

Title	マウス骨髄由来間葉系幹細胞による末梢神経再生能の評価
Author(s)	山内, 裕香子
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56127
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (山内 裕香子)	
論文題名	マウス骨髄由来間葉系幹細胞による末梢神経再生能の評価
論文内容の要旨	
<p>【研究目的】</p> <p>幹細胞を用いた再生医療に関わる研究は近年、様々な分野において盛んに行われているが、その中で間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells ; MSCs) は、歯科領域において特に重要な幹細胞と考えられている。MSCsは歯髄腔や骨髄腔に存在すると考えられているが、単離する方法が確立されていないため不明な点も多い。骨髄から採取できる骨髄ストローマ細胞 (bone marrow stromal cells ; BMSCs) はMSCsを含む細胞集団であるが、骨や脂肪組織など間葉系組織のみならず、神経を含めた様々な組織へ分化し得る幹細胞として、すでに多くの研究で用いられている。近年我々は、磁気ビーズを用いてマウスBMSCsより幹細胞を濃縮する方法を見出した。この方法により得られた細胞集団 (Highly purified osteoprogenitors : HipOPs) は骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞への高い分化能を持つことが示されたが、神経系への分化能については未だ明らかとなっていない。そこで本研究ではHipOPsの神経系への分化能について解析することを目的とした。</p> <p>【材料と方法】</p> <p>1. 間葉系幹細胞集団HipOPsの精製</p> <p>C57BL/6Jマウスの大腿骨および脛骨より骨髄を採取し、セルストレーナーを用いて軟組織を除去した。DMEMとF-12を3:1にて配合し、さらに10%FCSと1%抗生物質を添加した培養液にてこれらの細胞を培養した。3日後にPBSを用いて浮遊細胞を除去し、以後3日毎に培養液を交換して、計2週間の培養の後にTrypsin-EDTA処理にて付着細胞を回収した (BMSCs)。さらにBMSCsと、血球系細胞のマーカー分子に対する抗体 (抗CD5、抗CD45、抗CD11b、抗Gr-1、抗7-4、抗Ter-119、抗CD45R) を結合したマグネティックビーズとを反応させた。反応後、細胞をマグネティックカラムに通し、回収した細胞集団 (HipOPs : highly purified osteoprogenitors) を間葉系幹細胞として以下の実験に供した。</p> <p>2. HipOPsのneurosphere形成能の評価</p> <p>DMEM/F-12(3:1)に1%抗生物質、40ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF)、20 ng/ml epidermal growth factor (EGF)、2% B-27 supplementを加えた培地を作製し、非接着性培養皿でHipOPsを培養した。培養液は3日毎に半量を交換し、その際にbFGF、EGF、B-27は2倍濃度添加した溶液を用いた。形成されたneurosphereから細胞を分離し、継代培養した。一方で、neurosphereから分離した細胞をpoly-D-lysineおよびlamininでコーティングしたスライド上で、5%FCS添加DMEM/F-12(3:1)にて培養した。</p> <p>3. Limiting dilution 法</p> <p>BMSCsおよびHipOPsに含まれるneurosphere形成細胞の割合を求めるため、非接着性の96穴プレートにBMSCsを1.5×10^4、3×10^4、5×10^4、1×10^5、1.5×10^5の各細胞数にて、またHipOPsを1×10^3、3×10^3、</p>	

6×10³、1×10⁴、1.5×10⁴にて播種した。2. と同様の培地上で培養し、3日目に培養液の半量を交換した。1週間の培養の後、neurosphere形成の有無を判定し、その割合から各細胞群における前駆細胞の含有率を算出した。

4. イソフルラン吸入麻酔下でCrlj:CD1-Foxn1nuマウス左側坐骨神経を露出し、切断または1.5mm切除した。各マウスは、手術後2週間毎に8週間後まで、von Freyテストおよび行動試験によって坐骨神経の機能を評価した。

