

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

太田 有紀

専攻分野：臨床薬理学

コース：

指導教授：松本 直樹

主論文の題目：

Intravenous Infusion of Adipose-Derived Stem/Stromal Cells Improves Functional Recovery of Rats with Spinal Cord Injury.

(脂肪組織由来幹細胞の静脈内投与は脊髄損傷ラットの機能回復を改善させる)

共著者：

Akemi Hamaguchi, Masanori Ootaki, Minoru Watanabe, Yuko Takeba, Taroh Iiri, Naoki Matsumoto, Mitsuko Takenaga

緒言

脊髄が損傷すると、脳からの情報が正確に伝わらず、障害部位以下の運動、知覚、自律神経機能が著しく障害される。根本的な治療法は確立されていないが、近年、細胞移植により損傷した脊髄を再生させる試みが盛んに研究され、新たな治療法として注目されている。我々は、移植細胞の供給源として脂肪組織に着目してきた。脊髄損傷 (Spinal Cord Injury: SCI) に対する細胞移植方法の一つとして、損傷脊髄への直接注入があるが、脊髄に追加的な損傷を加える危険性がある。そこで本研究では、より少ない負担で、比較的多くの細胞数の移植を可能とする静脈内投与に着目し、外傷性 SCI モデルラットに対する経静脈的な脂肪組

織由来幹細胞 (Adipose-Derived Stem/Stromal Cells: ASCs) 移植の効果を検討した。

方法

ラット皮下脂肪組織から ASCs を単離・培養し、その細胞特性 (細胞倍化時間、mRNA 発現、サイトカイン分泌) を解析した。

麻酔下、ラットの脊髄に一定重量の負荷 (25 mm の高さから 10 g の錘を落下) を与え、後肢に運動機能障害を呈する SCI モデルを作製した。損傷 8 日目、24 時間 basic fibroblast growth factor (bFGF) 添加培地で培養した 2 継代目の ASCs (P2-ASCs、 2.5×10^6 cells)、あるいは対照として生理食塩水を尾静脈より投与し、障害を受けた後肢運動機能を Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) スコアを用いて、経時的に評価した。運動機能評価後、脊髄組織切片を作製し、組織学的に評価した。

ASCs の生着あるいは体内動態について、green fluorescent protein (GFP) 発現 ASCs、あるいは ^3H -thymidine 標識した ASCs を用いて解析した。また、脊髄および血液で変動する因子について、抗体アレイを用いてスクリーニングし、ELISA 法により解析した。

上記の方法により得られた結果をふまえ、ASCs (2.5×10^6 cells)、好中球走化性因子 (Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant-1: CINC-1、 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$)、あるいは生理食塩水を尾静脈より投与し、後肢運動機能を評価した。処置後、脊髄組織からタンパク質を抽出し、glial fibrillary acidic protein (GFAP)、glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)、mitogen-activated protein kinase (MAPK) の一つである extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) 1/2 ならびに Akt の発現、また、ERK1/2 および Akt のリン酸化について Western blot 法により検出した。

なお本研究は、聖マリアンナ医科大学動物実験規程に従い、聖マリアンナ医科大学動物実験委員会の承認を得て実施した。統計解析は、JMP12

を用い、2群の比較は、Studentの*t*検定、あるいはMann-Whitneyの*U*検定、多重比較は、Dunnett法、Tukey-Kramer法、あるいはSteel-Dwass法により検定を行った。また、 $P < 0.05$ を統計的に有意であると判断した。

結果

継代にともない細胞倍化時間は延長し、神経幹細胞マーカーであるnestinのmRNA発現に減少が認められた ($P < 0.01$)。また、bFGFはASCsからの肝細胞増殖因子の分泌を増加させた ($P < 0.01$)。これらの結果から、bFGF処置したP2-ASCsを移植細胞として使用することとした。

SCIラットに対して経静脈的にASCsを移植すると、移植後早期からBBBスコアは増加し、対照群に比較して有意に後肢運動機能の回復が促進し ($P < 0.01$)、ASCs移植群の脊髄組織では、損傷空洞部の減少が認められた ($P < 0.01$)。移植8週間後の損傷脊髄内にGFP陽性細胞は検出されなかったが、静脈内投与後のASCsは徐々に損傷脊髄に集積する傾向を示し、同じ中枢神経系である脳に比較して、その移行性は顕著に高かった ($P < 0.05$)。

運動機能回復の促進に影響を与える因子として、ASCs移植後に変動する因子に着目したところ、CINC-1を見出した。その発現は、脊髄、血液ともにASCs移植数時間後、一過性に上昇することが明らかになった ($P < 0.01$)。

CINC-1の発現は、健常ラットに比較して損傷5時間後の脊髄では150倍以上に増加することが確認された。一方、ASCs移植3時間後の脊髄CINC-1の増加は10倍以下であり、その上昇の程度は損傷直後の増加に比較して小さいものであった。また、ASCs培養液中にもCINC-1の分泌が認められ、bFGF添加によりその増強が認められた ($P < 0.01$)。

SCIラットに対してCINC-1を静脈内投与したところ、ASCsの移植と同様に、対照群に比較して有意に後肢運動機能の回復を促進させた

($P < 0.01$)。運動機能評価後の ASCs 移植群の脊髄では、GFAP ならびに GDNF の発現が増加した。また、ASCs 移植群および CINC-1 投与群において ERK1/2 のリン酸化、ASC 移植群において Akt のリン酸化の亢進が認められた。

考察

経静脈的な移植では、損傷脊髄での ASCs の長期生存は困難であることが示唆されたが、移植後早期から後肢運動機能の回復は促進した。ASCs 移植による治療メカニズムの一つとして、ASCs 由来の液性因子が関与すると考えられており、本研究でも、従来炎症の指標とされる CINC-1 が、MAPK を活性化し、運動機能回復の促進に関与する可能性が示された。急激な上昇あるいは過剰量の CINC-1 は損傷を拡大させ、一方、中程度の上昇はむしろ機能回復につながる可能性が考えられた。同時に、ASCs は Akt を活性化させることが明らかになった。Akt および MAPK は細胞内生存シグナルであり、それらの活性化が損傷脊髄に対して神経保護的に作用し、後肢運動機能の改善につながった可能性が考えられた。

結論

本研究から、SCI ラットに対する経静脈的な ASCs の移植は、障害を受けた後肢運動機能の回復を促進させることが明らかになった。その作用機序は、一部は CINC-1 を介して生存シグナルを活性化させ、神経保護的に作用し、結果として後肢運動機能の改善につながった可能性が考えられた。