

学位論文題名

In Vivo Fluorescence Tracking of Bone Marrow Stromal Cells Transplanted into a Pneumatic Injury Model of Rat Spinal Cord

(ラット空気圧脊髄損傷モデルに移植した骨髄間質細胞の蛍光観察による
in vivo における動態追跡評価)

学位論文内容の要旨

〔研究目的〕近年、脳・脊髄などの中枢神経系の移植・再生研究が盛んに行われ、脳梗塞・脊髄損傷などの動物モデルにES細胞、神経幹細胞、骨髄間質細胞などの再生能力を持つ細胞を移植し、障害された神経症状が改善したとの報告がある。また、組織学的にも、細胞を移植することにより損傷中枢神経内において神経細胞の増加を示す報告も多い。しかし、中枢神経再生の機序に関しては明らかになっておらず、この神経症状の改善と組織学的事実の間にはまだまだ解明すべき問題が多く残されている。これまでの研究は、ある一定の時期に研究動物を殺傷しその時点での組織学的評価によるものであり、再生の機序解明には経時的な移植細胞の動態を評価することが重要である。

本研究では、再現性のある安定した脊髄損傷を作製することができるニューマチックインパクトデバイスを用いたラット脊髄損傷モデルを用いて、GFPトランスジェニックマウスより採取した骨髄間質細胞(BMSC)を移植し、移植されたラットを生存させたまま経時的に移植細胞を観察して損傷脊髄内での動態を観察することを目的とした。GFPからの発光を利用して、個体を生存させたまま経時的に損傷脊髄内の移植BMSCを観察したのは本研究が初めてである。この生体内における移植細胞の動態の評価は、これまでの中枢神経再生研究の一元的な事実につながりを持たせうるもので、中枢神経再生の機序解明に大きな意義をもたらすものと考えられる。

〔実験方法〕

〔GFP-BMSCの抽出〕4-8週令のGFPトランスジェニックマウスの大腿骨両端を切って、ヘパリンを含めた培養液を21ゲージの注射器で注入し骨髄を取り出す。コラーゲンIでコーティングしたフラスコ内の培養液下で継代培養してBMSCを抽出した(GFP-BMSC)。培養液交換は一週3回行った。

〔脊髄損傷の作製〕Wistar系統ラット9匹(体重200-250g)に吸入麻酔をかけ、第10-11胸椎椎弓切除を行った。不完全脊髄損傷を作製するためニューマチックインパクトデバイスの設定を、インパクトの速度を2m/s、衝撃時のインパクトの硬膜からの深さを1mmに固定して脊髄損傷を作製した。

〔GFP-BMSCの移植〕脊髄損傷7日目に、第9胸椎の椎弓切除を追加し同レベルの脊髄内に、Hamiltonシリン

ジを設置した定位自動注入装置を用いて GFP-BMSC を移植した (n=3)。移植は脊髄表面から 2mm の深度に 7 μ l (1.0 \times 10⁴ cells/ μ l) の GFP-BMSC 含有溶液を注入した。コントロール群として正常脊髄に GFP-BMSC を移植した (n=6)。

〔移植細胞の生体内観察〕移植細胞の観察は、移植日、移植 2 週間目、移植 4 週間目に蛍光顕微鏡を用いて暗室にて行った。ラットを吸入麻酔下で椎弓切除した範囲で創を開き、硬膜を露出させて観察を行った。

〔病理組織学的検討〕BMSC 移植 28 日目、吸入麻酔下に開胸後、23 ゲージ針を左心室より上行大動脈に挿入し、ヘパリン入り生理食塩水を約 100ml 点滴した。次に右心房を切開して脱血した後、4% フォルマリンを約 150ml 点滴し灌流固定を行った。移植部、脊髄損傷部位を含めて上下に長く脊髄を採取した。採取した脊髄はパラフィン包埋して矢状面で 5 μ m の厚さで切片を作製した。GFP 抗体による蛍光免疫染色を行い、GFP 陽性の移植した BMSC の分布を評価した。また、GFP 抗体と、MAP2 抗体、NeuN 抗体、GFAP 抗体による蛍光二重免疫染色を行い、移植した BMSC の免疫組織学的評価も行った。

