

Validity of Bone Marrow Stromal Cell Expansion by Animal Serum-Free Medium for Cell Transplantation Therapy of Cerebral Infarct in Rats - A Serial MRI Study

(無血清培養したヒト骨髄間質細胞のラット脳梗塞モデルに対する移植効果
- MRI細胞追跡による検討 -)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】近年、脳梗塞や脊髄損傷などの不可逆的中枢神経損傷に対して、多分化能を有する骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cell ; BMSC) を移植することで失われた神経機能を回復させようという試みが数多くの研究者により報告されている。この治療を脳梗塞の治療に応用するためには、BMSC の特性を失うことなく安全で効率的にヒト BMSC を培養する必要がある。血小板由来の成長因子は元来、組織修復を促進する効果が高いことが知られており、最近これらの成長因子を豊富に含むヒト血小板溶解物 (platelet lysate ; PL) が、ドナー細胞の培養に必要なウシ胎仔血清 (Fetal calf serum ; FCS) にかわる安全な代替物として注目を集めている。現時点では血液疾患や骨軟骨疾患に対する BMSC 移植研究の領域で PL を用いた培養法が盛んに研究されているが、中枢神経領域での研究報告はいまだ見当たらない。そこで本研究では、FCS の代わりに PL を用いて培養したヒト BMSC が脳梗塞病変への遊走・生着能や神経系への分化能を維持しているかどうか、MRI 細胞追跡により検証することを目的とした。

【材料と方法】4名の成人ボランティアから informed consent を得た上で骨髄液の提供を受けた。提供された骨髄液からヒト BMSC を分離培養して、FCS または PL を含有した培地で P1 から P3 まで培養して (hBMSC-FCS または hBMSC-PL)、細胞増殖能と細胞形態を比較検討した。hBMSC-FCS と hBMSC-PL を酸化鉄ナノ粒子 (superparamagnetic iron oxide ; SPIO) で磁気標識して、ラット中大脳動脈永久閉塞モデルの作成後 7 日目に同側線条体に定位的に移植した。コントロールとして中大脳動脈閉塞を行わずに hBMSC-FCS を移植したラットも用意した。移植後 8 週間 1 週間おきに MRI を撮影して移植した細胞の挙動を追跡した。移植後 8 週間は 1 週間おきに Bederson score による神経機能の評価を行った。移植 8 週後の MRI を撮影した後に、大脳を摘出して組織学的検討を行い 2 群で比較した。数値データは平均±標準偏差で表し、2 群の差の検定には t 検定を行い、 $p < 0.05$ の場合に統計学的に有意と判定した。

【結果】2種類の培養液を比較した結果、hBMSC-FCS と hBMSC-PL の間で細胞増殖能に有意な差はなく、紡錘状の細胞形態やプラスチック接着性など基本的な BMSC としての特性にも差を認めなかった。T2 および T2*強調画像で移植後の細胞を追跡した結果、コントロールラットに

移植した hBMSC-FCS は移植部位にとどまり 8 週間移動しなかったのに対し、脳梗塞作成後 7 日目に同側線条体に移植した hBMSC-FCS は移植後 2 週間目までに脳梗塞辺縁部に向かって遊走し始め、8 週間目までに脳梗塞辺縁部に広く分布する様子を追跡可能であった。hBMSC-PL を脳梗塞に移植した後の移植細胞の挙動は hBMSC-FCS と同等であり、移植後 2 週間目までに脳梗塞辺縁部に向かって遊走し始め、8 週間目までに脳梗塞辺縁部に広く分布していた。移植後の神経機能に両群で差がなかった。移植後 8 週目に大脳を摘出して HE 染色で半球に占める脳梗塞の割合を検討した結果、hBMSC-FCS 群と PL 群で有意な差がなかった(それぞれ $23 \pm 2.2\%$ and $18 \pm 4.8\%$, $p=0.15$)。ターンブル青染色により SPIO 陽性細胞の分布を組織学的に検討した結果、MRI での移植細胞の分布と一致していた。ヒト細胞核特異的モノクローナル抗体(MAB1281)と神経系細胞マーカー (NeuN または GFAP) との蛍光二重免疫組織染色により、hBMSC-FCS 群と PL 群で脳梗塞辺縁部に遊走して生着した MAB1281 陽性細胞数に有意な差は見られなかった(それぞれ $2.7 \pm 0.53 \times 10^2 / \text{mm}^2$ and $2.9 \pm 0.84 \times 10^2 / \text{mm}^2$, $p=0.71$)。さらに脳梗塞辺縁部に生着した MAB1281 陽性細胞の NeuN 陽性率も 2 群で統計学的に差を認めなかった(それぞれ $47.3 \pm 25.4\%$ and $43.8 \pm 20.7\%$, $p=0.77$)。MAB1281 と GFAP 二重陽性率についても 2 群で有意な差を認めなかった(それぞれ $28.4 \pm 4.0\%$ and $32.9 \pm 12.9\%$, $p=0.52$)。

