

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	甲	第	号
------	---	---	---	---

氏 名 ALKISTI MIKROGEORGIOU

論 文 題 目

Dedifferentiated fat cells, as a novel source for cell therapy to target neonatal hypoxic ischemic encephalopathy

(新規細胞源として脱分化脂肪細胞を用いた新生児低酸素性虚血性脳症
に対する幹細胞療法)

論文審査担当者

名古屋大学教授

主 査 委員

若林 俊 秀 


名古屋大学教授

委員

室原 豊 明 

名古屋大学教授

委員

木村 亮 

名古屋大学教授

指導教授

高橋 義 行 

論文審査の結果の要旨

今回、新生児低酸素性虚血性脳症（HIE）モデルラットに対する脱分化脂肪細胞（DFAT）を用いた幹細胞治療の効果を検討した。生後7日目の新生児仔ラットの左側頸動脈を結紮切離し、その後8%低酸素負荷を60分間行い、HIEモデルを作製した。低酸素性虚血性脳障害の24時間後に、DFAT治療群では、リンゲル液に懸濁したDFAT細胞 10^5 個/匹を静脈内に投与した。免疫組織学的検討では、同側の海馬および同側の大脳皮質において、アポトーシスマーカーのactive caspase-3陽性細胞数、活性化ミクログリアのマーカーのED-1陽性細胞数および酸化ストレスマーカーの4-HNEの陽性細胞数がDFAT治療群で有意に低下した。協調運動と前足の非対称性を測定する行動実験において、vehicle群とsham群間に有意差を認めしたが、DFAT治療群sham群間では差を認めなかったため、DFAT細胞は運動機能を改善する傾向があると解釈した。*in vitro*での検討として、初代培養皮質神経細胞の酸素糖欠乏（OGD）による細胞死に対するDFAT馴化培養液（DFAT-CM）の保護効果を調べた。OGDの48h、24h前、およびOGDの直後にDFAT-CMを2.5、5、7.5、10%の濃度で培養神経細胞に添加したところ、OGD前に添加されたDFAT-CMの2.5%~10%（48h前）、5%~10%（24h前）で神経保護作用を認めた。

本研究に対し、以下の点を議論した。

1. DFATは間葉系幹細胞の性質をもった細胞群である。脂肪組織由来幹細胞（ASC）のように組織採取量が微量で調整できる。また、採取の手法（脂肪吸引法）と細胞調製/増殖方法（天井培養）も簡単な手順であり、煩雑な選別操作なしで純度の高い細胞が得られる。さらに、表現型は継代を繰り返しても安定である。
2. 本研究では、単回の静脈内投与でのDFAT細胞の治療効果を調べた。行動実験では、DFAT治療群とvehicle群間の有意差は示されなかった。間葉系幹細胞（MSC）を使ったこれまでの他の研究と同様に、DFATの明らかな治療効果を示すためには複数回投与が必要かもしれない。また、本研究での検討は、HIE後43日間に限られている。評価期間を延長すれば明確な結果が出る可能性もある。DFAT馴化培養液の注射も肯定的な成果をもたらすかもしれない。
3. 本研究では、DFAT細胞の直接作用ではなく、分泌された因子が神経細胞を保護したことを示した。また、他の幹細胞での研究と同様に、静脈内投与後に脳実質で検出された細胞は少数であった。多くは肺、肝臓、脾臓に集積したと考えられる。ELISA法にて、DFAT-CMの各種栄養因子を調べたところ、IGF-1、NGF、NT3を確認した。さらにDFAT治療群（*in vivo*）の傷害側でIGF-1とNGFが上昇していることを示した。これらの結果より、DFATが脳へ生着、神経細胞へ分化するのではなく、分泌される因子により保護効果がもたらされたと考えた。
4. 新生仔ラットを用いたRice-Vannucciモデルは、新生児低酸素性虚血性脳症（HIE）のモデルでは最も使われている動物モデルであるが、その他のモデルとしては、ヒツジ胎仔、新生児仔豚および新生児うさぎを用いたモデルの報告がある。

以上の理由により、本研究は博士（医学）の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※甲第	号	氏名	ALKISTI MIKROGEORGIU
試験担当者	主査	若林俊彦	室原豊明	木村 元
	指導教授	高橋 義行		

(試験の結果の要旨)

主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。

1. 脱分化脂肪細胞の特長と培養の困難さについて
2. DFAT細胞を単回投与する代わりに、複数回投与、あるいはDFAT馴化培養液の注射を行った場合に見込まれる効果について
3. 静脈内投与後の細胞の動態について
4. ラット以外の他の動物モデルについて

以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、小児科学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。