

学位論文題名

Fibrin Matrix Provides a Suitable Scaffold for Bone Marrow Stromal Cells Transplanted into Injured Spinal Cord: A Novel Material for CNS Tissue Engineering

(フィブリンは脊髄損傷部位への骨髄間質細胞移植における適切な足場となる～中枢神経組織工学の新たな材料として～)

学位論文内容の要旨

[背景と目的]

脊髄損傷による障害には未だ確立された有効な治療法が無く、多くの患者及びその家族が後遺症、介護などに苦しんでいる。近年の基礎研究により細胞移植治療が脊髄損傷患者の機能回復に対し有効に働く事実が示唆されている。しかしながら、移植技術の安全性や有効性に関してはいまだに確立された方法がない。特に脊髄組織は脆弱かつ繊細な構造でありながら、非常に狭い環境にある為、いかに効率的に移植細胞を生着させ、しかも投与による侵襲を抑えるかという大きな問題がある。今回われわれは、いずれも自己骨髄及び自己血より採取可能な骨髄間質細胞 (Bone Marrow Stromal Cells: BMSC) とフィブリンに着目し、これらを用いてフィブリン基質が有効な scaffold (足場) となり得るかどうかにあつての研究を行った。

[材料と方法]

<移植細胞>

BMSC は green fluorescent protein (GFP) を発現させた生後 4-8 週 of トランスジェニックマウスより採取し、3 代継代培養したものを使用。

<フィブリンの作成>

市販されているボルヒール®を用い、移植に適したフィブリン作成のため A 液 (2.5、10mg/ml フィブリノーゲン) と B 液 (20U/ml のトロンビンと 2mM の CaCl₂ を同体積で混合) を用意した。重合に要する時間は濃度に依存する。

<フィブリン基質内での BMSC の培養>

A 液 (フィブリノーゲン 10mg/ml) 100 μ l と、B 液に BMSC (1×10^4) を含んだ混合 B 液 100 μ l を重合させフィブリンを形成し 2 週間培養。フィブリン基質の 3 次元構造を走査電子顕微鏡、BMSC の存在を蛍光顕微鏡で確認した。

<ラット脊髄 hemisection モデルの作成と移植>

成体 Sprague-Dawley ラット (200-250g) を用いて 1.5% イソフルレンと笑気 : 酸素 (70:30) の吸入麻酔を行なった。手術顕微鏡下で第 8 胸椎椎弓切除し 28G 針で硬膜切開後、右背側脊髄に小切開を加えエチレン・テトラフルオロエチレン共重合体 (ETFE) 製の留置針を使い 2.5mm の長さの右半切モデルを作成した (Fig. 1)。それらを以下の 3 群を分類。

A 群 (n=5) : リン酸緩衝食塩液 (PBS) を摘出腔へ注入 (対照群)。

B 群 (n=5) : BMSC (3×10^5) を含む 15 μ l の懸濁液を摘出腔へ注入。

C 群 (n=9) : 2.5mg/ml のフィブリノーゲンを含んだ 7.5 μ l の A 液と、BMSC (3×10^5) を含む B 液 7.5 μ l を混合し柔らかなゲル状となったフィブリン 15 μ l を摘出腔へ移植。

すべての群で移植後はサイクロスポリン A 10mg/Kg を連日皮下に投与。Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) スコアを用いて、移植後 1, 7, 14, 21, 28 日目に右下肢の運動機能を評価した。

<組織学的解析>

移植 4 週後にホルマリンで灌流固定し移植部を摘出し 4mm の連続軸状断切片を作成。GFP、GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)、MAP2 (Microtubule-Associated Protein 2) による免疫組織染色を行い移植細胞の生着、移動、分化の状態を評価した。

[結果]

<フィブリン基質内で培養された BMSC>

走査電子顕微鏡で見るとフィブリン基質は薄い繊維からなり、2~5 μ m の小孔を持つ均一な網目構造を形成する (Fig. 2)。培養を始めて 2 週間後に蛍光顕微鏡で観察した結果、多くの GFP 陽性細胞が観察された。これにより BMSC はフィブリン内で少なくとも 2 週間生存可能であると考えられた。

<フィブリンによる足場は BMSC 移植後の機能回復を改善させる>

Fig. 3 が示すように、2, 3 及び 4 週目の BBB 下肢運動機能評価 (21 点満点) において、C 群は A 群および B 群よりも有意な神経症状の改善が見られた ($P < 0.05$)。

