能力を in vitro, in vivo 実験にて検証した。

#### 〔実験方法〕

〔uASC の継代培養と多系統分化能の確認〕 生後 8 週ラットの皮下脂肪組織から uASC を選択培養し、第 2, 5 継代目で脂肪、骨、軟骨分化誘導培地を用いて 3 週間培養を行った。各組織に分化誘導された細胞は、Oil red O (脂肪細胞), alizarin red (骨芽細胞), toluidine blue (軟骨細胞) でそれぞれ染色した。〔dASC への分化誘導〕 uASC の第 2, 5 継代目で、Schwann 細胞 (SC) 系統へ約 1 週間かけて分化誘導を行った。〔dASC および uASC の免疫細胞染色〕それぞれの培養細胞を、間葉系幹細胞マーカー Stro-1, 神経前駆細胞マーカー Nestin, SC マーカー S100, NGF p-75 receptor 抗体で蛍光染色した。〔Dorsal root ganglia との in vitro 共培養による neurite outgrowth 分析〕 uASC および dASC のそれぞれの神経再生促進能を測定するために、脊髄後根神経節にある一

次感覚神経細胞 dorsal root ganglia (DRG) と 24 時間非接触培養した。再生神経突起を Tuj1 で染色し neurite outgrowth 分析を行った。[ラット顔面神経欠損部への移植実験] 左顔面神経頰骨枝に作製した 7mm の神経欠損に対し、uASC, dASC, SC 細胞 (各群 n=6) を、10mm シリコンチューブ内に各群  $1.0 \times 10^6$  個ずつコラーゲンゲルに懸濁させた状態にして移植し、移植 13 週目の再生神経の詳細な形態学的解析を行った。コラーゲンゲルのみの群を negative control (NC) 群、自己神経移植を行った群を positive control (PC) 群とした。移植後週 1 回ラット顔面神経麻痺スコアを経時的に評価し、再生神経の機能評価を行った。

#### 〔結果〕

本法では、uASC から dASC への安定した分化誘導が可能であり誘導も効率 80% 以上と高かった。In vitro 実験による neurite outgrowth 分析では、dASC は uASC と比較して有意 ( $p < 0.01$ ) に神経突起の再生を促進することが示された。一方、in vivo 実験では、uASC 群、dASC 細胞群、SC 群間に形態学的 (再生軸索数、ミエリン厚、軸索断面積) にも機能的にも有意差は見られなかったが、いずれも NC 群と比較して有意差 ( $p < 0.05 \sim 0.001$ ) を認めた。移植 12 週以降で、uASC 群、dASC 細胞群、SC 群とも自家神経移植した PC 群との機能的有意差を認めず、機能回復のキャッチアップが認められた。

#### 〔考察〕

末梢神経損傷では、SC から神経成長因子が分泌され神経軸索の伸長が促進されるが、in vitro 実験の結果からは、dASC から uASC よりも有意に多くの神経成長因子が産生されたことが推察される。一方、in vivo 実験で uASC 群、dASC 群、SC 群間で有意差が認められなかったのは、in vivo の神経再生環境では神経成長因子以外に、主に uASC 由来とされる線維芽細胞・血管内皮細胞成長因子の作用や細胞間・細胞外マトリックスの接触作用による細胞活性化機構などの要因が関与していることが示唆された。

#### 〔結論〕

uASC および dASC とともに SC と同程度に末梢神経再生促進能力を有しており、その臨床応用可能性の更なる検討が今後の課題である。

## 論文審査の要旨

体内に大量に存在し採取が容易な脂肪幹細胞 (ASC) をシュワン細胞に代わる細胞ソースとして用い、末梢神経再生促進の可能性を検討した。ASC は、安定してシュワン細胞への分化誘導が可能であり、一次感覚神経との共培養実験において有意に神経突起再生を促進した。一方、ラット顔面神経欠損モデルへの人工神経チューブを用いた細胞移植実験では、ASC 群、ASC 由来シュワン細胞群、シュワン細胞群間に形態学的・機能的に有意な差を認めなかった。いずれの細胞群もコントロール群と比較し良好な神経再生を認めた。移植 12 週以降、いずれの細胞群も自家神経移植群で機能に有意差を認めず、生体内神経再生には、神経成長因子の他に線維芽細胞・血管内皮細胞成長因子、細胞間接着など複雑な要因の関与の重要性が示唆された。ASC、ASC 由来シュワン細胞とともに末梢神経再生促進能力を有することを明らかにし、シュワン細胞に代わる細胞ソースに関する再生治療の重要な基盤を構築し、学位論文として相応しいものと判断された。