

Title	Comparison between Fetal Spinal-Cord-and Forebrain-Derived Neural Stem/Progenitor Cells as a Source of Transplantation for Spinal Cord Injury.
Sub Title	ラット胎児脊髄由来神経幹細胞と前脳由来神経幹細胞の損傷脊髄内への移植効果の比較
Author	渡邊, 航太(Watanabe, Kota)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.3 (2005. 9) ,p.9-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050902-0009">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050902-0009</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# Comparison between Fetal Spinal-Cord- and Forebrain-Derived Neural Stem/Progenitor Cells as a Source of Transplantation for Spinal Cord Injury.

(ラット胎児脊髄由来神経幹細胞と前脳由来神経幹細胞の損傷脊髄内への移植効果の比較)

渡 邊 航 太

## 内容の要旨

【緒言】われわれはラットやサル脊髄損傷に対する胎児脊髄由来神経幹細胞 (SpNeural Stem/Progenitor Cell: NSPC) 移植の有効性を報告してきた。今後この成果を臨床応用するためにはNSPCの大量供給が重要な課題である。本研究の目的は、ラット脊髄損傷に対しラットSpNSPCとより増殖能の高い前脳由来 (Fb) NSPCを移植し、組織学的ならびに機能的評価を行い、FbNSPC移植の損傷脊髄治療に対する有効性を検討することである。

【材料・方法】NSPCはGFPトランスジェニックラットの胎齢14日の胎児前脳および脊髄より、WeissらのNeurosphere法に基づきNSPCを培養した。3回の継代後のNSPCを実験に使用した。1) *in vitro* Differentiation assay: Neurosphereを5日間分化培養しphenotypeを検討した。2) *in vivo* 脊髄損傷作製とNSPC移植: S-Dラット (230-250g) に対し脊髄圧挫損傷を作製し (Th10, 10g, 25mm)、損傷9日後に損傷部にNSPC ( $1 \times 10^6$ /ml, 5 $\mu$ l) を移植した。SpNSPC移植群 (N=20)、FbNSPC移植群 (N=18)、コントロール群 (medium注入) (N=10) を作製した。3) 組織学的検討: 移植後12週の時点で、免疫組織学的評価を行った。一次抗体はGFP、Hu、GFAP、APC、RT97抗体、ニューロンのtransmitter phenotype決定のためGABA、Glutamate、Glycine抗体を使用した。4) 運動機能評価: BBBスコアとInclined plane testを用いて移植後12週まで機能評価を行った。

【結果】1) *in vitro*: 分化誘導後、ニューロンの割合はSpNSPCで31.6%、FbNSPCで43.6%、オリゴデンドロサイトの割合は23.9%、12.4%で両群間に有意差を認めたが、アストロサイトの割合は43.3%、44.0%で両群間に有意差は認めなかった。2) *in vivo*: 損傷脊髄に移植したSpおよびFbNSPCは良好に生着した。ニューロンの割合はSpNSPCで7.9%、FbNSPCで17.8%、オリゴデンドロサイトの割合は39.3%、13.9%で両群間に有意差を認めた。アストロサイトの割合は53.0%、65.5%と有意差はなかった。さらに、両群でGABA陽性細胞、Glutamate陽性細胞、Glycine陽性細胞を認めた。機能評価ではBBBスコア、Inclined plane testにおいて、両NSPC移植群ともコントロール群に比べ、有意な機能回復を認めた。しかし、FbNSPC群とSpNSPC群間に有意差は認めなかった。

【考察】移植した両NSPCはいずれも良好に生着し、3つのphenotypeに分化していた。興味深いことにin vivoとin vitroの分化特徴は一致していた。さらに、本来脳では認められないGlycine陽性ニューロンがFbNSPC移植群より認められ、損傷脊髄内の微小環境により脊髄ニューロンへ誘導されたと考えられた。機能評価で両NSPC移植群はコントロール群に比べ良好な回復が認められた。損傷脊髄に対する胎児由来NSPC移植を臨床応用するための大量供給の問題を、増殖能が高いFbNSPCを用いることで解決できる可能性を示唆しており、非常に意義深いものと考えている。

## 論文審査の要旨

今まで不可能とされてきた損傷脊髄の再生研究において、我々はラットやサル脊髄損傷に対する胎児脊髄由来神経幹細胞 (NSPC) 移植の有効性を報告してきた。今後この成果を臨床応用するためにはNSPCの大量供給が重要な課題である。そこで本研究では、ラット脊髄損傷に対しラット脊髄由来 (Sp) NSPCとより増殖能の高い前脳由来 (Fb) NSPCを移植し、組織学的ならびに機能的評価を行い、FbNSPC移植の損傷脊髄治療における有効性を検討した。NSPCをGFPトランスジェニックラットの胎児前脳および脊髄より培養し、成体ラット胸髄圧挫損傷を作製し、損傷9日後に損傷部に移植した。移植後12週で組織学的評価を行った。運動機能評価はBBBスコアとInclined plane testを用いて移植後12週まで行った。移植した両NSPCはいずれも良好に生着し、3つのphenotypeに分化していたが、ニューロンの割合はSpNSPCで、オリゴデンドロサイトの割合はFbNSPCで有意に高い結果となった。さらに両NSPCはGABA陽性ニューロンとGlutamate陽性ニューロン、そして本来前脳ではほとんど認められないGlycine陽性ニューロンに分化した。機能評価では両NSPC移植群ともコントロール群に比べ、良好な機能回復を認めた。しかし、両NSPC群間に有意差は認めなかった。

審査では、損傷脊髄へFbNSPCを移植した場合にGlycine陽性細胞を認めた理由を質問された。これに対し、移植細胞の採取部位、採取の時期による影響が考えられるが、一番の原因は損傷脊髄内の微小環境にあると考えられる。しかしその詳細は不明なので、SpNSPCを前脳に移植するなどの方法で検討していく必要があると回答された。次に、移植細胞のphenotypeの分化率と細胞の採取時期について質問がなされた。これに対し、今回は胎生14日に採取した細胞しか検討していないが、採取時期により比率は変化する可能性もある。しかし、損傷脊髄内の微小環境の影響が強ければ比率は変わらない可能性もあると回答された。次に、移植細胞のphenotypeの分化率は両群間で異なるのに、運動機能評価で両NSPC群間に有意差を認めなかった理由を質問された。これに対し、未だどの細胞が機能回復に最も寄与しているかは不明であり、阻害因子と考えられているアストロサイトも機能回復に大きな役割を演じている可能性がある。もう少し鋭敏な機能評価法を開発すれば差を検出できる可能性があるが、現在のところ本実験で使用した方法以上に信頼性のある評価法は無く、今後の課題であると回答された。

以上のように、本研究は未だ検討されるべき点を残しているものの、より増殖能の高いFbNSPCを脊髄損傷の移植材料として使用できることを証明することにより、将来の臨床応用における移植細胞の大量供給の問題を解決できる可能性を示唆したという点で有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科 戸山 芳昭  
内科学 鈴木 則宏 解剖学 仲嶋 一範  
外科学 河瀬 斌  
学術監理担当者: 北島 政樹、鈴木 則宏  
審査委員長: 鈴木 則宏

試問日: 平成17年 5月18日