

学位論文題名

Transplanted bone marrow stromal cells promote axonal regeneration and improve motor function in a rat spinal cord injury model

(骨髄間質細胞の移植は損傷脊髄における皮質脊髄路の再生を促進する)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 脊髄損傷は局所神経組織の崩壊にとどまらず、上行性・下行性神経線維の損傷をきたし、重篤な神経症状を後遺させる。これまでは、いったん脊髄損傷が生じた場合にはその再生は困難であるという考え方が支配的であった。しかしながら、近年、ヒト胚性幹細胞 (embryonic stem cell : ES cell) や神経幹細胞 (neural stem cell) などを用いた幹細胞移植により、損傷した神経組織を修復し、機能を改善させるという報告が多くみられるようになった。また、間葉系細胞のひとつである骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cell : BMSC) が多分化能を有していることが明らかとなり、さらに肝細胞や神経細胞など胚葉を超えて分化することが示された。また、BMSC は容易に採取・培養が可能である、自家移植が可能である、といった利点を有しており、さまざまな臓器への移植を目的としたドナー細胞として注目を集めている。脊髄損傷を作成した動物モデルに移植された BMSC は病巣近くまで遊走し、そこに生着し、さらに神経系の表現型を発現して機能を回復させるといった報告が多くみられる。しかしながら、移植された BMSC がどのような動態を示し、機能改善に働いているのかということは、未だにはっきり証明されていないのが現状である。本研究では損傷脊髄に移植された BMSC により修復された、“下行性繊維の連続性” に注目し、その定量的評価を行なうことで、下行性線維の再生と運動機能の回復から BMSC 移植がもたらせた効果について検証した。

【材料と方法】 GFP (green fluorescent protein) 標識した transgenic mice (4-8 週齢) の大腿骨から BMSC を採取し、3 世代まで継代培養させた。吸入麻酔下において成人メスの Sprague-Dawley rat (体重 200-250g) の背部を正中切開し、胸椎第 10-11 椎体レベルの椎弓を切除し、硬膜を露出させた。Pneumatic impact device を用いて胸椎第 10 椎体レベルにラット不完全脊髄損傷モデルを作成した。脊髄損傷 7 日後に、培養していた GFP 標識された BMSC (7×10^4 cells) あるいは vehicle を損傷部から頭側 5mm の部位 (胸椎第 9 椎体レベル) に定量的に移植した (各群 n=7)。Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) Locomotor Rating Scale (0-21 点で点数化され、正常が 21 点) を用いて、経時的に後肢運動機能を評価した。移植 8 週後に損傷から頭側 10mm (胸椎第 7 椎体レベル) の皮質脊髄路に Fluoro-ruby (FR) を微量注入し、その 5 日後に灌流固定ののち脊髄を摘出して組織学的評価を行なった。また、損傷部より尾側 10mm の部位 (胸椎第 12-13 椎体レベル) で脊髄を採取し、その後索の腹側 1/3 の範囲に存在した FR 標識された軸索数をカウントした。

【結果】 観察期間中のほぼ全ての観察において、後肢運動機能の改善は BMSC 移植群で有意に良好であった (day63 における BBB スコアの平均点数が BMSC 移植群 10.6 ± 1.0 点 ($p < 0.01$)、vehicle 移植群 6.1 ± 2.4 点)。移植 8 週間後の時点で、損傷部より尾側 10mm の後索に認められた FR 陽性の軸索は、vehicle 移植群 (16.6 ± 9.1 個) に比べて BMSC 移植群 (36.4 ± 11.3 個) で有意に多かった ($p < 0.01$ 、ちなみに sham-operated & uninjured グループは 69.0

±8.1 個)。蛍光免疫染色上、損傷部周囲に遊走した GFP 陽性 BMSC の一部は、灰白質では NeuN、MAP2、FR が陽性であった。また、白質では GFAP 陽性/FR 陰性となり、FR 陽性軸索周囲に集簇していた。

【考察】 ラットの下肢運動機能に関わる主な下行性繊維（皮質脊髄路(corticospinal tract : CST)）は脊髄後索の腹側 1/3 を走行していることが確認されている。また、FR は tetramethylrhodamine で標識された dextran（分子量 10000MW）で、axonal tracer として広く知られている。一度神経軸索に取り込まれた FR は漏出しにくく、さらにシナプス間隙を介して順・逆行性に軸索を染色していくといった特徴を有している。今回、胸髄レベルで脊髄不全損傷モデルを作成し、病巣より頭側で FR を注入した。BMSC 移植により、損傷された CST の連続性が病巣を超えてどの程度回復しているかを比較・検証した。

BMSC は移植 1 週間後から運動機能の改善を促進しており、観察された移植後早期の機能回復は、BMSC が産生する BDNF や NGF などの神経栄養因子による損傷脊髄の保護や 2 次的損傷の抑制によるものと考えられた。BMSC は移植 8 週間後の時点で、損傷部を越えて尾側で観察される FR 陽性の軸索数を有意に増加させた。また、移植された BMSC は損傷部周囲へ遊走し、そこに密に生着していた。灰白質に生着した BMSC の多くは円形の形態を呈し、NeuN、MAP2、FR 陽性であった。これらの細胞は神経細胞の表現型を獲得し、宿主下行性線維の連絡形成に寄与していると考えられた。白質やグリア瘢痕に生着した BMSC の多くは、astrocyte 様の形態を呈し、GFAP 陽性であった。これらは FR 陽性の軸索を取り囲むように存在しており、軸索保護や再生に加担しているものと思われた。