〔結果〕移植した GFP-BMSC からの GFP 発光は移植時には全例で観察できた。経時的には、正常脊髄に GFP-BMSC を移植したコントロール群では、移植 2 週後では 6 例中 1 例で、移植 4 週後では 6 例中 3 例で GFP の発光を観察できた。しかし、いずれも GFP の発光は移植部近傍にのみ観察するにとどまった。一方、脊髄損傷例に GFP-BMSC を移植した群では、移植 2 週後には 3 匹中 1 匹が、移植 4 週後では 3 匹中全例の 3 例において GFP の発光を観察することができた。さらには脊髄損傷群では GFP の発光は、移植部から損傷部に伸びていることが観察された。

組織学的評価では、コントロール群においては GFP 陽性細胞が移植部近傍の灰白質を中心に認められた。これらの GFP 陽性細胞の一部は MAP2 抗体、NeuN 抗体、GFAP 抗体にも陽性となる細胞も認められた。一方、脊髄損傷作成群では、GFP 陽性細胞が移植部のみならず、脊髄損傷の頭側にも多く認められ、これらは灰白質のみならず背側の白質にも多く存在した。また、脊髄損傷の尾側にも少数ではあるが GFP 陽性細胞が観察され、コントロール群に比べると明らかに広範囲で GFP 陽性細胞が観察された。

〔考察〕損傷中枢神経内において、移植した細胞がいかんして再生に関わるかを解明するために、BMSC を移植したラット脊髄損傷モデルを生存させたまま経時的にその移植細胞の動態を観察する研究を行った。生体内での移植細胞の動態を観察する研究はこれまでも多く、MRI や SPECT/PET、ルシフェラーゼを用いた Bio luminescence などの手法が行われている。しかし、それぞれに利点・欠点があり、例えば MRI であれば空間解像度に優れるものの時間解像度、感度にやや劣るなどがある。本研究は若干空間解像度に劣るものであるが、短時間で観察でき、本研究の組織学的結果からも感度は良好であるといえる。また、空間解像度に関しても GFP の発光強度を上げることにより改善できると考えられ、非常に有用な手法と考えられる。

本研究では、BMSC を移植したラットを生存させたまま移植時、移植 2 週間後、移植 4 週間後と、経時的に観察することができた。これは、臨床応用に際し、ヒトに細胞移植した時にもその移植細胞の生体内での観察を可能とするものである。また、正常脊髄に BMSC を移植した群と脊髄損傷に移植した群では生体内での BMSC の動態に差が認められた。すなわち、正常脊髄群では移植した BMSC が移植部にとどまり、なおかつ GFP の発光を観察できる動物が少なかったのに対して、脊髄損傷群では脊髄損傷部にひかれるように GFP の発光が観察でき、更には GFP の発光が多くの動物にて観察できた。このことは、正常脊髄に BMSC を移植した場合に比べ

て、損傷脊髄に移植した場合は BMSC がその生体内で増殖し、損傷部に向かって遊走していたことを示唆するものである。特に移植 2 週目より 4 週目において、多くの動物で GFP の発光を観察できたことは、移植後 2～4 週の間に移植した BMSC が増殖していることを示唆するものである。また、これらの損傷脊髄に移植した BMSC の増殖や遊走は病理学的にも実証され、更には組織学的評価により神経細胞やグリア細胞への分化も示唆された。従って、損傷を受けた脊髄内では、移植細胞の増殖や、損傷部に移植細胞を遊走させる因子などが放出されていると考えられる。これらの因子については今後の研究により解明していくべきだが、本研究が、細胞移植による障害された神経症状の改善と、組織学的に神経細胞が移植により増加するという二つの事実の間に存在する中枢神経の移植再生に関する機序解明のブレークスルーとなりうる意義あるものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐々木 秀 直
副 査 教 授 三 浪 明 男
副 査 教 授 岩 崎 喜 信

学 位 論 文 題 名

In Vivo Fluorescence Tracking of Bone Marrow Stromal Cells Transplanted into a Pneumatic Injury Model of Rat Spinal Cord

(ラット空気圧脊髄損傷モデルに移植した骨髄間質細胞の蛍光観察による
in vivo における動態追跡評価)

これまでの動物モデルを用いた中枢神経系の移植再生研究では、骨髄間質細胞 (BMSC) の移植による脱落神経症状改善の知見や、移植細胞の生体内での生着、増殖、遊走、分化という病理学的な知見がある。しかし、これらの知見の間には大きなギャップがあり、これを埋めるには神経回路網の再構築の機序解明が必要である。そのためには経時的な移植細胞の動態を評価することが重要で、その方法としてバイオイメーjing法が有用と考えられる。

