

論文内容要旨

Transplantation of rat cranial bone-derived
mesenchymal stem cells promotes functional
recovery in rats with spinal cord injury

(ラット頭蓋骨由来間葉系幹細胞移植は脊髄損傷モデルラットにおいて機能回復をもたらす)

Scientific Reports,11(1),2021.

主指導教員：堀江 信貴教授

(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：弓削 類教授

(医系科学研究科 生体環境適応科学)

前田 雄洋

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

脊髄損傷は恒久的な機能障害を引き起こす重症な疾患であるが、効果的な治療方法は確立されていない。近年、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) を用いた細胞移植による再生治療が脊髄損傷に対する新たな治療戦略として注目されている。また、MSCs は骨髄や脂肪組織など様々な組織から樹立が可能である一方で、その供給源によって性質が異なることが報告されている。そのため MSCs を用いた移植治療において供給源選択は重要である。我々はすでに、神経堤由来である頭蓋骨から樹立した MSCs は、骨髄や脂肪組織由来の MSCs と比較して、神経栄養因子の発現が高いことを報告 (Ootsuka, et al, 2021)、脳梗塞モデルラットに対する移植効果を確認している (Abiko, et al, 2018)。そのため、頭蓋骨由来 MSCs は脊髄損傷など他の中枢神経系疾患への応用が期待されるが、脊髄損傷モデルへの移植効果は証明されていない。本研究では、脊髄損傷モデルラットにおけるラット頭蓋骨由来 MSCs (rcMSCs) による急性期移植効果の実証とその作用機序の解明を目的とした。比較対象はラット長管骨由来 MSCs (rbMSCs) とした。rcMSCs と rbMSCs はそれぞれラットの頭蓋骨と脛骨・腓骨骨髄から樹立した。

この rcMSCs と rbMSCs を用いて以下の 4 系統の実験を行った。統計学的解析として、mRNA 発現の比較には Mann-Whitney の U 検定を、脊髄組織の Cavity rate や細胞の生存率の比較には一元配置分散分析を、神経機能回復の比較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: rcMSCs と rbMSCs の両者において real-time PCR 法を用い神経栄養因子である Bdnf、Gdnf、Ngf、VEGF と抗炎症サイトカインである Tgf-B と Tsg-6 の解析を行った。結果としては rcMSCs で Bdnf, Gdnf, VEGF が有意に高かった。

実験②: 脊髄損傷 (SCI) モデルラットを作成し、Ctrl 群 (n=11: PBS 投与のみ)、rcMSCs 群 (n=11: rcMSCs 移植) と rbMSCs 群 (n=11: rbMSCs 移植) の 3 群に振り分けた。MSCs の移植は尾静脈から SCI 作成の 24 時間後に行い、移植細胞数は 1.0×10^6 個とした。神経機能回復の評価には行動学的評価として BBB score と inclined plane task score を、電気生理学的評価として Motor evoked potential (MEP) を測定し波形の振幅の回復率を計算、それぞれ 3 群間で比較をおこなった。また移植後 28 日目の脳組織を回収し、損傷部位の評価として脊髄での空洞形成の程度から、Cavity rate を計算し、3 群間で比較を行った。結果として、行動学的評価で、rcMSCs 群において Ctrl 群、rbMSCs 群に比し BBB score と inclined plane task score の有意な改善が見られた。MEP の回復率においても、rcMSCs 群で Ctrl 群、rbMSCs 群に比して有意な改善が得られた。脊髄損傷部位の Cavity rate においても rcMSCs 群は Ctrl 群、rbMSCs 群に比して有意に小さい結果であった。

実験③: SCI モデルラットを作成し実験②同様に、Ctrl 群 (n=7)、rcMSCs 群 (n=6) と rbMSCs 群 (n=6) の 3 群を振り分けた。MSCs の移植は尾静脈から SCI 作成の 24 時間後に行った。移植後 24 時間後に損傷部の脊髄組織を摘出し、real-time PCR 法を用い Bax/Bcl2 比、Caspase-3、TNF- α や IL-1b の解析を行った。結果として、rcMSCs 群では Ctrl 群と比較して TNF- α や IL-1b の発現が有意に低かった。

実験④：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 rcMSC-CM 群と rbMSC-CM 群、通常の増殖培地のみ Ctrl 群をそれぞれ作成し、3 群間で生存率を比較した。さらに real-time PCR 法を用い、アポトーシス経路に関与する因子である Bax/Bcl2 比、Caspase-3 やネクロトーシス経路に関与する因子である Tnfrsf1、TLR4、MLKL の解析をおこなった。結果としては炎症ストレス、酸化ストレス暴露双方において、rcMSC-CM 群は Ctrl 群と比較して生存率は有意に高かった。また rcMSC-CM 群は Ctrl 群と比較して、炎症ストレス下では Tnfrsf1、TLR4 や MLKL が有意に低く、酸化ストレス下では Bax/Bcl2 比や Caspase-3 が有意に低かった。

本研究で既知の報告同様に rcMSCs の性質として高い神経栄養因子の発現が確認できた。また SCI に対する rcMSCs の急性期移植効果を、すでに確立されている行動学的評価項目で実証するとともに、我々が近年報告している経時的な MEP 測定の技術(Maeda, et al., 2021) を応用し、電気生理学的に rcMSCs 移植による神経機能回復効果を実証することができた。rcMSCs の脊髄損傷組織への作用機序については実験③、④の結果から、アポトーシス経路やネクロトーシス経路を介した細胞死への抑制的な関与が示唆された。実験①で rcMSCs において高い発現を認めた Bdnf、Gdnf、VEGF といった神経栄養因子については、炎症抑制、神経保護作用だけでなく、上記した細胞死経路への抑制作用(Li, et al,2012; Morrice, et al, 2017; Jiang, et al,2019; Montero, et al, 2020)が既に報告されている。急性期移植を行った rcMSCs はその高い神経栄養因子の発現を介し、急性期脊髄損傷組織において抗炎症・抗細胞死作用を発揮することで、脊髄損傷による組織破壊を抑制し、高い神経機能回復や最終的な脊髄組織における Cavity rate の縮小につながったものと考えた。

rcMSCs は豊富な神経栄養因子を分泌する能力を持ち、SCI 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 は脊髄損傷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。今後はヒト頭蓋骨由来 MSCs を用いた臨床応用が期待される。