

学位論文題名

Intracerebral, but not intravenous, transplantation
of bone marrow stromal cells enhances functional
recovery in rat cerebral infarct

(骨髓間質細胞の頭蓋内直接投与は静脈投与に比較し、
脳梗塞ラットの運動機能等を優位に改善する)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】近年の多くの研究により、脳梗塞をはじめとした中枢神経疾患に対して、骨髓間質細胞 (bone marrow stromal cells; BMSC) 移植による再生治療は失われた運動機能等を改善すると報告されている。しかしながら実際の臨床応用に向けて未解決の問題も依然多く残されており、最適な移植細胞投与経路もその一つである。そこで本研究は、ラット脳梗塞モデルに対して発症1週間後にBMSCを直接投与する方法と静脈投与する方法を比較し運動機能改善等の治療効果を比較した。

【材料と方法】BMSC採取は8-10週令のオスのSDラットより行った。吸入麻酔下で安楽死させたのちに両側大腿骨を採取し内腔に存在する骨髓をDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で洗浄し骨髓細胞を採取した。その後24時間培養フラスコに入れ、浮遊細胞を除去したのちに接着している細胞を継代P1として使用した。3回継代したもの(P3)を実験に使用した。BMSCのラベリングにはQD800 (Invitrogen, USA) を使用した。100万個の細胞に対して2nmolのQD800を共培養しすべての細胞に取り込まれていることを確認した。中大脳動脈永久閉塞モデルラットは8週のオスSDラットを用いて作成した。吸入麻酔下で右側頭部を切開し開頭した。中大脳動脈を末梢部で確認し、分岐部で結紮・切離した。その後両側内頸動脈を1時間閉塞し、麻酔覚醒後に重度の麻痺症状が確認できたものを使用した。BMSC投与はともに脳梗塞発症後一週間後に施行した。細胞投与量に関しては、直接投与群は100万個、静脈投与群は300万個とした。直接投与は吸入麻酔下で前頭部を正中切開し、Bregmaから3mm外側にburr holeを開け、脳表より6mm内側にHamilton syringeを用いて自動注射器で5分間かけて20ulに溶解したBMSCを投与した。静脈投与群は吸入麻酔科に尾静脈を切開し27ゲージのカテーテルを挿入し3分間で1mlに溶解したBMSCを投与した。運動機能評価はローターロード検査を、脳梗塞前・脳梗塞後1, 2, 3, 4, 5週目に施行した。移植したBMSCの遊走能を確認するためにIVIS2000 imaging system (Xenogen, USA) を使用し体外からの蛍光観察検査を行った。吸入麻酔下にラットをIVISに安置し、上方から710nmの励起光を照射し頭蓋表面から出る蛍光を半定量的に測定した。QD800原液がおかれたEppendorf tubeをreferenceとし、ratの右頭頂部に4mmの関心領域 (Region of

interest; ROI) をおいて以下の計算式で示される Total efficiency を測定した。

$Total\ efficiency\ (\%) = \frac{total\ emission\ light\ (photons / seconds)}{total\ excitation\ light\ (photons / seconds)}$

病理学的検討は脳梗塞5週後に施行した。4%パラホルムアルデヒド灌流を行った後に、脳を摘出し、パラフィン包埋を作成した。4 μ mのcoronal sliceを作成しQD800の分布とBMSCの分化について検討した。分化についてはグリア細胞に陽性となるGFAPと、神経細胞に陽性となるNeuNを選択し免疫組織学的検査を施行した。

【結果】運動機能評価に関しては直接投与群が静脈投与群および Vehicle 群に比較し投与後2週間後より優位に運動機能の改善を認めた。運動機能改善はその後3, 4, 5週目でも同様の結果であった。蛍光 imaging による体外からの細胞観察に関しても直接投与群のみで投与後2週目と3週目で静脈投与群に比較し優位に強い蛍光を観察し、直接投与した細胞が脳表の脳梗塞巣に遊走してきているのが確認された。病理標本による細胞分布に関して直接投与群では先の体外蛍光検査でも示されていたが、多くの BMSC が脳梗塞周囲に遊走していた。一方静脈投与群においてはごくわずかな細胞が脳内に散在しているのが確認された。また直接投与された BMSC の一部は神経細胞やグリア細胞の表現型を獲得し NeuN, GFAP が陽性となっていた。

【考察】脳梗塞に対する BMSC の有用性は過去に多くの報告がなされているが、それらの多くは脳梗塞後24時間以内に静脈投与されているもので、亜急性期から慢性期にかけての静脈投与の治療効果に関しての報告は少ない。その理由として BMSC の静脈投与による神経機能回復のメカニズムは Neuro-protective theory と評されるように、BMSC から分泌される多くの神経保護サイトカイン (BDNF や PDNF など) が傷ついている神経細胞に保護的に作用することで損傷を軽くするといったものであるからと考えられる。実際 BMSC の静脈投与では過去の報告でそのほとんどが脾臓・肺にトラップされ脳内にほとんど細胞が確認されなかったにもかかわらず運動機能改善をもたらしたとの報告が多く存在する。しかし実際の臨床応用を考えた場合、患者本人の骨髄から BMSC を採取・培養するため現在の技術では早期の細胞培養は難しく急性期の治療は不可能であり、亜急性期～慢性期での投与となってしまうが、亜急性期～慢性期での静脈投与の報告は少なく、脳神経が不可逆的に損傷された後に静脈投与がどの程度神経機能回復をもたらすかは不明であったが、今回の我々の実験で脳内に投与された BMSC はほとんど存在せず、十分な機能改善を得ることはできなかったことが示された。一方直接投与は新たな脳損傷の危険性があるものの、十分量の BMSC を脳内に送ることができることが利点であった。Neuro-restorative theory と評される、投与された BMSC が梗塞巣に遊走し、神経細胞が失われた場所において、神経細胞の表現型を獲得し新たな network を構築することが今回の我々に実験でも実証された。

