

論文審査の結果の要旨

申請者名 新井清隆

提出された新井清隆氏の学位論文について、平成 29 年 1 月 25 日、5 名の審査委員（原 康、新井敏郎、高橋公正、盆子原 誠、原田恭治）が最終試験を行った。論文審査の結果は以下の通りである。新井清隆氏の学位論文のテーマは、急性期脊髄損傷に対する骨髄由来単核球移植療法的作用機序及び肝細胞増殖因子の関与に関する研究であり、本論文は第一章（序論）に始まり、全部で六章構成となっている。

脊髄損傷は人医学および小動物医学領域でしばしば遭遇する重篤疾患である。重度の脊髄損傷を受傷した動物では運動、感覚、および生理機能は回復せず後遺症として残り、QOL の著しい低下を招く。臨床的には重度の脊髄損傷に対する有効な治療法が確立されていないことが問題視されており、新たな治療法の開発が急務となっている。脊髄損傷に対する治療の焦点は、脊髄損傷のステージにより異なり、急性期に対しては損傷直後に周囲に波及する二次性損傷を抑制し、退行性変化を減弱することが主目的となる。一方、二次性損傷が収束した慢性期では軸索の再伸展を促し、破壊された神経回路の再構築が主目的となる。特に慢性期の治療は困難を極めることより、急性期に二次性損傷の拡大を制限することが、慢性期における機能回復の可能性を高めると考えられている。近年、脊髄損傷に対して細胞移植療法が治療効果を発揮することが明らかにされ、多くの移植用細胞について報告がなされている。骨髄由来間葉系幹細胞（bone marrow-derived mesenchymal stem cell: BMSC）はその代表的存在であるが、細胞の採取から分離培養までに時間を要することから、脊髄損傷の急性期に対する治療には適していない。これに対して、骨髄由来単核球（bone marrow-derived mononuclear cell: BM-MNC）は採取直後に患者への投与が可能である。また 2001 年には脊髄損傷に対する治療効果も確認されており、その臨床応用に期待が持たれている。しかしながら、治療効果発現に関わる BM-MNC の作用機序に関してはいくつかの報告がみられるものの、不明な点が少なくない。このような背景の中で、申請者は急性期脊髄損傷に対する BM-MNC 移植療法において BM-MNC の作用

機序を明らかにすることを目的として研究を展開しており、さらにその研究過程で BM-MNC が産生する肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) に着目し、同作用機序における HGF の関与について解析を行っている。

第二章 損傷脊髄における BM-MNC の血管構成細胞への分化能

細胞移植療法において、BM-MNC が移植部位で示す分化動態に関しては、損傷組織の特異的な微小環境によって運命が決定されることが推測されている。これまで、心筋梗塞や下肢虚血モデルで解析された結果では、BM-MNC は血管内皮に分化し血管新生を促進していることが明らかにされているが、脊髄損傷においては移植後の BM-MNC の細胞動態を解析した報告はない。申請者は、損傷急性期の脊髄に移植した BM-MNC による血管新生促進効果の機序を明らかにすることを目的として実施している。緑色蛍光蛋白 (Green fluorescent protein: GFP) でトラッキングした BM-MNC をラットに作製した急性期脊髄損傷モデルの脊髄内に移植し、BM-MNC の脊髄微小血管構成細胞への分化能を検討している。その結果、BM-MNC は移植後 3～7 日に損傷脊髄内の血管周囲に局在していることを確認している。損傷脊髄内で BM-MNC の接着を伴う血管の割合は移植後 3 日に比較して移植後 7 日において有意に増加した。さらにこの BM-MNC は中枢神経系に存在する血管周囲マクロファージのマーカー (CD163) に免疫反応性を示すことを明らかにしている。詳細な機序は解明されていないが、BM-MNC 移植療法においては、マクロファージは血管内皮との相互作用によって血管新生を促進することが報告されている。以上より、申請者は急性期脊髄損傷に対する BM-MNC 移植療法においても、BM-MNC 由来マクロファージが損傷を受けた血管周囲に集積そして接着し、血管内皮細胞との相互作用によって血管新生を促進している可能性を推測している。

第三章：損傷脊髄における BM-MNC の成長因子産生能

申請者は、損傷急性期の脊髄に投与した BM-MNC の局所における生存期間、そして成長因子の産生について解析することを目的として実施している。ラットに作製した急性期脊髄損傷モデルに対して GFP でトラッキングした BM-MNC を移植し検討している。その結果、移植後、

