

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

間 淑 郎

専攻分野： 再生医学・免疫病態医学

コ ー ス：

指導教授： 鈴木 登

主論文の題目：

SDF1/CXCR4 Contributes to Neural Regeneration in Hemiplegic Mice with a Monkey ES-cell-derived Neural Graft

(カニクイザル胚性幹細胞移植した片麻痺モデルマウスにおける神経の再生におけるSDF1/CXCR4の関与)

共著者：

Manae S. Kurokawa, Shunmei Chiba, Mamoru Tadokoro, Toshio Imai, Yasushi Kondo, Norio Nakatsuji, Tomoko Suzuki, Takuo Hashimoto, Noboru Suzuki

緒言

脳梗塞に代表される脳の損傷は不可逆性の疾患であり、現在、根治的な治療法はない。しかし外来性に神経細胞を移植することにより、機能を回復できる可能性がある。我々は霊長類であるカニクイザル Embryonic stem (ES) 細胞から神経前駆細胞を誘導して大脳皮質損傷モデルへ移植し、運動機能の回復を検討した。また損傷後の脳組織を経時的に解析し、移植した神経前駆細胞が、傍側脳室から損傷部へと移動することを見い出したので報告する。

方法・対象

C57BL/6 マウスを用い、左前頭葉 運動領域に液体窒素で凍結損傷を加え、右片麻痺モデルを作成した。損傷後7日目に、カニクイザル ES 細胞をレチノイン酸 (RA) 処理し神経前駆細胞へと誘導した細胞を、側脳室近傍に移植した。移植後の運動機能を Rota rod test と Beam walking test で評価した。移植脳は経時的に回収し免疫染色を行い、

組織学的に神経再生の評価をした。なお本研究は聖マリアンナ医科大学動物実験委員会(承認番号 TG070921-2 号)の承認を得たものである。

結果

運動機能の Beam walking test では、移植後 14 日以降から対照の未分化 ES 移植群または PBS 注入群との差が見られ、28 日目では、RA 処理細胞移植群で有意に運動機能の回復が認められた (analysis of variance (ANOVA) 法 $P < 0.005$)。Rota rod test では、同様に移植後 14 日以降から対照の未分化 ES 移植群または PBS 注入群との差が見られ、28 日目では PBS 注入群との差が有意差をもって運動機能を回復したことを示した (ANOVA 法 $P < 0.01$)。脳内の組織学的変化を、経時的に解析したところ、HE 染色では、移植後 3 日目に、移植細胞は移植部にとどまり、細胞の凝集塊を形成していた。サル細胞と交差反応する抗ヒト核たんぱく抗体と神経細胞で発現する neurofilament M (NFM) で二重染色した結果では、一部には比較的短い NFM 陽性の軸索突起を認めた。これが移植後 7 日目になると細胞の集団は大半が脳梁付近に移動し始め、より多くの細胞が NFM 陽性となり、3 日目よりさらに長い軸索突起を持つ移植細胞が認められた。14 日目に NFM 陽性の移植細胞は、脳梁部から皮質の深部に多く認められ、点在する傾向を示した。また、一部の細胞ではシナプトフィジン陽性であり、神経ネットワークを再構築し始めていることが示唆された。21 日目では、長い軸索突起を持つ移植細胞が、脳表の損傷部を埋め尽くすように多数存在しており、移植細胞が、側脳室近傍から損傷部脳表まで、移動したことが明らかとなった。RT-PCR 法では、サル ES 細胞を RA 処理した細胞は CXCR4 のみを発現され、脳損傷部では SDF-1 が特異的に発現し、損傷部に向かってこの CXCR4 を発現した移植細胞が移動していく可能性が考えられた。移植後の RA 処理細胞ですが、CXCR4 を発現し、損傷脳では、損傷領域から脳梁にかけてのみ特異的に SDF-1 が発現していた。同様の損傷マウスの移植後、CXCR4 受容体アンタゴニストである AMD3100 では 7 日目、14 日目共に移植部にとどまり、移動しなかった。

考察

我々は以前カニクイザル ES 細胞の移植について報告した。神経細胞は変麻痺のマウスの機能的な改善を認められた。移植された細胞は、移植細胞と宿主細胞の間でシナプス形成、およびネットワークの再生を施すシナプトフィジン蛋白を発現していた。脳内の組織学的変化を経時的に解析した結果では、NFM 陽性の軸索突起を認め細胞が移動し始めた。脳梁部から皮質の深部に多く認められ、脳表の損傷部を

埋め尽くすように多数存在しており、移植細胞が側脳室近傍から損傷部脳表まで、移動したことが明らかとなった。この遊走に関わっている分子機構は、脳損傷部では SDF-1 が特異的に発現し、脳損傷部に向かってこの CXCR4 を発現した移植細胞が移動していくのではないかとということが考えられた。以上より、側脳室近傍に移植された RA 処理細胞は CXCR4 により、損傷で発現した SDF-1 の濃度勾配を感知して、脳梁を通り損傷部脳表へと移動することが示唆された。

結語

1. カニクイザル ES 細胞を RA 処理し、神経前駆細胞へと分化誘導して、それらを側脳室近傍に移植することで、大脳皮質損傷マウスの運動機能の回復が認められた。
2. 損傷脳では SDF1 が発現され、移植した神経前駆細胞はその受容体 CXCR4 を表現して、損傷部皮質に広く分布した。