損傷脊髄に移植された BMSC は移植直後からいくつかの神経栄養因子などを分泌することで損傷脊髄の保護や神経組織の再生に加担し、また、損傷部周囲に遊走・生着して神経系の表現型を獲得し、CST を含めた宿主神経回路の再構築に寄与することで運動機能の改善を促進していると考えられた。本研究は、BMSC 移植による脊髄損傷後の機能改善のメカニズムを知る礎になるものと思われ、今後、脊髄損傷の患者に対し幹細胞移植治療を考えていく上で科学的な立証を促進するものと思われる。

【結語】 損傷脊髄に移植された BMSC の一部は、神経細胞に分化して軸索の投射を受けたり、下行性神経線維の再生を促進することで運動機能の改善に寄与していると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐々木 秀 直
副 査 教 授 田 中 伸 哉
副 査 准教授 飛 驒 一 利

学位論文題名

Transplanted bone marrow stromal cells promote axonal regeneration and improve motor function in a rat spinal cord injury model

(骨髄間質細胞の移植は損傷脊髄における皮質脊髄路の再生を促進する)

これまで“いったん損傷を生じた中枢神経の再生は困難”という考え方が支配的であった。しかしながら、近年、中枢神経には潜在的な再生能力があると考えられ、現在では「神経は再生する」という考え方が主流となった。中枢神経障害、その中でも脊髄損傷もまた、不可逆的な神経症状を後遺させる。近年、中枢神経障害に対し胚性幹細胞や神経幹細胞、骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cell : BMSC) などの細胞移植により、機能改善が得られるという報告が多くみられる。我々は間葉系幹細胞の一つである BMSC に注目し、これまで研究を行ってきた。

最近では BMSC は神経系細胞にも分化することが確認されており、また、損傷脊髄に移植された場合、神経症状回復を促進することが明らかとなった。しかしながら、BMSC がどのような挙動を示し、機能改善をもたらす機序については明らかにされていない。そこで、本研究では損傷脊髄に移植した BMSC が修復した“下行性線維の連続性”に注目し、その定量的評価を行い、下行性線維の再生と運動機能の回復をもたらした機序について検証した。

Pneumatic impact device を用いて rat の T10 レベルに不完全脊髄損傷を作成し、Basso-Beattie-Bresnahan Locomotor Rating Scale (BBB スコア) による運動機能評価を行なった。BMSC は 6 週齢の transgenic mouse の大腿骨から GFP 標識したものを採取した。脊損 7BMSC7 万個を損傷部頭側の T9 レベルに移植した。BMSC 群 (n=7) と vehicle 群 (n=7) の 2 群のグループを作成した。軸索の評価として、軸索トレーサーである fluoro-ruby (FR) を用いた。脊損 63 日後に T7 レベルの後索に FR を注入し、注入 5 日後に灌流固定を行ない、脊髄を採取した。

FR がした下行性線維に着目した。その評価としては、損傷部尾側の T12 レベルで行い、後索腹側 1/3 を走行する d CST 内の FR 陽性の軸索をカウントした。蛍光免疫組織学的には、BMSC を標識した GFP と neuronal marker の 2 重染色を行ない、更に軸索を標識した FR も加え、検討した。

結果として、BMSC は移植 1 週間後から運動機能の改善を促進した。また、移植 8

週間後には、損傷部を越えて、尾側で観察される FR 陽性の軸索数を有意に増加させた。灰白質に生着した BMSC の多くは、NeuN と FR 陽性で、神経細胞の表現型を獲得し、下行性線維との連絡形成を構築したと考えられた。白質やグリア瘢痕に生着した BMSC の多くは、アトカロサイト様の形態を呈し、GFAP 陽性、FR 陰性であり、FR 陽性軸索を取り囲むように存在していた。これらより移植した BMSC が遊走した部位によって表現型や機能を変化させていると考えられた。これまでに当研究室でも、損傷された中枢神経環境において、移植された BMSC はそれ自体が神経系細胞に分化したり、神経栄養因子の産出を促進し、神経保護やホスト中枢神経系に内在する再生能力の活性を促す働きをもつと報告している。これらと本研究の結果から、損傷脊髄に移植された BMSC は移植直後からいくつかの神経栄養因子などを分泌することで損傷脊髄の保護や神経組織の再生に加担し、また、損傷部周囲に遊走・生着して神経系の表現型を獲得し、CST を含めたホスト神経回路の再構築に寄与することで運動機能の改善を促進していると考えられた。

公开发表において、副査の田中教授から①アストロサイトや神経細胞の単独移植においてはどちらが効果的なのか評価の有無、②神経系細胞の表現型を獲得した移植 BMSC の病巣周囲での個数・局在、③BBB スコア、についての質問があった。次いで副査の飛驒准教授から①BMSC 移植後 2 ヶ月以上の長期に亘り運動機能回復は期待できるか、②NeuN と GFAP の発現した細胞の割合、③FR 以外の軸索評価方法、④グリオーシスの相違の有無についての質問があった。最後に主査の佐々木教授から、移植 BMSC が神経症状改善をもたらした作用機転に関する質問があった。約 10 分にわたる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に報告されている論文内容を引用し適切に回答した。

この論文は、脊髄損傷後の BMSC 移植が脊髄機能を改善する機序を解明する上で基礎となるものであり、また脊髄損傷に幹細胞移植治療を実用化する上で必要になる科学的検証に有力なモデルとなるものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の単位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。