

氏 名	竹村 宜記
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 甲第 680 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位授与年月日	平成 2 5 年 3 月 7 日
学位論文題目	Brain-Derived Neurotrophic Factor from Bone Marrow-Derived Cells Promotes Post-Injury Repair of Periphieral Nerve (骨髄細胞由来の脳由来神経栄養因子は外傷性末梢神経障害からの神経再生を促進する)
審査委員	主査 教授 竹内 義博 副査 教授 遠山 育夫 副査 教授 田中 俊宏

論文内容要旨

*整理番号	685	(ふりがな) 氏名	たけむら よしのり 竹村 宜記
学位論文題目	Brain-Derived Neurotrophic Factor from Bone Marrow-Derived Cells Promotes Post-Injury Repair of Peripheral Nerve (骨髄細胞由来の脳由来神経栄養因子は外傷性末梢神経障害からの神経再生を促進する)		
<p>『目的』</p> <p>临床上、外傷性末梢神経障害は後遺症を残し、完全な治癒を臨めないことが多い。神経再生のメカニズムや治療に関して様々な視点から報告がなされているが、依然、再生医療の観点から、決定的な論理や治療薬は解明されていない。特に、神経再生における数ある神経栄養因子の関与は以前より示唆されているが、未だ解明されていない領域がある。</p> <p>Neurotrophin Family の一つである脳由来神経栄養因子(以下、BDNF)は神経細胞やシュワン細胞より分泌され、神経再生に関与していることは以前より報告されている。しかし、近年、BDNF は、認知・行動・痛みなどへの関連や骨髄由来細胞との関連など、多領域にわたって新しい発見が続いている。そこで、本研究では、末梢神経再生において、骨髄由来細胞より合成される BDNF の動態や重要性を調べることを目的とした。</p> <p>『方法』</p> <p>使用したマウスは、C57BL/6 mouse、GFP transgenic mouse、BDNF heterozygote knockout mouse (Back ground は C57BL/6、以下 BDNF+/- mouse)、その Littermate (以下、BDNF+/+ mouse) である。外傷性末梢神経障害は、マウスの左坐骨神経を脳血管手術用のクリップで 60 秒間圧挫することで作成した。</p> <p>本研究では、まず、外傷性神経障害からの末梢神経再生において、骨髄由来細胞の関与およびその骨髄由来細胞と BDNF の関与の検討を行った。C57BL/6 mouse に 9Gy の放射線照射を行い、骨髄細胞を完全に死滅させたところで、GFP-Transgenic mouse より採取した骨髄細胞を経静脈的に骨髄移植した (以下、骨髄移植)。このマウスに外傷性末梢神経障害を加え、8 週目までの坐骨神経標本に関して免疫染色と PCR 法で評価を行った。</p> <p>次に、その結果をふまえ、末梢神経再生における、骨髄由来細胞より合成・分泌される BDNF の重要性を検討した。BDNF+/- mouse に C57BL/6 mouse より採取した骨髄細胞を骨髄移植して、骨髄細胞のみ正常に BDNF を発現するマウス (以下、BDNF+/- → +/- mouse) を作成した。そのマウスと BDNF+/- mouse、コントロールである BDNF+/+ mouse に外傷性末梢神経障害を加え、神経再生を評価した。評価は、下肢運動機能評価である Rotarod treadmill test と</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

Sciatic function Index(以下、SFI), Nerve Conduction Study(Motor Nerve Conduction Velocity/CMAP Amplitude/Distal Latency)、坐骨神経標本の単位面積あたりの再生有髄神経数と再生有髄神経径を用いて行った。坐骨神経損傷後、8週目まで1週間毎に評価した。

『結果』

圧挫された坐骨神経の再生段階において、再生部位に骨髄由来細胞の存在が確認された。それは、坐骨神経損傷後、1~2週間でピークを迎え、その後漸減していき、8週間後には殆ど確認されなくなった。また、免疫染色にて、骨髄由来細胞の多数がBDNFを発現していることも確認された。PCR法による検討では、損傷1週間の坐骨神経より、mRNA BDNF splice variant5のみが確認された。これは、骨髄細胞のSplice variantの発現と同様であった。また、その発現量は、坐骨神経損傷後1週間でピークを迎えてから漸減していき、8週間後には正常坐骨神経と同レベルとなった。

