

学位論文題名

Transplanted Bone Marrow Stromal Cells Improves Cognitive Dysfunction due to Diffuse Axonal Injury in Rats.

(ラットびまん性軸索損傷後の高次脳機能障害に対する
骨髄間質細胞の移植効果判定に関する研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

びまん性軸索損傷(DAI)とは、交通事故などの頭部外傷に伴い、CTで明らかな占拠性病変を認めないものの、昏睡状態が遷延する病態として知られてきた。近年では、MRIなどの画像の進歩に伴い、このDAIの診断が容易になりつつある。DAIの症状は程度によりさまざまであるが、中でも代表的な症状として高次脳機能障害があげられる。高次脳機能障害では、記憶障害・注意障害・遂行性機能障害・社会的行動障害など様々な症状を呈するが、脳損傷患者では中でも記憶障害の発現頻度が高いことが報告されている。これら高次脳機能障害による症状は外見からはわかりにくく、周囲からも理解困難なため、復職・復学などが阻害されている状況にある。したがって本研究では、近年再生医療の分野で注目されている骨髄間質細胞(BMSC)の移植が、DAIに伴う高次脳機能障害を改善しうるかどうかに評価することを目的とした。

【方法】

DAIモデルは、pneumatic high-velocity impactor deviceを用いて作成することとした。SDラット(7-9w)を用い、麻酔下に頭皮を2cm程度正中でlinearに切開し、skullを露出させたのち、径1cm大のmetal discを歯科用セメントで固定し、損傷圧力80psi (pounds per square inch)、impactの深さを6mm、損傷時間を40msec.にそれぞれ設定し損傷を加えた。この設定で少なくとも2週間は高次脳機能障害が持続することを確認し、移植実験を開始した。

BMSCはGFP transgenic miceの大腿骨より採取し、P3までpassageを繰り返したものを使用した。移植に際しては、1個体当たり 4.0×10^5 cellsのBMSCを用意し、BMSCおよびvehicle移植は、損傷後10日の時点で、右線条体を目がけて定位的固定装置を利用して、10 μ l-Hamilton syringeを用いて行った。具体的にはbregmaの後方1mm、右外側1.5mmの点に小さな穿頭を行い、同部位より6mmの深さまでsyringeを挿入したのち、10分かけて移植し、移植後5分経過してからsyringeを抜去した。BMSC移植群(n=13)、vehicle群(n=6)およびsham control群(n=8)のそれぞれの高次脳機能障害は、Morris water mazeを用いて損傷1,2および4週間後に評価した。組織学的解析は、損傷2,8および20週後の時点で、HE染色やMAP2、GFAP、NeuN、nestinおよびTuj-1などの神経系マーカーを蛍光免疫組織化学的に評価した。

【結果】

高次脳機能障害は損傷後1,2,4週にそれぞれ連続3日間評価を行い、移植前の損傷1週間後にはBMSC移植群とvehicle群の間に有意差は認めていなかったものの、損傷2週後の時点ではBMSC移植群ではvehicle群と比較して高次脳機能障害の明らかな改善傾向が見られ、

損傷 15 日後では統計学的に有意差も認められた。またこの傾向は損傷 4 週後にも継続して見られ、3 日間の計測のいずれにおいても、有意差をもって BMSC 群の高次脳機能障害が改善していた。

組織学的には、損傷 2 週後(BMSC 移植 4 日後)に、GFP-positive な(donor) BMSC が広く脳内に分布しており、これらの一部は GFAP、NeuN、nestin、Tuj-1 などを発現していたが、MAP2 の発現は見られないことが二重免疫染色により確認された。しかし double positive を呈した BMSC も形態は host の細胞とは異なるものであった。損傷 8 週後では GFP-positive な細胞が脳内でさらに増加していた。またそれらの一部が同様に神経系マーカーを発現し、その形態も host の細胞に類似した構造に変化していた。しかしながら MAP2 では GFP double-positive を呈するものの、その形態は host と依然異なる形状を呈していた。さらに損傷 20 週後の時点では、MAP2 でも double positive な軸索が確認され、この所見より移植された BMSC は host である脳内で長期間生存することが確認され、また成熟した神経系への分化を長い時間かけて獲得したものと推察された。