<フィブリンによる足場は移植された BMSC の生着と組織内移動を強化する>

移植後 4 週目に A 群で H-E 染色を行い後索、側索そして背側灰白質が完全に破壊されていることが確かめられた。

B 群では少数の GFP 陽性細胞のみが障害部境界領域の灰白質に分布するに過ぎなかった。そして、その細胞の大多数が円形または楕円形であった (Fig. 4A, B)。蛍光二重免疫染色法により移植細胞の表現型を見ると、GFP 陽性細胞は astrocyte の特異的マーカーである GFAP 陰性であった (Fig. 4C-E)。しかし、灰白質に存在する GFP 陽性細胞のおよそ 30% が成熟した neuron の特異的マーカーである MAP2 を発現していた。

C 群では B 群に比べ、多数の GFP 陽性細胞が傷害された脊髄灰白質内に確認できた。それらは障害部境界領域から広く分布し、中心管周囲や反対側の灰白質まで及んでいた (Figs. 5&6)。それらの幾つかは形態的に neuron に類似していた (Fig. 5)。蛍光二重免疫染色法を行うと GFP 陽性細胞は GFAP で陰性を示し、約 30% が MAP2 で陽性となった (Fig. 6C-H)。

BMSC とフィブリンの複合体は損傷部の大きさを変えず、免疫染色の結果からも重大な反応性変化は生じていない。

[結論]

損傷した組織に移植細胞を投与する際、その足場となる材料に求められるものは、毒性が無く、不活性で、柔軟性に富みしかも吸収性であるなどである。足場により局所に集中的に投与された移植細胞は組織内に生着し遊走、増殖し、軸索の成長を助長し、さまざまな細胞外基質分子と神経組織栄養因子の放出を可能とする。その候補としてアルギニン、マトリゲル、コラーゲン、ポリグリコール酸(PGA)、ゼルフォーム、pHEMA ヒドロゲルなどがあり、諸家がその有効性について報告している。しかし、異種間の材料であるゼラチンやコラーゲンなどは炎症や免疫反応を惹起する可能性がある。一方、フィブリンは自家より採取されるフィブリノーゲンとトロンビンより作られ安全性が高い。またフィブリノーゲンの濃度を変え重合に要する時間をコントロールする事により、移植腔の体積や形態、性状に応じてより柔軟に対応することが可能となる。これらの理想的な特徴を利用して、すでに骨、軟骨、心臓、皮膚や腎臓などで、フィブリンは細胞移植の足場としての有用性が報告されている。

今回の研究では、*in vitro* で BMSC 細胞がフィブリン内で少なくとも 2 週間生存できることが確認された。またラットの脊髄 hemisection モデルにおいて、BMSC 移植の足場としてフィブリンを用いることにより BMSC 単独移植よりも有意に神経症状の回復が見られた。免疫組織学的にも多くの移植細胞の生着、移植周囲組織のみならず中心管や反対側の灰白質に及ぶ遊走、一部の細胞は neuron への分化を示唆する所見が得られた。

これらのことから、外科的に脊髄損傷の移植治療を行うにあたり、移植細胞をより効率的かつ安全に局所投与する足場としてフィブリンは有効と考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 浪 明 男
副 査 教 授 渡 辺 雅 彦
副 査 教 授 岩 崎 喜 信

学位論文題名

Fibrin Matrix Provides a Suitable Scaffold for Bone Marrow Stromal Cells Transplanted into Injured Spinal Cord: A Novel Material for CNS Tissue Engineering

(フィブリンは脊髄損傷部位への骨髄間質細胞移植における適切な足場となる～中枢神経組織工学の新たな材料として～)

近年の基礎研究により細胞移植治療が脊髄損傷の機能回復に対し有効に働く事実が示唆されている。しかし、移植技術の安全性や有効性に関してはいまだに確立された方法がない。特に脊髄組織は脆弱かつ繊細な構造でありながら、非常に狭い環境にある為、いかに効率的に移植細胞を生着させ、しかも投与による侵襲を抑えるかという大きな問題がある。本研究では、いずれも自己骨髄及び自己血より採取可能な骨髄間質細胞(Bone Marrow Stromal Cells: BMSC)とフィブリンに着目し、これらを用いてフィブリンが有効な scaffold(足場)となり得るかどうかにあつての検討を行った。