【結論】本研究は脳梗塞1週間後に BMSC を投与する際に直接投与した方が静脈投与するよりも運動機能を優位に改善させることを初めて報告したものである。また実際、脳内に生着・分化した細胞も直接投与群の方がより多いことが証明され、体外からの in-vivo 蛍光検査でもそれを証明した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 岡 充 弘
副 査 教 授 佐々木 秀 直
副 査 教 授 田 中 真 樹
副 査 教 授 寶 金 清 博

学位論文題名

Intracerebral, but not intravenous, transplantation of bone marrow stromal cells enhances functional recovery in rat cerebral infarct

(骨髄間質細胞の頭蓋内直接投与は静脈投与に比較し、
脳梗塞ラットの運動機能等を優位に改善する)

本研究はラット脳梗塞モデルにおいて、脳梗塞急性期における骨髄間質細胞 (BMSC) 移植治療の細胞投与ルートに関して検討したものである。

神経細胞は再生能力が低いため脳梗塞などによる損傷に対しての機能回復は難しいと考えられてきたが、近年新たな治療法として細胞移植を中心とした再生医療が注目されている。本研究グループは今までも骨髄間質細胞が免疫・倫理的障壁が少ないこと、腫瘍原性が認められないことから臨床応用に近い細胞種であると考え積極的に研究を行ってきた。今回申請者は特に臨床応用に向けた未解決課題である投与ルートによる治療効果について検討した。その内容は脳梗塞 1 週間後に骨髄間質細胞を直接投与 (100 万個) した群と経静脈投与 (300 万個) した群と Vehicle において、運動機能・細胞遊走能の *in-vivo* imaging・細胞分布および分化度について投与ルート間での差異について検討した。結果として運動機能評価に関しては直接投与群が静脈投与群および Vehicle 群に比較し投与後 2 週間以降より優位に運動機能の改善を認めた。蛍光 imaging による体外からの *in-vivo* imaging に関しても直接投与群のみで投与後 2 週目から 4 週目で静脈投与群に比較し優位に強い蛍光を観察し、直接投与した細胞が脳表の脳梗塞巣に遊走してきているのが確認された。病理標本による細胞分布に関して直接投与群では多くの BMSC が脳梗塞周囲に遊走していたが、静脈投与群においてはごくわずかな細胞が脳内に散在しているのが確認されただけであった。また直接投与された BMSC の一部は神経細胞やグリア細胞の表現型を獲得し、それぞれ NeuN, GFAP が陽性となっていたことが確認された。

今回の審査に対して主査の吉岡教授より直接投与群においては神経細胞系のマーカーが発現していると報告したが、その神経細胞の神経伝達物質による分類 (グルタミン酸などのアミノ酸系、パゾプレシン等のペプチド系、セロトニンなどのモノアミン系など) は行っているかとの指摘があったが、今回は神経細胞マーカーである NeuN のみを測定してお

り詳細な神経細胞の分類を調べる免疫学的染色方法は行っていないと説明した。細胞の morphology が未熟であり完全な神経ネットワークを作り出しているかどうかは疑問であるが、その一部の神経ネットワークの中でどのような神経伝達物質が作られるようになっていくかについては大変興味深い問題であり今後の課題であると考えられた。田中教授から投与ルートに関連し、髄腔内投与についての他の報告ではその生着などはどのように報告されているかとの質問がなされた。本研究では行っていないが、過去の脊髄損傷に対する髄腔内投与の報告では静脈投与に比較し生着細胞は多いものの直接投与に比較しその数は大変少ないものであったと説明した。損傷された神経細胞から分泌される CXCR4 をはじめとした遊走因子によって細胞の遊走が行われていると考えられるが、髄腔内では髄液の動きに応じて細胞が拡散してしまい十分な量の細胞が集積できない可能性があることを説明した。佐々木教授から慢性期における細胞分化の率について質問を受け、Peri-infarction area では 70%近くが神経細胞のマーカーを発現していたと報告した。皮質および白質において表現型の蛋白に違いがみられている傾向があることを説明した。宝金教授から実際の臨床応用を検討したとき、正常脳に細胞を投与するのが良いのか、梗塞巣内に投与するのが良いのかについての指摘があったが、当グループは以前より梗塞巣内への細胞投与はサイトカイン等による細胞障害の可能性が高いため正常脳に投与しているが、実際の臨床研究においては正常脳を損傷するリスクを検討するべきであると説明した。

この論文は *Neuropathology* にすでに掲載されており、今後の臨床応用に向けた貴重なデータを提供しうるものであると考えられる。

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）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。