

論文内容要旨

Rat cranial bone-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes functional recovery in ischemic stroke model rats

(ラット頭蓋骨由来間葉系幹細胞移植は虚血性脳卒中モデルラットにおいて機能回復をもたらす)

Stem Cells and Development, in press.

主指導教員：栗栖 薫教授

(医歯薬保健学研究科 脳神経外科学)

副指導教員：丸山 博文教授

(医歯薬保健学研究科 脳神経内科学)

副指導教員：飯田 幸治准教授

(医歯薬保健学研究科 脳神経外科学)

阿美古 将

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

虚血性脳卒中によって引き起こされる機能障害は治療困難である。近年血管内治療等の進歩はあるがその効果は限定的である。以前より中枢神経疾患に対する間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) を用いた細胞移植は注目されてきた。脳卒中モデルにおいて、MSCs は神経栄養因子を分泌することや障害された神経組織に遊走し内因性神経再生を惹起することが示されている。また、MSCs の特性としてその供給源によって性質が異なることが報告されており、MSCs を用いた移植治療において供給源選択は重要である。骨由来 MSCs は通常げっ歯類では長管骨から、ヒトでは腸骨から分離され、それらは中胚葉由来である。骨由来 MSCs の供給源として我々は頭蓋骨に着目している。我々は以前に、ヒト頭蓋骨由来 MSCs (cMSCs) は神経堤由来であり、腸骨由来 MSCs に比べ神経分化傾向が強いことを報告した。このことから頭蓋骨は中枢神経系疾患に対する細胞療法において有効な供給源となり得ることが予想される。しかしながら、cMSCs の治療効果についてはいまだ詳細に検討されていない。本研究では、虚血性脳卒中モデルラットにおけるラット頭蓋骨由来 MSCs (rcMSCs) による治療効果の実証を目的とした。比較対象はラット長管骨由来 MSCs (rbMSCs) とした。rcMSCs は付着組織を除去したラット頭蓋骨を 5mm 台の切片にし、増殖培地に播種することにより得ることができた。rbMSCs はラット脛骨・腓骨骨髓から培養した。まず rcMSCs と rbMSCs の両者において FACS (MSC positive marker として CD29, CD90, CD44, MSC negative marker として CD34, 44) と多系統への分化能(骨、軟骨、神経)の評価を行った。FACS において両者共に CD29, CD90, CD44 は positive、CD34, CD44 は negative であった。また両者共に多系統への分化能力を示し、これらのことから両者共に MSCs であることが確認された。この rcMSCs と rbMSCs を用いて以下の 3 系統の実験を行った。統計学的解析として、mRNA 発現と細胞生存率については Mann-Whitney の U 検定を用い、神経機能評価については繰り返しのある二元配置分散分析を用いた。有意水準 p 値が 0.05 未満を統計的に有意とみなした。

実験①: 両者において real-time PCR 法を用い神経堤関連因子である *Snail*, *p75*, *Slug* と神経栄養因子である *Bdnf*, *Gdnf*, *Ngf* の mRNA 発現の解析を行った。結果としては *Snail* と *p75* の発現が rcMSCs で有意に高く (*Snail*: n=6, p<0.01; *p75*: n=6, p<0.05, *Slug*: n=6, p=0.083)、同様に *Bdnf* と *Ngf* の発現が rcMSCs で有意に高かった (*Bdnf*: n=6, p<0.01; *Gdnf*: n=6, p=0.057; *Ngf*: n=6, p<0.05)。

実験②: 中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルラットを作成し、これに対して Ctrl 群, n=8: PBS のみ、rcMSCs 群, n=8: rcMSCs 1.0×10^6 、rbMSCs 群, n=8: rbMSCs 1.0×10^6 の移植を尾静脈から MCAO の 24 時間後に行った。神経機能評価としては mNSS を用いた。結果として、MCAO 後 4 日、7 日、14 日、21 日、28 日にて rcMSCs 群で Ctrl 群、rbMSCs 群に比し mNSS の有意な改善が見られた。移植 24 時間後に摘出した脳組織切片における脳梗塞部位に、PKH でラベルした rcMSCs と rbMSCs は、共に遊走していることが確認できたが、その細胞数はわずかであった。

実験③: rcMSCs と rbMSCs の馴化培地をそれぞれ作成した。酸化ストレスおよび炎症性ストレスに暴露したマウス神経芽細胞腫/ラットグリオーマ細胞 (NG108-15) にそれぞれの馴化培

地を加えた群において生存率と real-time PCR 法を用いた *Bax/Bcl2* 比の解析を行った。結果としては rcMSCs 馴化培地を加えた群において生存率は有意に高かった (酸化ストレス暴露 : n=6, p<0.05; 炎症性ストレス暴露 : n=6, p<0.01)。また、rcMSCs 馴化培地を加えた群において *Bax/Bcl2* 比は有意に低かった (酸化ストレス暴露 : n=6, p<0.01; 炎症性ストレス暴露 : n=6, p<0.01)。

BDNF、NGF の炎症抑制、アポトーシス抑制効果は過去の文献にて散見される (Matsudau, et al., 2015 ; Liu, et al., 2010 ; Sekine, et al., 2012 ; Kirkland, et al., 2007)。実験①にて rcMSCs は神経栄養因子を豊富に発現することが示唆され、これは rcMSCs が神経堤由来であることに起因すると考えられる。実験②にて MCAO モデルに対する rcMSCs の移植効果は rbMSCs よりも高く、rcMSCs の豊富な神経栄養因子分泌に起因する可能性が示唆された。実験③にて rcMSCs 馴化培地には rcMSCs から分泌された豊富な神経栄養因子の存在が示唆され、虚血模擬環境に暴露された NG108-15 におけるアポトーシスの抑制と高い生存率につながったものと考えられた。

rcMSCs は豊富な神経栄養因子を分泌する能力を持ち、虚血性脳卒中モデルラットへの移植にて有効な機能改善効果を示した。このことから頭蓋骨由来 MSCs は中枢神経障害に対する細胞移植において有力な選択肢となり得ることが示唆された。今後ヒト頭蓋骨由来 MSCs を用いた更なる検討が期待される。