

学 位 論 文 題 名

Bone Marrow Stromal Cells Transplantation Enhances Recovery of Local Glucose Metabolism after Cerebral Infarct in Rats – A Serial ^{18}F -FDG PET Study

（骨髄間質細胞移植は脳梗塞後の局所糖代謝を改善する

－小動物用PET/CTによる検討－）

学位論文内容の要旨

【背景】近年の研究で中枢神経障害の動物実験において、骨髄間質細胞(Bone marrow stromal cells; BMSC)移植が神経機能の改善に一定の効果を呈することが示唆されている。BMSC は自家細胞から培養して得られ、腫瘍化しないと言われているため、他の幹細胞に比べて倫理的、免疫学的な問題も少ない。このため、臨床応用に最も近い細胞治療の一つと考えられている。一方で、BMSC 移植の脳梗塞に対する臨床応用を想定した場合、神経機能の改善効果以外の客観的な治療効果判定法は確立されていない。過去の神経保護薬の歴史から顧みると、中枢神経障害に対する新たな治療法において、神経所見以外の客観的評価法を併用することは、ホストの反応を評価する意味でも必要不可欠である。このため、本研究では中枢神経障害モデルに対する BMSC 移植の客観的な評価法として ^{18}F -FDG PET を用いて評価した。

【材料と方法】SD Rat 8w オスを用いて外科的に中大脳動脈を結紮することにより右側に脳梗塞を作成し、BMSC 直接移植群(n=9)と vehicle 移植群(n=9)の 2 群比較を行った。運動機能評価として rotarod を梗塞作成前より 1 週間ごとに評価した。BMSC 移植群には Green Fluorescent Protein (GFP)-transgenic rat から採取し培養した BMSC を使用し、梗塞 7 日後に同側の線条体へ BMSC(1×10^6 cells)を局所注射した。 ^{18}F -FDG PET を用いて移植前日（脳梗塞作成 6 日後）および移植 4 週間後（脳梗塞作成 35 日後）に局所糖代謝を評価した。Region of the interests(ROIs)は背側皮質の梗塞周囲部および線条体におき、集積値の左右比(右/左)で比較した。また、組織評価は移植 4 週間後に蛍光 2 重免疫染色を用いて移植細胞の生着や形態評価、組織のグルコーストランスポーター(GLUT)の評価を施行した。

【結果】rotarod において、運動機能は脳梗塞作成 6 日後に両群とも作成前と比して約 60%程度の低下を認め、28 日まではこの傾向は続いた。しかし、脳梗塞作成 35 日後には BMSC 群は運動機能の有意な改善を認めた($p < 0.05$)。 ^{18}F -FDG PET では、背側新皮質において、BMSC 群は正常対側比で移植前に $72.7 \pm 4.4\%$ 、移植 4 週間後が $87.7 \pm 5.3\%$ と移植 4 週間後に有意に上昇した($p < 0.001$)。vehicle 群も左右比が移植前に $72.5 \pm 4.2\%$ 、移植 4 週間後が $78.7 \pm 4.0\%$ と有意に上昇したものの($p < 0.01$)、移植 4 週後を BMSC 群と vehicle 群とで比較すると BMSC 群の方が有意に高い値であった($p < 0.001$)。すなわち、vehicle 群の脳局所糖代謝は移植 4 週間後に自然経過でもある程度改善するものの、BMSC 群投与により脳局所糖代謝の改善よりが押し上げられる結果となった。線条体においては、BMSC 群と vehicle 群に有意差を認めなかった。組織評価では、梗塞周辺脳において

GFP 陽性細胞 14.2 ± 7.6 cells/mm² 認め、その約 90%が神経細胞の表現形を獲得していた。梗塞周囲部の視野あたりの GLUT1 の面積比率は vehicle 群において脳梗塞側が $2.62 \pm 0.43\%$ であったのに対し、対側は $2.21 \pm 0.67\%$ で脳梗塞側に有意に面積比の上昇を認めた($P=0.023$)。一方、BMSC 群においては脳梗塞側が $2.05 \pm 0.34\%$ であったのに対し、対側は $2.32 \pm 0.44\%$ で左右の面積比に有意差を認めなかった。GLUT3 に関しても同様に、vehicle 群において脳梗塞側で有意に GLUT3 陽性細胞数が増加しており、1 視野あたり脳梗塞側で 67.2 ± 19.2 cells と対側 56.8 ± 20.3 cells であった($P=0.034$)。一方、BMSC 群においては脳梗塞側で 48.9 ± 19.3 cells、対側で 55.6 ± 16.1 cells と有意差を認めなかった。このように、GLUT1 や GLUT3 の BMSC 群において、脳梗塞側の周囲脳の病的な upregulation が抑制されていた。

【考察】小動物用 PET を用いた本研究により、BMSC は脳梗塞後の神経機能の改善のみならず、梗塞周囲部の糖代謝の改善も促していることが証明された。また、BMSC は線条体に移植されたのちに梗塞周囲部に遊走し、その大部分が神経系のマーカーを呈する細胞として代謝や機能改善に貢献している可能性があった。グルコーストランスポーターは 13 種類の isoforms が存在すると言われており、脳においては GLUT1 や GLUT3 がより多く存在し、GLUT1 は内皮細胞内に、GLUT3 はニューロンに存在する。そして、虚血脳においては GLUT1 や GLUT3 が upregulation されることが知られているが、こういった異常な upregulation を BMSC が神経細胞に置き換わることにより、あるいは神経保護因子の放出により抑制している可能性を認めた。今後の臨床応用を視野に入れた場合、免疫組織学的評価や autoradiography などの動物実験に限定されたモダリティではなく、¹⁸F-FDG PET のような動物実験と臨床と共通のモダリティを活用することが重要であり、これにより動物実験と臨床との橋渡しが可能となってくる。また、¹⁸F-FDG PET は繰り返し評価することが可能であり、BMSC 移植後にホスト脳の反応が起こる時期の同定なども可能である。こういった ¹⁸F-FDG PET の利点を活用していくことが、臨床治験を施行してうえで肝要であると思われる。

