

学 位 論 文 題 名

Non-invasive transplantation of bone marrow stromal cells for ischemic stroke: Preliminary study using a thermoreversible gelation polymer (TGP) hydrogel

(骨髄間葉系細胞の虚血性脳卒中に対する非侵襲的移植法：
温度感受性ゼラチンポリマーを用いた予備的研究)

学位論文内容の要旨

目的

近年、虚血性脳梗塞の動物モデルに対して骨髄間葉系細胞 (bone marrow stromal cell; BMSC) を移植することにより、神経機能の改善が見られたという研究が散見されている。その移植方法は様々なものが試みられている。移植方法の代表的なものとして直接移植法、経静脈的移植法、経動脈的移植法、髄腔内移植法などがこれまでの研究で報告されている。直接移植は多くの研究でその効果が確認されているものの、脳組織へ直接細胞を移植することは侵襲的であり、脳への新たな損傷をきたす危険性は否定できない。経静脈的移植や髄腔内移植は理論上脳への侵襲は皆無であるものの、病変部周辺への細胞の集積が少なく、直接移植に比べて、効率が悪いことが予想される。経動脈的移植は冠動脈を介しての心筋への移植が多く報告されているものの、中枢神経系での報告は極めて少なく、その効果については不確定な部分が多いため、今後の研究が待たれるところである。どの移植方法が最も安全かつより効率的であるかについては、いまだに明確な解答が得られていない。一方、近年細胞とバイオマテリアルを細胞の足場として損傷された組織の修復を図るという組織工学の分野が盛んに研究されており、少ないながら中枢神経系でも同様の試みがなされてきている。そこで、本研究ではこれまでの移植方法に変わる新たな試みとして、脳虚血モデルに対して、細胞の足場として温度反応性ゼラチンポリマー (thermoreversible gelation polymer ;TGP) を用いた BMSC 移植方法を確立させ、その効果について検討することを目的とした。

方法

市販の TGP (商品名 Mebiol gel; 池田理科) に 10% 牛血清(FBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) およびペニシリン G 100 U/ml を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Nissu) を 10ml 加えて 4℃ の環境で一晩置くことによりゾル状とする。

ゾル状となった TGP 1ml に 6 週齢 GFP トランジェニックマウスの大腿骨から採取し、継代培養を 3 回行った BMSC 4×10^6 cells を混入した。室温でゲル状となったのち上記培養液を培養皿に満たし 37℃, CO₂ 5% の条件で培養を行った。培養液は 2 日ごとに交換し 2 週間後に蛍光顕微鏡で観察した。

動物実験は Balb/c マウスの中大脳動脈永久閉塞モデルを用いて行った。BMSC は Balb/c マウスの大腿骨から採取し、継代培養を 3 回行ったものを使用。移植の際に標識として PKH-26 にて染色を行った。中大脳動脈閉塞後 7 日後に梗塞巣と同側の頭頂部に開頭を加え (3mm × 5mm)、健常な大脳皮質を露出した。A 群を PBS 50μl を脳表に滴下した群 (N=6)、B 群を BMSC と PBS の懸濁液 50μl (5×10^5 cells) を脳表に滴下した群 (n=6)、C 群を 4℃

でゾル状にした TGP に BMSC 4×10^6 cells を混入したものを、細胞培養用の flexiPERM Disc (growth area, 1.8 cm²; Greiner Bio-One, San Francisco, CA, USA)を用いて 0.5 ml の均一な板状とし、1/4 にカットしたもの (5×10^5 cells) を脳表に留置した群 (N=6) とした。以上の 3 群を rotarod test を用いて神経学的に評価を行った。また、移植 8 週後に塔殺し、病理組織学的評価を行った。TGP-BMSC を留置した脳表の炎症反応を調べるために H-E 染色、GFAP 免疫蛍光染色を行った。TGP-BMSC 群と BMSC 単独群で脳内への PKH-26 陽性細胞の細胞数を比較した。また、神経系マーカーである NeuN, MAP-2 による蛍光免疫二重染色を行い、移植細胞の Phenotype を評価した。統計学的手法は 2 群間の比較では対応の無い t 検定を用いた。3 群間の比較では ANOVA を用いて、それぞれ $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。

結果

BMSC は TGP 内で 2 週間の間、その形態学的な特徴を保持しながら生存し、増殖することが確認された。

TGP-BMSC 群では TGP は完全に消失しており、留置した周辺の大脳皮質に炎症反応は見られなかった。BMSC は同側の大脳皮質内に数多く認められたが、梗塞巣と反対側にも遊走していた。BMSC 単独群でも同様に同側および反対側に BMSC を認めることができたが、TGP-BMSC 群と比べると有意に BMSC の数が少なかった。

BMSC の大部分は NeuN および MAP2 を発現しており、形態学的には神経細胞に類似していた。本実験では 3 群で運動機能において有意差は認められなかった。

考察

細胞移植治療の際に様々な素材を細胞の足場として利用する試みは近年多く報告されている。数は少ないものの、中枢神経系に対する細胞移植でもこのような組織工学的な手法を用いた研究が報告されてきている。

今回 BMSC 移植の際の足場として TGP を使用したが、BMSC は TGP 内で培養することが可能であり、TGP 内から脳内への遊走が確認されたことから TGP が BMSC を損傷された脳への移植際に有用な足場となることが示唆された。TGP ハイドロゲルは低温でゾル、高温でゲルとなる特異的な性質を持ち、これまで様々な細胞の 3 次元培養として用いられている素材である。