5. HipOPsの神経再生能のin vivoにおける評価

5×10⁵ HipOPs、5×10⁵ BMSCs、5×10⁶ BMSCsおよび5×10⁵ HipOP由来神経幹細胞(HipOP-NSCs)を10%FCS添加DMEM/F-12(3:1)溶液に懸濁し、コラーゲンスポンジ(Gelform®)に導入した。また、controlとして溶液のみを導入した。マウス左側坐骨神経を1.5mm切除し、間隙にコラーゲンスポンジを移入し皮膚縫合を行った。4. と同様に坐骨神経の機能を評価した。HipOP-NSCs移植後3ヶ月で、坐骨神経切除部位を含む組織を摘出し、p75およびH-2K^kを用いて蛍光免疫染色を行った。

【結果】

1. HipOPsはbFGF、EGF存在下でneurosphereを形成した。このneurosphereに含まれる細胞は蛍光免疫染色によってnestin陽性を示した。
2. HipOPs由来neurosphereより得られた細胞は、継代培養によって新たなneurosphereを形成した。またFCS存在下で分化させた細胞はシュワン細胞様の細胞像を示した。
3. HipOPsはBMSCsに比べてneurosphere形成能が高かった。また、limiting dilution法の結果より、BMSCsに含まれるneurosphere形成細胞の割合は1/45,000であったのに対し、HipOPsでは1/410で、HipOPsで100倍以上高かった。
4. 坐骨神経を切断したマウスはvon Freyテスト、行動試験のいずれにおいても部分的な回復を認めたが、1.5mm切除したマウスの回復は限局的であった。
5. HipOPsを移植した群の末梢神経機能は、von Freyテスト、行動試験のいずれにおいてもcontrol群に比べて有意に高い回復を認めた。
6. BMSCs移植による末梢神経機能の回復は限定的であり、移植細胞数を10倍にした場合でも術後いずれの時点においてもHipOPsを移植した群に比べて回復効果は低かった。
7. HipOP-NSCsを移植した群は末梢神経機能の回復効果が最も高く、短期間でも有意に機能回復を認めた。
8. 蛍光免疫染色においてH-2K^k陽性細胞はp75陽性を示し、移植されたHipOPsがin vivoにおいてシュワン細胞に分化し神経細胞再生に寄与していることが示唆された。

【考察および結論】

マウス骨髄由来幹細胞集団HipOPsは、bFGF、EGFを含む培養培地上で自己複製可能なneurosphereを形成し、分化誘導によってシュワン細胞様の細胞を認めた。これらのことから、HipOPsは神経幹細胞に分化し得る幹細胞を含む細胞集団であることが明らかとなった。またHipOPsは細胞源となるBMSCsに比べてneurosphere形成能に優れ、幹細胞が濃縮されていることが示唆された。一方で、マウス移植実験により、HipOPsの移植によって損傷した末梢神経の機能が回復することが確認された。以上の結果より、HipOPsは間葉系組織のみならず、神経組織にも分化可能であることが明らかとなり、多様な組織に分化し得る幹細胞として再生医療に有用な細胞源であることが示された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (山 内 裕 香 子)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	林 美加子
	副 査	教授	野田 健司
	副 査	准教授	豊田 博紀
	副 査	講師	村上 智彦
論文審査の結果の要旨			
<p>本研究は、マウス骨髄由来新規幹細胞集団である HipOPs (Highly Purified Osteoprogenitors) の神経細胞誘導能および神経再生能を検証することを目的として行ったものである。</p> <p>その結果、HipOPs は神経幹細胞に分化しうる幹細胞を高濃度に含む細胞集団であることが明らかとなった。さらに、HipOPs を坐骨神経損傷マウスに移植して神経機能の回復について解析したところ、感覚機能および運動機能について有意な回復が認められ、神経再生能が示された。</p> <p>本研究で明らかとなった HipOPs の神経再生能は、歯髄組織や末梢神経の再生医療研究に貢献するものであり、本研究は博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。</p>			