【考察】

これまでも脳損傷モデルにおいて種々の細胞移植が試みられており、Sinson らは胎児ラットの皮質細胞を損傷部位に定位的に移植し、さらに NGF を持続的に投与することで、有意な高次脳機能障害の改善を認めたことを報告している。次いで、より安全なドナーとして、NT2N (human neuroteratocarcinoma-derived neuronal) cells が用いられた。この NT2N cells はよく生着・分化することが知られていたが、この細胞に NGF 遺伝子を組み込んで移植すると高次脳機能障害の改善が得られたと報告がなされた。さらに近年になり、自己複製能と多分化能を有する幹細胞を利用する試みが広く行われるようになった。代表的なものでは、neural stem / progenitor cells (C17.2 cells)、Rodent embryonic neural stem cells (ES cells)、Human neural stem cells、および本研究で用いた BMSC などの報告が散見される。しかし DAI という特殊な病態における、さらに高次脳機能障害に着目した検討はこれまでにない。

一方、今回注目した donor である BMSC の移植効果に関しては、数多くの分野で幅広く研究されている。なかでも頭部外傷モデルにおいては Chopp らのグループが数多く発表しており、脳損傷(主に脳挫傷など)モデルに BMSC を直接移植あるいは静脈内投与することで、BMSC が boundary zone へと遊走・生着し、運動機能を改善させることを報告している。これと同様に Lu らは、動脈内投与でも同様の治療効果が生じることを報告している。またさらに最近では Mahmood らが、BMSC の静脈内投与と statin 製剤である atorvastatin を合わせて投与することで外傷後の高次脳機能障害の改善を報告している。これとは別に、Lu らはバイオマテリアルとして collagen scaffolds と BMSC を病変の cavity に同時に移植することで、高次脳機能障害が改善することを報告している。しかし、これらの多くの報告例は、古くから脳挫傷モデル作成に汎用されてきた骨窓作成を必要とする fluid percussion model や cortical impact model によるものであり、臨床に即した厳密な意味での DAI とは異なる病態に対するものである。したがって本研究が、DAI の病態にきわめて類似した closed head injury model を用いたモデルでの、高次脳機能障害の改善に着目した最初の研究であると考えられる。

【結語】

本研究より、損傷後 10 日の時点での BMSC 移植が、DAI に伴う高次脳機能障害を有意に改善し、少なくとも 5 ヶ月後までは脳内に広く存在し続け、さらに徐々に神経系細胞の表現型を獲得していくことが示された。これにより、BMSC の脳内移植が交通外傷後の DAI に伴う高次脳機能障害に対する治療戦略として検討されていく可能性があるものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 生 駒 一 憲

副 査 教 授 佐々木 秀 直

副 査 教 授 岩 崎 喜 信

学 位 論 文 題 名

Transplanted Bone Marrow Stromal Cells Improves Cognitive Dysfunction due to Diffuse Axonal Injury in Rats.

(ラットびまん性軸索損傷後の高次脳機能障害に対する
骨髄間質細胞の移植効果判定に関する研究)

びまん性軸索損傷(DAI)とは、頭部外傷に伴い CT で明らかな占拠性病変を認めないものの、昏睡状態が遷延する病態として知られてきた。近年 MRI などの画像の進歩に伴い、この DAI の診断が容易になりつつある。DAI の症状はさまざまであるが、代表的な症状として高次脳機能障害があげられる。本研究では、骨髄間質細胞(BMSC)の移植が、DAI に伴う高次脳機能障害を改善しうるかどうかに評価することを目的とした。