市販されているフィブリン製剤であるボルヒール[®]を用い、移植に適したフィブリン作成のため A 液(2.5、10mg/ml フィブリノーゲン)と B 液(20U/ml のトロンビンと 2mM の CaCl₂を同体積で混合)を用意した。先ず A 液(フィブリノーゲン 10mg/ml)100 μ l と、B 液に BMSC(1 \times 10⁴)を含んだ混合 B 液 100 μ l を重合させフィブリンを形成し 2 週間培養。フィブリン基質の 3 次元構造を走査電子顕微鏡、BMSC の存在を蛍光顕微鏡で確認した。次に成体 Sprague-Dawley ラットを用いて第 8 胸椎椎弓切除し 2.5mm の長さの右半切モデルを作成した。それらを以下の 3 群を分類した。A 群(n=5):リン酸緩衝食塩液(PBS)を摘出腔へ注入(対照群)。B 群(n=5):BMSC(3 \times 10⁵)を含む 15 μ l の懸濁液を摘出腔へ注入。C 群(n=9):2.5mg/ml のフィブリノーゲンを含んだ 7.5 μ l の A 液と、BMSC(3 \times 10⁵)を含む B 液 7.5 μ l を混合し柔らかなゲル状となったフィブリン 15 μ l を摘出腔へ移植。Basso-Beattie-Bresnahan(BBB)スコアを用いて、移植後 1, 7, 14, 21, 28 日目に右下肢の運動機能を評価した。移植 4 週後にホルマリンで灌流固定し移植部を摘出し 4mm の連続軸状断切片を作成。GFP、GFAP、MAP2 による免

疫組織染色を行い移植細胞の生着、移動、分化の状態を評価した。

BMSC とフィブリンを2週間培養した結果、走査電子顕微鏡で見るとフィブリン基質は薄い繊維からなり、2~5 μ m の小孔を持つ均一な網目構造を形成していた。蛍光顕微鏡で観察した結果、多くの GFP 陽性細胞が観察された。これにより BMSC はフィブリン内で少なくとも2週間生存可能であると考えられた。また BMSC をラットに移植したモデルでは、2、3及び4週目の BBB 下肢運動機能評価(21 点満点)において、C 群は A 群および B 群よりも有意な神経症状の改善が見られた($P < 0.05$)。B 群では少数の GFP 陽性細胞のみが障害部境界領域の灰白質に分布するに過ぎなかった。そして、その細胞の大多数が円形または楕円形であった。蛍光二重免疫染色法により移植細胞の表現型を見ると、GFP 陽性細胞は astrocyte の特異的マーカーである GFAP 陰性であった。しかし、灰白質に存在する GFP 陽性細胞のおよそ 30%が成熟した neuron の特異的マーカーである MAP2 を発現していた。C 群では B 群に比べ、多数の GFP 陽性細胞が傷害された脊髄灰白質内に確認できた。それらは障害部境界領域から広く分布し、中心管周囲や反対側の灰白質まで及んでいた。それらの幾つかは形態的に neuron に類似していた。蛍光二重免疫染色法を行うと GFP 陽性細胞は GFAP で陰性を示し、約 30%が MAP2 で陽性となった。

損傷した組織に移植細胞を投与する際、その足場となる材料に求められるものは、毒性が無く、不活性で、柔軟性に富みしかも吸収性であるなどである。足場により局所に集中的に投与された移植細胞は組織内に生着し遊走、増殖し、軸索の成長を助長し、さまざまな神経組織栄養因子などの放出を可能とすると考えられる。今回の研究では、*in vitro* で BMSC 細胞がフィブリン内で少なくとも2週間生存できることが確認された。またラットの脊髄 hemisection モデルにおいて、BMSC 移植の足場としてフィブリンを用いることにより BMSC 単独移植よりも有意に神経症状の回復が見られた。免疫組織学的にも多くの移植細胞の生着、移植周囲組織のみならず中心管や反対側の灰白質に及ぶ遊走、一部の細胞は neuron への分化を示唆する所見が得られた。これらのことから、外科的に脊髄損傷の移植治療を行うにあたり、移植細胞をより効果的かつ安全に局所投与する足場としてフィブリンは有効と考えられる。

公開発表において、主査の三浪教授から BMSC の neuron 分化への特異性、フィブリンの具体的な作用、臨床応用する場合の時間的な問題点の質問があった。続いて副査の渡辺教授から、フィブリンの品質的安定性、BMSC のフィブリン内での増殖能、iPS 細胞に対する意見の質問があった。最後に副査の岩崎教授から共著者としての意見、臨床応用する場合の問題点や改善点などが提示された。約30分にわたり非常に活発な質疑応答が行われ、何れの質問に対しても申請者は自らの研究に基づく経験や過去の論文の内容を引用し適切な回答をした。

この論文は脊髄損傷に対する骨髄間質細胞移植治療を有効に行う際の足場として、フィブリンの有効性と安全性を初めて証明した点で優れており、臨床応用の際に重要な実験的根拠となり得るもので、大変意義のある研究である。

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断した。