

論文内容要旨

Simulated microgravity facilitates cell migration and neuroprotection after bone marrow stromal cell transplantation in spinal cord injury

(微小重力環境は脊髄損傷における骨髄間質細胞移植において
細胞の遊走と神経保護を促進する)

Stem Cell Research & Therapy, 2013, in press.

主指導教員：栗栖 薫 教授
(応用生命科学部門 脳神経外科学)
副指導教員：松本 昌泰 教授
(応用生命科学部門 脳神経内科学)
副指導教員：富永 篤 准教授
(応用生命科学部門 脳神経外科学)

光原 崇文

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

緒言

再生医療の細胞移植治療のソースとして、骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cells: 以下, BMSCs) は、間葉系幹細胞を含み多分化能を持つことが報告されており、神経再生医療分野でも注目されている。これまで微小重力環境下では、細胞の分化が抑制されることや細胞の遊走能が増すことが報告されており、本研究では微小重力環境を応用して BMSCs を培養し、その神経再生・保護効果を検討した。

材料と方法

5 週齢 Fischer/F344 ラットの大腿骨と脛骨より骨髄細胞を採取し、接着細胞を培養細胞 (rBMSCs) として、1G 環境下にて 7 日間培養を行った群 (1G 群) と、3D-clinostat を使用した模擬微小重力環境下にて 7 日間培養を行った群 (CL 群) に分けた。各群で形態学的観察を行うとともに、*Oct-4* (未分化マーカー)、*CXCR4* (細胞遊走因子受容体マーカー)、*NGF* および *BDNF* (神経栄養因子) の発現を RT-PCR で観察した。また各群で免疫染色にて *CXCR4* 陽性率を算出した。続いて成体雌ラットに Weight drop method により脊髄損傷を作成し、1G/CL 両群で移植直前に PKH26 にて標識した rBMSCs を移植した。移植実験群 (n=29) は、①脊髄損傷直後に PBS の静脈注射を行ったラットをコントロール群 (以下、Cont 群, n=11)、②1G 環境下で 7 日間培養をした rBMSCs を脊髄損傷直後に移植したラット (1G 群, n=11)、③模擬微小重力環境下で 7 日間培養した rBMSCs を脊髄損傷直後に移植したラット (CL 群, n=7) の 3 群に分けた。細胞移植は尾静脈より一匹あたり 3.0×10^5 個の rBMSCs を経静脈投与した。脊髄損傷から 21 日間、後肢運動機能評価を BBB scale, inclined plane task score を用いて行い、その後脊髄を摘出して凍結標本とし H&E 染色にて形態観察した。また NF-H (神経細胞分化マーカー) と GFAP (グリア細胞分化マーカー) の蛍光免疫染色及びアポトーシス促進マーカーとして Bax, アポトーシス抑制マーカーとして Bcl-2 と Survivin を脊髄組織の免疫染色を行った。統計解析はマン・ホイットニーの U 検定を使用した。

結果

CL 群では 1G 群に比べ小型で球形の細胞が多く、*Oct-4* と *CXCR4* の mRNA の発現が強くみられた。*NGF*, *BDNF* の発現は両群で差はみられなかった。CL 群では免疫染色において *CXCR4* 陽性率が有意に高かった (p value < 0.01)。

移植後のラットの運動機能変化は CL 群で他の 2 群と比較し有意な改善がみられた (p value < 0.01)。脊髄損傷 21 日後の H&E 染色では、3 群共に脊髄後索から中心部の損傷と組織の空洞化が観察された。空洞面積率は CL 群で有意に小さかった (p value < 0.05)。細胞移植をした 1G 群と CL 群では、脊髄損傷部周囲に PKH26 の赤色蛍光を発する移植細胞が観察された。CL 群では移植細胞がより多く集簇して観察された。移植細胞の一部では、NF-H および GFAP の発現が観察された。脊髄損傷領域及び周辺部において、CL 群では Bax 陽性率が他の 2 群より有意に低く (p value < 0.01)、Survivin 陽性率は Cont 群と比較して有意に高かった (p value < 0.01)。

考察

本研究では脊髄損傷直後に異なる重力環境下で培養した rBMSCs を移植し、その移植効果を

検討した。微小重力下では未分化性が維持される可能性が示唆され、また *CXCR4* の発現が強くみられた。脊髄損傷後切片では、標識された移植 rBMSCs 細胞が CL 群で多く集簇して観察された。これらより、微小重力環境下での培養は、rBMSCs の細胞遊走能を促進する可能性が示唆された。rBMSCs 移植を行ったラットの後肢運動機能は、3 週間の観察期間に CL 群で有意に改善した。移植された rBMSCs 細胞には NF-H, GFAP の発現がみられ、神経組織へ分化していることが確認された。両群で移植細胞は *NGF*、*BDNF* の神経栄養因子を発現しており、CL 群では脊髄損傷後の空洞形成が有意に小さく、また損傷部脊髄においてアポトーシスがより抑制されており、rBMSCs 移植による神経保護効果により神経組織の二次的損傷が抑制され組織の再生が促されている可能性が示唆された。以上より微小重力環境で培養された rBMSCs が多面的な治療効果を発揮して脊髄損傷後組織回復を促し、より良好な機能回復をもたらすという卓越した神経再生能力を持つことが示された。

結論

模擬微小重力環境下で培養した骨髄間質細胞の脊髄損傷に対する移植の有用性が示唆された。