続いて行った検討の結果である。Rotarod treadmill testの評価では、BDNF+/- mouseは、坐骨神経圧挫3週以降は改善を認めなかった。また、最終評価の8週後も圧挫前と比較して有意に下肢運動機能が低下していた。しかし、BDNF+/+ mouseとBDNF+/+→+/- mouseは、坐骨神経圧挫3週以降も改善を認め、最終評価の8週後では、圧挫前と有意差なく下肢機能は改善した。SFIの評価であるが、BDNF+/- mouseはBDNF+/+ mouseおよびBDNF+/+→+/- mouseと比較して有意に改善が遅れた。しかし、坐骨神経圧挫後6週以降は3群間に有意差は認めなかった。8週目では、3群とも、圧挫前と同程度まで改善を認めた。NCSの評価では、MNCV/CMAP Amplitude/Distal Latency全ての項目において、BDNF+/- mouseはBDNF+/+およびBDNF+/+→+/- mouseとくらべて有意に改善が遅れた。しかし、BDNF+/+ mouseとBDNF+/+→+/- mouseには、観察期間中に有意な差は認めなかった。坐骨神経標本の組織学的評価では、最終評価である8週目で、BDNF+/- mouseの再生有髄神経径は他の2群と比較して、有意に小さかった。しかし、単位面積あたりの再生有髄神経数は、観察期間を通して3群間に有意差は無く、8週目で圧挫前の正常坐骨神経における単位面積あたりの有髄神経数と同等となった。

『考察』

BDNFは神経再生に関連し、その細胞起源は多数確認されてはいるが、そのメカニズムや重要性に関しては未だ解明されていない。本研究の最初の検討で、外傷性末梢神経障害よりの神経再生において、骨髄由来細胞が神経再生部位に集積しBDNFを合成および分泌していることを確認した。そして、そのBDNFが、末梢神経再生において重要であると証明するために、BDNF knockout mouseを使用して引き続き検討を行ったのである。BDNF+/- mouseは下肢機能の改善が障害され、また組織学的評価でもBDNF+/+→+/- mouseやBDNF+/+と比べて再生が遅れた。しかし、骨髄細胞のみBDNFの発現が正常であるBDNF+/+→BDNF+/- mouseとBDNF+/+ mouseは下肢運動機能の改善を認め、組織学的にも再生を認めた。また、この2群には各種検討項目で有意な差は認めなかった。この結果から、骨髄由来細胞よりのBDNFが外傷性神経障害よりの神経再生において重要な役割を担っていることが考えられた。

『結論』

外傷性末梢神経障害からの神経再生において、骨髄由来細胞が再生部位に集積してBDNFを合成し、またそれが重要な役割を果たしていることを明らかにした。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	685	氏名	竹村 宣記
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>脳由来神経栄養因子 (BDNF) は神経細胞やシュワン細胞から分泌され神経再生に関与していることが知られている。本研究では、骨髄由来細胞で合成される BDNF の末梢神経再生における役割を検討した。</p> <p>外傷性末梢神経障害はマウスの左坐骨神経を脳血管手術用のクリップで 60 秒間圧挫して作成した。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 外傷性神経障害は 6~8 週で改善を認めた。 2) 骨髄由来細胞が神経再生部位に集積し BDNF を合成および分泌しており、その発現は 1~4 週までピークを認め、6~8 週で消退した。 3) BDNF heterozygote knockout mouse (BDNF+/-mouse) では下肢機能の改善が障害され、組織学的にも、BDNF+/+ や BDNF+/-mouse に C57BL/6 mouse より採取した骨髄細胞を移植し骨髄細胞にのみ正常に BDNF を発現するマウス (BDNF+/+→+/- mouse) と比べて再生が遅れた。 4) 骨髄細胞の BDNF の発現が正常である BDNF+/+→BDNF+/-mouse と BDNF+/+mouse は下肢運動機能の改善と組織学的な再生が認められた。 <p>本論文は、外傷性神経障害の神経再生において骨髄由来細胞が産生する BDNF の役割について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 579 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 25 年 1 月 28 日)</p>			