



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Safe and efficient expansion of human bone marrow stromal cells in platelet lysate and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) for cell therapy [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	山内, 朋裕
Description	配架番号 : 2110
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11238号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56236
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Tomohiro_Yamauchi_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 山内 朋裕

主査 教授 近藤 亨
審査担当者 副査 教授 實金 清博
副査 教授 佐々木 秀直
副査 教授 神谷 温之

学 位 論 文 題 名

Safe and efficient expansion of human bone marrow stromal cells in platelet lysate and
granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) for cell therapy
(血小板濃厚液と顆粒球コロニー刺激因子を用いた、安全で効率的なヒト骨髄間質細胞の培養法)

様々な幹細胞を利用した細胞移植療法は、脳梗塞に対する新たな治療法として注目・期待されている。その中でも自己骨髄から採取可能である骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cells; BMSC) は、本来の中胚葉系細胞への分化に加えて神経系細胞にも分化する多能性を有し、腫瘍形成の危険性が低いことや倫理的・疫学的な障壁が少ないことに加え、脳梗塞モデル実験への移植により脳機能を改善する事が明らかにされている。このように BMSC は脳梗塞に対する臨床応用に最も適応可能な幹細胞と期待されるが、臨床応用に向けて克服すべき 2 つの課題がある。1 つはウシ胎児血清 (FCS) を利用しない新たな BMSC 培養方法の確立であり、もう 1 つは BMSC の培養促進法の確立である。脳神経系外科学分野では FCS に変わるヒト血小板濃厚液 (human platelet lysate; PL) を用いた BMSC の新規培養・維持法を確立しており、本研究では PL 含有培地へ顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte-colony stimulating factor; G-CSF) の添加がヒト BMSC の増殖を促進する事を明らかにした。更に、PL/G-CSF 培地で培養した BMSC を移植した脳梗塞モデルラットが FCS 培地や PL 培地で培養したヒト BMSC を移植した場合以上に運動機能を回復することも明らかにしている。これらの結果は移植用ヒト BMSC の確保・維持を可能にする重要な研究成果である。

この発表に対し、始めに副査の佐々木秀直教授から個人や年齢により PL の質に違いがあるかの質問があった。申請者は PDGF 等の因子の量に変動があると回答した。次に、動物実験において脳梗塞 7 日目に BMSC を移植した理由についての質問があった。これに対して申請者は、臨床応用を念頭に脳梗塞 7 日後（急性期から亜急性期の脳梗塞モデル）に BMSC 移植を行ったと回答し

た。佐々木教授から移植治療に必要な自家 BMSC 細胞数を得るために必要な培養期間について質問があった。これに対して申請者は現在の方法では6週間かかると回答した。このことから更なる培養期間の短縮方法の開発と他家移植の検討などの余地が残されているとの回答もした。

続いて副査の神谷温之教授から、ローター実験は小脳の機能を調べるには有効であるが、線条体に移植した BMSC による脳梗塞モデルの機能回復を検討するには適切であると思えないとの質問があった。これに対して申請者は、線条体への BMSC 移植により脳梗塞モデルラットの運動機能が回復する事は明らかであるが、その具体的なメカニズムは不明であり、BMSC 由来因子による神経保護効果や神経系細胞への分化が総合的に機能回復に働いているものと考えられると回答した。また、NeuN 陽性神経細胞の分化程度に関する質問に対して、申請者は成熟神経細胞のマーカーであると回答した。BMSC が分化する神経細胞のサブタイプについての質問に対しては、GABA 産生ニューロンへの分化が観察されていると回答した。更に、BMSC 由来神経細胞がシナプスを形成しているかについての質問があったが、これについては今後検討すべき課題であると回答した。

次に主査の近藤亨教授は PL に含まれるどの因子が BMSC の培養に必須であるのか質問した。申請者は、必須因子の同定は行っていないが全ての因子が総合的に働いている可能性が高いと回答した。次に、脳梗塞モデルラットに BMSC の血管内投与が機能回復に有効であるかの質問について、申請者は検討していないものの、機能回復するとの報告があると回答した。G-CSF 投与による細胞増殖促進がテロメアの短縮を含む BMSC の分裂能早期消失を引き起こすのではないかの質問に対して、申請者は今後検討する必要があると回答した。G-CSF が BMSC にどのようなシグナル伝達を引き起こすのかの質問に対しては、今後の検討課題であると回答があった。

最後に副査の實金清博教授は直接の指導教官であることから佐々木教授、神谷教授、近藤教授からの質問に関して申請者の回答を補足した。また、PL の品質を一定とするために複数の PL を混ぜて使用することや現在まで PL に対してヒトでアレルギー反応が見られていない事など本研究に関する重要な知見も補足した。

本論文は移植用ヒト BMSC の確保・維持を可能にする重要な研究成果であり、今後の脳梗塞 BMSC 治療法の実現に貢献することが期待されることから、審査員一同は本研究成果を評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受ける資格を有すると判定した。