

論 文 内 容 要 旨

Early Transplantation of Human Cranial Bone-derived
Mesenchymal Stem Cells Enhances Functional Recovery
in Ischemic Stroke Model Rats

(ヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞の脳梗塞モデルラットに
対する早期移植効果の検討)

Neurologia medico-chirurgica, 2020, in press.

主指導教員：栗栖 薫 教授
(医系科学研究科 脳神経外科学)
副指導教員：丸山 博文 教授
(医系科学研究科 脳神経内科学)
副指導教員：飯田 幸治 准教授
(医系科学研究科 脳神経外科学)

大下 純平

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景・目的】近年、再生医療分野の発展に伴い、脳梗塞に対するヒト間葉系幹細胞（human mesenchymal stem cells: hMSCs）の良好な移植効果が報告されている。hMSCs は、腸骨骨髓をはじめ、脂肪、皮膚、臍帯、胎盤など様々な組織から樹立可能であり、採取する部位により特性が異なるとされる。以前我々は、ヒト頭蓋骨由来 MSCs（human cranial bone-derived MSCs: hcMSCs）の樹立に成功し、ヒト腸骨由来 MSCs（human iliac bone-derived MSCs: hiMSCs）に比べ、神経堤マーカーの発現が高く、神経系細胞へ分化しやすいことを報告している（Shinagawa K, et al. Neuroscience Letters, 606 : 161-166, 2015）。これまで、脳梗塞モデルラットに対する hMSCs の移植効果は hiMSCs での報告が多く、hcMSCs での報告はない。今回、hcMSCs の細胞学的特徴と脳梗塞モデルラットへの移植効果について、hiMSCs と比較検討した。

【方法】開頭術時に側頭骨、蝶形骨から頭蓋骨を採取し hcMSCs を樹立した。hiMSCs は Lonza 社より購入した。①細胞学的特徴を検討するため、神経栄養因子（*BDNF*, *VEGF*）の遺伝子発現を real-time PCR 法を用いて解析した。②hMSCs の移植に先立ち、intraluminal thread occlusion method にて、脳梗塞モデルラットを作成した。hMSCs の移植効果を確認するべく、脳梗塞モデルラット作製 3 または 24 時間後に、 1.0×10^6 個の hcMSCs もしくは hiMSCs を尾静脈から投与し、コントロール群も含め神経機能を評価した。③*In vitro* で、脳梗塞後の神経細胞損傷を確認するため、NG108-15（Neuroblastoma×glioma hybrid cell）を炎症あるいは酸化ストレスに 3 もしくは 24 時間曝露した後、コントロール群も含め、生存率を確認した。ついで、hMSCs の神経保護効果を検討するため、NG108-15 を 3 もしくは 24 時間ストレスに曝露した後、hcMSCs もしくは hiMSCs の馴化培地を加え、コントロール群も含め 24 時間後の生存率を確認した。

【結果】①神経栄養因子の発現は hiMSCs に比べ hcMSCs で高かった。②脳梗塞モデルラットの神経機能は、脳梗塞 24 時間後の投与では、hcMSCs 群、hiMSCs 群ともにコントロール群と同等であったが、脳梗塞 3 時間後の投与では、hiMSCs 群やコントロール群に比べ、hcMSCs の投与で神経機能が改善した。③ストレス曝露後の NG108-15 生存率はコントロール群にくらべ低く、ストレス曝露群間でも、3 時間にくらべ 24 時間ストレス群で有意に低かった。ストレス曝露後の NG108-15 に hcMSCs 馴化培地を加えることで、3 時間ストレス曝露群では炎症・酸化の両ストレスで、24 時間ストレス曝露群では炎症ストレスのみで生存率が改善した。

【考察】腸骨は中胚葉由来である一方、前頭骨、側頭骨、蝶形骨など一部の頭蓋骨は神経堤由来とされる。今回の検討で、hcMSCs は hiMSCs にくらべ神経栄養因子の発現が高く、由来によ

って hMSCs の特性が異なることが確認された。中枢神経損傷に対する MSCs の移植効果は、BDNF、VEGF などの神経栄養因子による神経保護効果が主体と考えられている。今回の検討で、脳梗塞モデルラットに hcMSCs を移植することで、神経機能の有意な改善を認めたが、hcMSCs が豊富に発現する神経栄養因子が、脳梗塞後の機能改善をもたらしたことが示唆された。脳梗塞モデルラットに対する hcMSCs の移植効果は、脳梗塞作成 24 時間後投与では確認されなかったが、3 時間後投与で有意に神経機能の改善を認めた。In vitro の検討で、NG108-15 の生存率はストレス曝露時間に伴い急激に低下しており、脳梗塞後に急速な神経細胞損傷が生じることが示唆された。ストレス曝露後の NG108-15 に、hcMSCs の馴化培地を加えることで、3 時間ストレス曝露後では炎症・酸化いずれのストレス下でも生存率は改善したが、神経細胞損傷が進行した 24 時間ストレス曝露後では、生存率の改善は限定的であった。脳梗塞後早期の hcMSCs 移植効果は、虚血後の神経細胞死が進行する前に、hcMSCs に由来する豊富な神経栄養因子が、神経細胞の細胞死を予防することで機能改善につながったことが示唆された。

【結語】 hcMSCs は、hiMSCs に比べて、神経栄養因子の発現が豊富であり、虚血によって生じる神経損傷に対して高い神経保護効果が期待される。hcMSCs を脳梗塞早期に投与することで効果的な機能改善が見込まれる。