【結語】BMSC を亜急性期に脳に直接投与することにより、局所糖代謝の改善を促すとともに運動機能の改善を促した。BMSC は脳性 glucose transporter である GLUT1 や GLUT3 の病的な upregulation を抑制することも判明した。¹⁸F-FDG PET は臨床においても、BMSC 移植の有効性を客観的に評価する方法として利用できる可能性がある。

学位論文審査の要旨

主査	教授	佐々木	秀直
副査	教授	寶金	清博
副査	教授	近藤	亨
副査	教授	趙	松吉

学位論文題名

Bone Marrow Stromal Cells Transplantation Enhances Recovery of Local Glucose Metabolism after Cerebral Infarct in Rats – A Serial ^{18}F -FDG PET Study

(骨髄間質細胞移植は脳梗塞後の局所糖代謝を改善する

－小動物用PET/CTによる検討－)

近年、中枢神経系の障害において、動物実験により、骨髄間質細胞(BMSC)移植が神経機能の改善に一定の効果を呈することが明らかにされている。BMSCは自家細胞より培養可能であり、腫瘍化もしないことから、他の幹細胞治療に比べて倫理的、免疫学的な問題も少ない。以上より細胞治療の臨床応用が期待されているが、神経機能の効果改善以外に治療効果の客観的判定指標は確立されていない。申請者は、生後8週のおスSDラットを用いて頸動脈結紮により脳梗塞モデルを作製し、GFP遺伝子導入したSDラットより採取培養したBMSCを、梗塞7日目に患側の線条体に直接移植し、rotarodを用いて継続的に運動機能を評価すると共に、移植4週間後に小動物用PETを用いて ^{18}F -FDGにより糖代謝を評価した。また、組織学的検討も行なった。その結果、移植35日目に対照群に比べて移植群に有意な運動機能の改善と、病巣周辺の新皮質において糖代謝の有意な改善が認められた。組織評価では梗塞周辺組織においてGFP陽性細胞を認め、その90%はNeuN陽性細胞(=神経細胞)に分化し、GLUT1やGLUT3などグルコーストランスポーターの病的upregulationは抑制されていた。 ^{18}F -FDG PETはBMSC移植を評価する指標としての有効性が示唆された。

今回の発表に対して主査の佐々木秀直教授より、直接移植したBMSCは線条体に残存するのか、また残存しない場合は遊走するのかといった質問があり、過去の実験から脳梗塞周辺部に1週間後から遊走し、線条体には殆ど残存しないと説明した。また、移植したBMSCがNeuNへの分化がメインで、グリア細胞やオリゴ細胞には分化しないのかという質問があり、脳梗塞周囲部ではNeuN陽性細胞に分化するものが多く、海馬周辺ではグリア細胞に分化するものが多いことを説明した。最後に、効果の発現に4週間の時間がかかるがどういった作用によるものかという質問があり、脳梗塞周辺部の脳に遊走したBMSCが神経細胞に分化することにより、またBMSCが脳保護因子を分泌することによると説明した。副査の寶金清博教授より、BMSCが血流を改善するといった報告はあるかという質問があり、知るかぎりの報告はないと説明した。また、BMSCの移植後の細胞追跡の方法論についての質問があり、過去の本研究グループの業績ではリゾビストをBMSCに混ぜてMRIを用いて追跡する方法があるが、核医学的評価ではBMSCの遊走に長期間かかるため、かなり半減期の長いアイソトープを用いる必要があり、倫理的に投与が困難であると説明した。副査の近藤 亨

教授からは 10^6 個の BMSC を移植したにもかかわらず、生着する細胞が少ないが、どういった BMSC がメインの作用をしているのかとの質問があり、最近の研究では保護因子の役割が大きいことが示唆されていると説明した。また、血小板由来の培養液で培養した場合、PDNF が栄養因子としてメインである可能性があり、PDNF が BMSC 培養を促進させる可能性について質問があったが、その通りであることを説明した。さらに、血中にも BMSC が存在し、これは BBB を超えて作用するのかといった質問があり、過去の報告では動脈注射が条件さえあれば有用であることが判明しており、血中の BMSC を利用できる可能性があると説明した。最後に、GLUT の発現が増えると代謝が増える、すなわち FDG-PET の値が上昇し逆の結果になるのではないかといった質問があったが、虚血の研究において、GLUT と FDG-PET の研究はなく、詳細は不明であるが、脳の糖代謝環境が良好であったため、GLUT の病的 up-regulation が抑制され、FDG-PET の代謝が改善した可能性があると説明した。副査の趙松吉教授からは、BMSC の投与は動脈注射でも治療効果があるといった報告はあるのかといった質問があり、動物実験では、超急性期に投与すれば動注でも静注でも効果があることが判明しているが、患者本人から培養することを考えると、培養期間のため超急性期投与は困難であることを説明した。また、実際に臨床試験において直接投与をする部位と投与方法に関して質問があり、脳梗塞周囲の安全な場所に直接投与することになる可能性が高いことを説明した。さらに、FDG-PET は臨床応用出来るかといった質問があり、臨床試験において FDG-PET で代謝が変化してくる時期をエンドポイントと定義するなどの使い方が検討されるのではないかと説明した。

この論文は、BMSC による細胞治療において、動物実験と臨床応用との架け橋となる translational research として貴重なデータを提供し、今後の発展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