本研究では、空気圧損傷装置によるラット脊髄損傷モデルに、GFP 標識した骨髄間質細胞 (BMSC-GFP) を移植し、GFP 蛍光を利用してラットを生存させたまま経時的に移植細胞を観察し、損傷脊髄内での細胞の挙動を解明することを目的とした。まず、安定したラット脊髄損傷モデルの作成のため、空気圧損傷装置によるモデルの確立を行った。モデルの確立後、バイオイメーjingを行った。方法として、ウイスターラットに吸入麻酔下で空気圧損傷装置を用いて Th10 レベルに脊髄損傷を作成した。脊髄損傷 7 日目に GFP トランスジェニックマウスの大腿骨より抽出した BMSC-GFP を定位自動注入装置を用いて損傷部頭側に移植した (n=3)。コントロール群として正常脊髄に BMSC-GFP を移植した (n=6)。移植細胞の観察は、移植日、移植 2 週間目、移植 4 週間目に蛍光実体顕微鏡を用いて暗室にて行った。4 週目の観察後、モデルを灌流固定し、7 μ m の脊髄矢状断切片を作成して、GFP 抗体、MAP2 抗体などによる蛍光免疫染色で移植細胞の分布や分化の様子を評価した。

バイオイメーjingの結果、コントロール群では、移植 2 週目で 1 例、移植 4 週目では 3 例で GFP 蛍光を観察できた。しかし、いずれも移植部近傍に観察するにとどまった。一方、脊髄損傷群では、移植 2 週目では 3 匹中 1 匹で、移植 4 週目では 3 匹全例で GFP 蛍光を観察

することができた。さらには脊髄損傷群では GFP 蛍光は、移植部から損傷部に伸びていることが観察された。

病理学的評価では、コントロール群では少数の GFP 陽性細胞が移植部近傍に認められた。一方、脊髄損傷群では、GFP 陽性細胞が移植部と損傷部の間に多く認められ、主に脊髄背側に存在した。また、脊髄損傷の尾側にも少数ではあるが GFP 陽性細胞が観察された。これらの GFP 陽性細胞の一部は MAP2 抗体、NeuN 抗体、GFAP 抗体にも陽性を示し、神経細胞やグリア細胞への分化も示唆された。

これらの結果は、正常脊髄群と比べ、損傷脊髄に BMSC を移植した場合は BMSC は生体内で増殖し、損傷部に向かって主に脊髄背側を遊走し、一部の細胞は損傷部を越えて損傷部尾側まで遊走していたことを示唆するものである。特に移植 2 週目より 4 週目において、多くの動物で GFP 蛍光を観察できたことから、この時期に BMSC が増殖、遊走したと考えられる。更には増殖、遊走しながら神経細胞やグリア細胞への分化も示唆された。従って、損傷を受けた脊髄内では、移植細胞の増殖や、損傷部に移植細胞を遊走させる因子などが放出されていると考えられる。

本研究では、ラットを生存させたまま経時的に移植した BMSC を観察する方法論を確立した。これにより、損傷中枢神経内における移植細胞の動態を適時観察でき、これまでの一元的な知見につながりを持たせうるもので、中枢神経再生の機序解明に大きな意義をもたらすものと考えられる。更に、移植再生治療が臨床応用された際にも、移植細胞のヒト生体内での観察を可能とするものであり、その安全性の評価や治療計画に役立つものと考えている。

口頭発表に当たり、副査の岩崎教授から、細胞移植による神経症状の経過、損傷 7 日目に細胞を移植した論拠についての質問があった。同じく副査の三浪教授から、細胞遊走を来たす因子の証拠、移植細胞の長期的な観察可能期間、移植細胞とホストの神経細胞との関わりなどについての質問があった。また主査の佐々木教授より、正常脊髄と損傷脊髄における分化の差異、神経細胞分化の展望、神経、グリア細胞以外の分化の有無などに関する質問があった。最後にフロアから、GFP 細胞の分裂による蛍光維持、観察可能な深達度についての質問があった。これらの質問に対して申請者はおおむね適切な回答を行った。

この論文は、モデルを生存させたまま移植細胞の動態を経時的に観察することを可能とした点で優れており、中枢神経再生の機序解明につながる大変意義のあるものと考えられた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。