

氏名	池田 剛		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	博甲第 7853 号		
学位授与年月	平成 28年 3月 25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Adipocyte-derived stem cells have therapeutic effect in a rat stroke model (脂肪細胞由来幹細胞はラット脳虚血モデルにおいて治療効果を有する)		
主査	筑波大学教授	医学博士	青沼 和隆
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	瀬尾 由広
副査	筑波大学講師	博士 (医学)	石井 亜紀子
副査	筑波大学助教	博士 (理学)	高崎 真美

論文の内容の要旨

(目的)

脳梗塞は死亡や寝たきりにつながる重篤な疾患であり、社会的損失も大きい。急性期脳梗塞に対する治療法としては、近年血栓溶解療法や血栓回収療法などが導入されたが、その効果は限定的で **therapeutic time window** も限られている。急性期に血流再開が間に合わずに脳梗塞が完成されてしまうと、以降は再発予防とリハビリテーション以外の有効な治療が乏しいのが現状である。そのため、新規脳梗塞治療として期待されているのが細胞治療の分野である。脳梗塞に対する細胞治療の報告は、様々な細胞源を用いた基礎研究がなされており、骨髄由来幹細胞などの組織由来間葉系幹細胞においては臨床研究も進んでいる。しかし、細胞治療においては細胞精製に高度な技術を要するという問題や組織採取の際の侵襲性の問題、倫理面の問題、生体内での腫瘍化の問題など、複数の問題点が残されている。つまり、細胞治療を臨床応用・一般化するためには、簡便に精製できて安全性の高い細胞源が必要となる。そのような細胞源として、成熟脂肪細胞から精製される幹細胞が注目されている。この脂肪細胞由来幹細胞は、これまでも脳梗塞治療研究がなされている脂肪組織由来幹細胞とは全く異なる細胞群であり、異種細胞の混在が極めて少ない特徴を持つ。細胞の均一性が高いことは、臨床応用する際には安全性につながるものと考えられ、各分野で治療研究が進んでいる。しかし、脂肪細胞由来幹細胞は脳梗塞治療として有効であるかは未だ証明されていない。そこで本研究は、脂肪細胞由来幹細胞の脳梗

塞に対する治療効果についてラット脳虚血モデルを用いて明らかにし、その機序を解析することにより脳梗塞の再生治療における新たな細胞源を確立し、臨床応用・発展に寄与することを目的とした。

(対象と方法)

組織内で投与した細胞を可視化するために、GFP 陽性の脂肪細胞由来幹細胞を精製した。GFP トランスジェニックラットの皮下脂肪組織を採取し、コラゲナーゼ処理を行い遠心し、上層に分離される成熟脂肪細胞を回収した。成熟脂肪細胞を天井培養という特殊な培養法で培養し、脂肪細胞由来幹細胞を精製した。動物モデルには体重 250-300g の雄性 SD ラットを使用した。塞栓糸を用いて中大脳動脈閉塞を行った後に塞栓糸を抜去することで虚血時間が 60 分のラット脳虚血モデルを作成した。脳虚血後 24 時間で尾静脈より 1×10^6 個の細胞を投与し、虚血後 14 日間における生存率を評価した。生存したラットにおいて脳虚血後 14 日目に脳を摘出し、脳梗塞面積について比較した。神経症状は脳虚血後 1 日目・7 日目・14 日目に Rogers scale とロータロッド試験にて評価した。他に、投与細胞の分布の検討や免疫組織学的検討を行った。

(結果)

脂肪細胞由来幹細胞を投与した群では、細胞を投与していないコントロール群と比較し、生存率が有意に高かった。また、細胞投与群では有意差をもって脳梗塞面積の縮小を認めた。神経機能評価については、Rogers scale とロータロッド試験の双方において、細胞投与群で有意な神経症状の改善を認めた。脳組織の評価では、投与した脂肪細胞由来幹細胞が患側でのみ確認された。免疫染色では、虚血辺縁領域で BDNF の発現が上昇しており、GFAP の発現が低下していた。

(考察)

本研究では脂肪細胞由来幹細胞が脳梗塞治療効果を有することが示された。脂肪細胞由来幹細胞による脳梗塞縮小効果は中大脳動脈と前大脳動脈の血流支配の境界領域にみられた。また、他の間葉系幹細胞で知られるのと同様に、脂肪細胞由来幹細胞は脳梗塞巣へ遊走するものと考えられた。細胞投与群では虚血辺縁領域における BDNF の発現が上昇していたため、脂肪細胞由来幹細胞が神経保護因子の発現を促進して神経保護作用を発揮することで脳梗塞治療効果を有しているものと考えられた。また、GFAP の発現低下は活性化アストロサイトの抑制を示すと考えられ、脳梗塞急性期に神経障害性に作用する活性化アストロサイトの抑制作用が抗炎症作用として機能し、脳梗塞治療効果を発揮したものと考えられた。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究では、死亡や寝たきりにつながる重篤な疾患である脳梗塞に対し、脂肪細胞由来幹細胞が脳梗塞治療効果を有することを明確に示した。同時に、他の間葉系幹細胞と同様に脂肪細胞由来幹細胞が脳梗塞巣へ遊走する事を示した。また、脂肪細胞由来幹細胞投与群では虚血辺縁領域における BDNF の発現が上昇しており、脂肪細胞由来幹細胞が神経保護因子の発現を促進して神経保護作用を発揮することで脳梗塞治療効果を有している事を示した。また、脳梗塞急性期に神経障害性に作用する活性化アストロサイトの抑制作用が抗炎症作用として機能し、脳梗塞治療効果を発揮することを示した。

平成 28 年 1 月 8 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。