DAI モデルは、pneumatic impactor device を用いて作成した。SD ラット(7-9w)を用い、頭皮を 2cm 程度正中切開し、skull を露出させ、metal disc を歯科用セメントで固定し、圧力 80psi で損傷を加えた。この設定で少なくとも 2 週間は高次脳機能障害が持続することを確認し、移植実験を開始した。

BMSC は GFP transgenic mice の大腿骨より採取し、P3 まで継代培養し使用した。1 個体当たり 4.0×10^5 cells の BMSC を用意し、移植は損傷後 10 日の時点で、右線条体を目標に行った。BMSC 移植群(n=13)、vehicle 群(n=6)および sham control 群(n=8)のそれぞれの高次脳機能障害は、Morris water maze を用いて損傷 1,2 および 4 週間後に評価した。組織学的解析は、損傷 2,8 および 20 週後の時点で、HE 染色や MAP2、GFAP などの神経系マーカーを免疫組織学的に評価した。

高次脳機能障害は損傷後 1,2,4 週にそれぞれ連続 3 日間評価を行い、移植前の損傷 1 週間後には BMSC 移植群と vehicle 群の間に有意差は認めていなかった。損傷 2 週後の時点では BMSC 移植群では vehicle 群と比較して高次脳機能障害の明らかな改善傾向が認められた。この傾向は損傷 4 週間後も継続して見られ、有意差をもって BMSC 群の高次脳機能障害が改善していた。組織学的には、BMSC 移植 4 日後に、BMSC が広く脳内に分布しており、これらの一部は GFAP、NeuN などを発現していたが、MAP2 の発現は見られないことが確認された。しかし double positive を呈した BMSC も形態は host の細胞とは異なるものであった。損傷 8 週間後では GFP-positive な細胞が脳内でさらに増加し、それらの一部が同様に神経系マーカーを発現し、その形態も host の細胞に類似した構造に変化していた。しかし MAP2 では GFP double-positive を呈するものの、その形態は host と依然異なる形状を呈していた。さらに損傷 20 週後の時点では、MAP2 でも double positive な軸索が確認され、移植された BMSC は host である脳内で長期間生存することが確認され、また成熟した神経系への分化を長い時間かけて獲得したものと推察された。

本研究より、損傷後 10 日の時点での BMSC 移植が、DAI に伴う高次脳機能障害を有意

に改善し、少なくとも5ヶ月後までは脳内に広く存在し続け、さらに徐々に神経系細胞の表現型を獲得していくことが示された。これにより、BMSCの脳内移植が交通外傷後のDAIに伴う高次脳機能障害に対する治療戦略として検討されていく可能性があるものと考えられた。

公开发表において、副査の佐々木教授から、移植後急性期に高次脳機能障害が改善するメカニズムに関して、神経保護効果や神経液性因子の関与以外に寄与するであろう因子に関するコメントを求める質問があった。およびこれ以外にも、移植後の皮質におけるニューロン変性に関する質問があった。ついで主査の生駒教授から、本実験でのラットDAIモデルと臨床現場でのhuman DAIの発生機序に関する相関性に関して、および今回の移植部位を線条体にした根拠やMorris Water Maze testでの高次脳機能障害の治療効果判定に関する質問があった。さらに副査の岩崎教授から、donor BMSCの広範なmigrationについて、およびこれに関連して、BMSCが対側へ移動する経路と考えられる脳梁の損傷に関して質問があった。

いず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、現時点で治療法が存在しないびまん性軸索損傷にfocusを当て、さらに周囲からは理解されにくい症状の一つである高次脳機能障害に着眼点をおいたということがきわめて評価されるポイントであると考えられる。また倫理的に容認しやすいBMSCを用い、その治療効果の改善を初めて獲得しえたことは、今後の臨床応用の際に重要な実験的根拠となりえるもので、大変意義のある研究内容である。

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。