BM-MNC は損傷中心部において多数確認されたものの、移植 3 日から 7 日後にかけては減少すること、そしてその一部は活性型 caspase-3 に免疫反応性を示すことを確認している。また移植床において BM-MNC は HGF、血管内皮増殖因子 (VEGF)、および単球走化性因子-1 (MCP-1) などの成長因子に免疫反応性を示し、なかでも HGF の発現率が有意に高いことを確認している。さらに損傷 3 日後において BM-MNC 移植ラットではコントロールに対して活性型 caspase-3 の免疫反応性が有意に低下していた。以上より申請者は、移植した BM-MNC が少なくとも 1 週間は損傷部位に留まり、HGF を主体とした成長因子を産生していることを明らかとしている。また損傷急性期の脊髄においては、HGF の受容体である c-Met の発現量に対して内因性 HGF の産生量が極めて低いことが知られていることより、BM-MNC は渴望状態にある HGF を組織に供給することで HGF/c-Met signaling を活性化させ、抗アポトーシス効果を発揮している可能性を示唆している。

第四章 BM-MNC による HGF のパラクラインを介した神経細胞保護効果

HGF は Rac-1 の不活性化を介した活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) 産生抑制や Bcl-2 の発現誘導によって細胞死を強力に抑制することが報告されている。申請者は、第三章の成績から急性期脊髄損傷における BM-MNC の抗アポトーシス効果は HGF のパラクラインによってもたらされていると仮説をたてている。第四章では神経細胞モデルであるラット褐色細胞腫細胞株 (PC12) に塩化コバルトで細胞死を誘導し、このアポトーシス誘導 PC12 細胞に対する BM-MNC による神経細胞保護効果の作用機序を HGF のパラクラインおよび ROS 産生に着目し解析している。その結果、BM-MNC は HGF のパラクラインによって神経細胞 (PC12 細胞) の c-Met をリン酸化し、ROS 産生量を減少させることを明らかとしている。これらの効果は c-Met 阻害剤 (SU11274) によって抑制され、同時に細胞死抑制効果も低下した。以上より申請者は BM-MNC は少なくとも一部は HGF/c-Met signaling を介して ROS 誘発性細胞死を抑制する機序が関与しているものと考察している。また臨床的には、受傷した脊髄内部ではその直後に ROS 産生が誘導され 2 ~ 3 日以内に収束する。従って、BM-MNC 移植療法は損傷後 2 日以内に移植することで最も効果が期待されると臨床的考察を述べている。

第五章 急性期脊髄損傷に対する BM-MNC および HGF の脊髄実質投与方法による治療効果の比較

これまでの検討より、HGF を BM-MNC の代わりに急性期脊髄損傷に投与することで、同等あるいはさらに効率的に治療効果が得られる可能性が推測されたことより、申請者は *in vivo* モデルを使用して HGF の治療効果を検討している。この検討ではラットに作製した脊髄損傷急性期モデルを対象として、HGF 群、BM-MNC 群、そして対照群の三群を設定して行われている（いずれも脊髄実質内投与）。評価は MRI 拡散テンソル画像法（DTI）、組織学的検討、そして運動機能試験を行い、三群間の比較をもとに解析を行っている。その結果、DTI による経時的な解析では、損傷 2 週後において対照群に比較して、BM-MNC 群および HGF 群の Fractional anisotropy 値（FA 値）は有意に高値を示し、軸索変性が持続的に抑制されることを確認している。また免疫組織化学的には、HGF 群では神経細胞の脱落および軸索変性を抑制することが確認されたが、血管新生および運動機能の改善は BM-MNC 群に比較して軽度であったことを確認している。以上より、申請者は HGF 脊髄実質単回投与方法は急性期脊髄損傷に対して組織保護効果を示すが、BM-MNC 移植法に比較すると臨床的效果は低いと結論づけている。

このように申請者は、急性期脊髄損傷に対する BM-MNC 移植療法の直接的な作用機序として、BM-MNC に由来したマクロファージが損傷血管周囲へ集積し、血管内皮細胞との相互作用が血管新生を促進している可能性を示唆し、また間接的な作用機序として、BM-MNC は損傷部位で HGF を主体とする種々の成長因子を産生し、また少なくともその一部は c-Met のリン酸化を介して ROS 産生を減少させることによって神経細胞死を抑制していることを明らかにした。以上の数多くの知見は、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。