【考察】FCS を用いずに PL を用いて hBMSC を、細胞増殖効率を落とすことなく培養可能であり、ラット脳梗塞モデルに移植した際の脳梗塞病変部への遊走および生着能や生着した細胞の神経系細胞の表現型獲得能も失わなかったことから、この培養法は FCS を用いなくて済むという点で安全であり、hBMSC の細胞特性を失わないという点で有用である。これまで明らかにされていなかったが、今回の検討により PL を用いた hBMSC 培養法が中枢神経再生領域にも応用可能であることが初めて明らかになった。PL に含まれる成長因子の量のばらつきを考慮して、PL を用いた hBMSC 培養法の適正化が必要である。もうひとつの重要な点は、MRI 細胞追跡の手法を用いて、hBMSC の培養法による差を、移植後の生体内での挙動という観点で観察可能であることを初めて示した点である。今後も様々な観点で基礎実験や臨床研究において、MRI 細胞追跡の手法を応用できる可能性がある。ただし今回用いた SPIO による細胞標識は、移植後の SPIO の代謝経路が不明であり、とくに脳梗塞などの脳疾患への直接移植に際しては、脳実質に蓄積してんかん原性となる可能性があり留意を要する。また SPIO は本来 T2 造影剤であるため出血性脳卒中や外傷性中枢神経疾患に対する細胞移植では移植細胞モニタリングに支障をきたすことが予想されるため本研究の手法を応用するのは困難かもしれない。

【結論】FCS を用いずに PL を用いて培養したヒト BMSC を脳梗塞に対して移植した場合でも、病変への遊走能、生着能および生着後の神経系細胞への分化能を維持されている。PL を用いたヒト BMSC の培養法は、安全かつ有効であり、hBMSC 移植による脳梗塞再生医療の臨床応用にむけて極めて有用な方法であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	佐々木	秀直
副査	教授	神谷	温之
副査	教授	寶金	清博
副査	准教授	飛驒	一利

学位論文題名

Validity of Bone Marrow Stromal Cell Expansion by Animal Serum-Free Medium for Cell Transplantation Therapy of Cerebral Infarct in Rats - A Serial MRI Study

(無血清培養したヒト骨髄間質細胞のラット脳梗塞モデルに対する移植効果 - MRI細胞追跡による検討 -)

学位申請者伊東雅基の学位審査「最終審査」審査会は、平成24年2月8日午後4時30分より医学研究科中研究棟5階セミナー室(5-1)において行われた。主査から紹介があった後、申請者はスライドを用いながら約35分に渡って学位論文内容の発表を行った。その後、副査神谷教授から質問があった。その内容は、①platelet lysateの安全性の論拠について、②磁気標識のためのSPIO製剤の中樞神経疾患以外の領域における応用について、③ラット脳梗塞モデル-定位移植系においてヒト由来細胞を移植した場合、異種移植になるが異種移植による影響はどう考えるかについて、④今回確認された生着した移植細胞の表現型としての神経細胞マーカーは、実際の神経細胞の分化度としてはどのレベルまで成熟した細胞マーカーと考えられるのかについての質問があった。続いて、副査飛驒准教授から質問があった。その内容は、①4名のsubnormal volunteerから得られたヒトBMSCの検体間での増殖能の際について、②組織検討でのSPIO陽性細胞とヒト核特異的抗体陽性細胞の生着細胞数の定量的評価は行ったか？またそこに差異あったのか？について、③T2造影剤であるSPIO製剤にもいろいろと問題点があると考えているならば、何か他により有用なMR細胞標識製剤は考えているのかについての質問があった。続いて、主査佐々木教授から質問があった。その内容は、①今回はFCS含有培地とPL含有培地で培養したヒトBMSCの治療効果についての検討であったが、ヒトBMSC自体の治療効果はどの程度なのか検討し

ているのか？について、②実際の臨床応用に際しては、急性期の非完成脳梗塞病変の resuscitation を細胞移植療法の対象と捉えているのか？あるいは慢性期の完成脳梗塞病変の regeneration を対象として捉えているのか？について、③脳梗塞モデルの対象動物として SD ラットを用いた根拠はあるのかについて、④生着したヒト BMSC が獲得した表現型は神経細胞系と神経膠系のどちらが割合として多いのかについて、⑤移植細胞投与の手法として静脈内投与は検討したか、また静脈注射移植と定位移植のどちらが有効な方法なのかについての質問があった。最後に副査寶金教授から質問があった。その内容は①実際に PL を用いて培養した場合の移植可能な量に達するまでの具体的な日数はどのくらいなのかについて、②自家血清を用いた場合と比較して PL を用いることで培養効率を上げるためにはどうすべきか？について、③ドナー細胞の選択について iPS 細胞のドナー細胞としての実現可能性や脳梗塞再生医療の領域における最近の研究成果はあるのか？についての質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は SPIO 製剤の特性、platelet lysate、脳梗塞の細胞移植療法に関する最新の知見を踏まえて、学位申請者自身の解釈や考えを述べた。すなわち、platelet lysate は animal serum に比べると優位性はあるが、同種輸血・移植に伴う合併症のリスクはなお存在すること、移植した細胞の分化制御にはなお問題を残すこと、iPS 細胞の発展により BMSC が孕んでいる問題点を克服できる可能性もあるが、未だ見通しは不明であることなど、各質問に対して明らかである点、いまだ不明である点、これを解決するための展望について適切に回答した。質疑応答に要した時間は約 30 分であった。

この論文は、BMSC を用いた脳梗塞において移植細胞の遊走と分化に関する基礎的研究として高く評価され、慢性期脳梗塞の再生医療に貢献することが期待される。

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あわせ申請者が博士(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。

(1585 文字)