本実験のもう一つの新たな発見として、BMSC を健常な脳表に留置することにより、BMSC が損傷部へ遊走し、損傷部周辺で生着を示すことができた。

また、留置した TGP は 8 週後には完全に消失しており、組織学的に脳表の炎症反応を示す所見も見られず、TGP による組織毒性はないものと考えられた。

以上より中枢神経系へ細胞を直接移植する方法に比べて、新たに脳への損傷を加えることなく移植できる本研究の方法はより低侵襲といえる。

結論

脳梗塞周辺の健常な大脳皮質上に組織工学的手法を用いて外科的に移植することによって、移植細胞単独群に比べて移植細胞の脳内への生着が増強された。本実験では神経学的な改善が得られなかったものの、低侵襲な移植方法として、今後大きな期待が持てる移植方法であると考えられた。

本実験で用いた TGP は安全性が高く、また取り扱いが比較的に有用であることから、細胞の足場として有用である可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐々木 秀 直

副 査 教 授 田 中 伸 哉

副 査 准教授 飛 驒 一 利

学 位 論 文 題 名

Non-invasive transplantation of bone marrow stromal cells for ischemic stroke: Preliminary study using a thermoreversible gelation polymer (TGP) hydrogel

(骨髄間葉系細胞の虚血性脳卒中に対する非侵襲的移植法：

温度感受性ゼラチンポリマーを用いた予備的研究)

近年、虚血性脳梗塞の動物モデルに対して骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cell; BMSC) を移植することにより、神経機能の改善が見られたという研究が散見されている。その移植方法は様々なものが試みられているがどの移植方法が最も安全かつ効果的であるかについては、いまだに明確な解答が得られていない。一方、近年細胞とバイオマテリアルを細胞の足場として損傷された組織の修復を図るという組織工学の分野が盛んに研究されており、少ないながらも中枢神経系でも同様の試みがなされてきている。そこで、本研究ではこれまでの移植方法に変わる新たな試みとして、脳虚血モデルに対して、細胞の足場として温度反応性ゼラチンポリマー (thermoreversible gelation polymer; TGP) を用いた BMSC 移植方法を確立させ、その効果について検討することとした。方法は市販の TGP (商品名 Mebiol Gel[®]; 池田理科) に 10% 牛血清 (FBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) およびペニシリン G 100 U/ml を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Nissu) を 10ml 加えて 4°C の環境で一晩置くことによりゾル状とする。ゾル状となった TGP 1ml に 6 週齢 GFP トランジェニックマウス由来の BMSC 4×10^6 cells を混入した。37°C、CO₂ 5% の条件で培養を行った。2 週間後に蛍光顕微鏡で観察した。動物実験は Balb/c マウスの中大脳動脈永久閉塞モデルを用いて行った。Balb/c マウス由来の BMSC を PKH-26 にて標識し移植することとした。中大脳動脈閉塞後 7 日後に梗塞巣と同側の頭頂部に開頭を加え (3mm × 5mm)、健常な大脳皮質を露出した。A 群を PBS 50μl を脳表に滴下した群 (N=6)、B 群を BMS の懸濁液 50μl (5×10^5 cells) を脳表に滴下した群 (n=6)、C 群を TGP-BMSC (5×10^5 cells) を脳表に留置した群 (N=6) とした。以上の 3 群を rotarod test を用いて 1 週間毎に評価を行った。また、移植 8 週後に屠殺し、病理組織学的評価を行った。H-E 染色、GFAP 免疫蛍光染色、TGP-BMSC 群と BMSC 単独群で脳内への PKH-26 陽性細胞の細胞数を比較、神経系マーカーである NeuN, MAP-2 による蛍光免疫二重染色を行った。統計学的手法は 2 群間の比較では対応の無い t 検定を用いた。3 群間の比較では ANOVA を用いて、それぞれ $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。結果は BMSC が TGP 内で 2 週間の間、その形態学的な特徴を保持

しながら生存し、増殖をすることが確認された。TGP-BMSC 群では TGP は完全に消失しており、留置した周辺の大脳皮質に炎症反応は見られなかった。TGP-BMSC 群で有意に多くの BMSC が病変周囲に集積していた。BMSC の大部分は NeuN および MAP2 を発現しており、形態学的には神経細胞に類似していた。本実験では 3 群で運動機能において有意差は認められなかった。本実験で用いた TGP は安全性が高く、また取り扱いが比較的有用であることから、細胞の足場として有用である可能性が示唆された。

公開発表において、副査の田中教授から、コントロールとして懸濁液を用いているが、フィブリンやマトリゲルなどをコントロールとして使ったほうがよかったのではないかという指摘と今回の神経学的評価の時期についての質問があった。次に、副査の飛驒准教授から、TGP が体内で消失する時期、TGP を用いることにより BMSC の数が増加した機序についての質問があった。さらに神経学的有意差が出なかったことについての考察を求められた。最後に主査の佐々木教授から、BMSC の移植方法、移植部位の環境により分化の形は変わるのかという質問があった。約 30 分にわたり活発な質疑応答が行なわれ、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 BMSC 移植方法の新たな手法としての可能性を示し、TGP というこれまで中枢神経系で用いられたことのない素材を使用しているところが優れており、再生医療の実用化に向けて基盤となりうる有意義な研究である。

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定した。