

学位論文題名

Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells (BMSCs) after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice

(マウス脳梗塞および脊髄損傷モデルに対する骨髄間質細胞移植)

学位論文内容の要旨

【研究目的】骨髄間質細胞 (Bone marrow stromal cells ; BMSCs) は移植した組織特有の細胞に分化する能力を有し、移植細胞として注目を集めている。また中枢神経再生において BMSCs が生体内および生体外いずれの環境においても神経細胞などへ分化することが明らかになっている。本研究ではマウスの中大脳動脈永久閉塞による脳梗塞モデルおよび脊髄損傷モデルへ BMSCs を移植し移植細胞の病巣への遊走と神経細胞などへの分化を確認することを目的とした。マウス脳梗塞モデルおよび脊髄損傷モデルに対してマウス BMSCs を移植し中枢神経再生を確認した実験は本研究が初めてである。

【実験方法】

〔マウス BMSCs の採取〕 5-8 週齢の C57BL/6 系統マウスから BMSCs を採取した。頸椎脱臼にて安楽死させ 70% アルコールにて消毒した。マウスの大腿骨両端を切断後、骨髄に 21 ゲージの注射針を挿入し 10% ヘパリン入り培養液を注入して骨髄を採取した。培養液の交換は週 3 回行なった。

〔フローサイトメトリーによる BMSCs の確認〕 初期培養において BMSCs は培養フラスコの底に付着し造血幹細胞から分離することが可能である。培養細胞が BMSCs であることの確認のためフローサイトメトリーを行ない CD34, CD45, CD90 および Sca-1 に対する表面抗原を調べた。

〔脳梗塞モデルの作製〕 イソフルレンにて吸引麻酔を行ない十分な麻酔深度に達したことを確認した後、右側頭骨に約 2mm の骨窓を設け手術顕微鏡下でバイポーラー摂子にて中大脳動脈を凝固し脳梗塞を作製した。

〔脊髄損傷の作製〕 イソフルレンにて吸入麻酔を行ない第 10 胸椎椎弓切除後、ニューマチックインパクトデバイスを用いてインパクトの速度を 2m/s, 衝撃時のインパクトの硬膜からの深さを 0.25mm に設定して不完全脊髄損傷を作製した。

〔マウス BMSCs の移植〕 BMSCs の蛍光標識のため移植 24 時間前に 1 μ g/ml のビスベンザマイド (Hoechst 33045) を培養液に混合した。蛍光標識した BMSCs の移植は、脳に対してはブレグマから 3mm 右に骨窓を設け定位装置にて頭部を固定し 5 μ l のハミルトンシリンジ針を硬膜から 4mm の深さまで挿入し線条体に速度 1 μ l/min で 5 μ l (5 \times 10³ 個) 注入した。また脊髄に対しては脊髄損傷部位から 2mm 頭側で硬膜から 1mm の深さに 1.5 μ l (1.5 \times 10³ 個) の細胞液を 0.5 μ l/min の速度で移植した。対照群 (n=2) として Balb/c 系統マウスの正常脳に移植し多。実験群として Balb/c 系統マウスで作製した脳梗塞マウス (n=4) に脳梗塞 24 時間後に移植し、C57BL/6 系統マウスで作製した脊髄損傷マウス (n=3) に脊髄損傷 7 日後に移植した。

〔病理組織学的評価〕 BMSCs 移植 28 日目にイソフルレンによる吸入麻酔下に開胸後 23 ゲージ針を左心室より

上行大動脈に挿入しヘパリン入り生理食塩水を約 20ml 点滴した。次に右心房を切開して脱血した後に 4%ホルマリンを約 60ml 点滴し灌流固定を行ない脳および脊髄を採取し、 -80°C の液体窒素にて凍結固定した。5 μm の厚さで切片を作製し 4 種類の蛍光免疫染色 (GFAP, MAP2, NeuN, Doublecortin(DCX)) を行なった。

【結果】

〔フローサイトメトリーによる BMSCs の確認〕採取時に円形であった BMSCs は 2-3 回、継代培養した後に均一な紡錘形の細胞に変化していた。フローサイトメトリーでは CD34 は陰性、CD45 は低レベル、CD90 および Sca-1 は高レベルに発現しており培養細胞の大部分が非造血幹細胞以外の BMSCs であることが確認できた。

〔マウス正常脳に移植した BMSCs の分化〕BMSCs 移植 4 週後の組織学的検査で BMSCs は移植部位である線条体を中心として生着し移植部位から離れた視床においても確認できた。蛍光免疫染色では移植した BMSCs の一部が神経細胞表面マーカーである NeuN, MAP2 および DCX で陽性であったがアストロサイトの表面マーカーである GFAP では陰性であった。

〔脳梗塞マウスに移植した BMSCs の分化〕移植 4 週後の組織学的検査で BMSCs は損傷した大脳皮質および脳梁に遊走していた。蛍光免疫染色では遊走していた BMSCs の一部は NeuN, MAP2 および DCX で陽性であったが GFAP では陰性であった。

〔脊髄損傷マウスに移植した BMSCs の分化〕移植 10 日目および 4 週目の組織学的検査で BMSCs は移植部位に生着しほとんどの細胞が GFAP 陽性であった。

【考察】今回の研究では、脳に移植した BMSCs が神経細胞に分化したことが確認できた。マウスの脳梗塞および脊髄損傷において移植した BMSCs が損傷部位に遊走する要因として損傷を受けた組織に発現する MCP-1 の関与が報告されている。

成体ラット脊髄由来の神経幹細胞を海馬の歯状回に移植し、それが神経細胞へ分化しするが、脊髄に移植した場合はアストロサイトへ分化したとの報告がある。神経幹細胞を脊髄に移植した場合にアストロサイトへ分化した原因は不明であるが、脊髄損傷後に CNTF の発現が増加するとの報告から CNTF が移植細胞をアストロサイトに分化させる重要な因子であると考えられる。

移植した細胞を標識する方法としてブロムデオキシブリジン (BrdU)、 β -ガラクトシダーゼ、グリーンフルオレセンスプロテイン (GFP) および Y クロモゾームなどがある。BrdU の場合、細胞培養を繰り返し行なうと標識能が徐々に低下することが知られている。また遺伝子操作による β -ガラクトシダーゼおよび GFP、またハイブリダイゼーションによる Y クロモゾームによる標識は技術的に容易ではない。その点ビスベンザマイドは細胞毒性が低く細胞分裂に関与する DNA, RNA およびクロマチンに悪影響を与えないといった利点がある。しかし生体外でのビスベンザマイドの染色パターンと移植後の宿主内での染色パターンは同一ではなかった。これは移植細胞の分裂、凍結による標本作製およびコンピューター上での画像処理が影響していると考えられた。

中枢神経系への幹細胞移植に関する多数の報告があるが、移植した細胞の生理学的な機能についての報告はない。神経機能の回復が移植細胞の神経細胞へ分化した結果なのか、または移植された神経組織に対する移植細胞の神経栄養因子の生産および保護作用によるものなのかは不明である。ただし移植した BMSCs と移植を受けた中枢神経組織との相互作用が神経栄養因子の生産を誘導しさらに損傷した中枢神経組織の機能回復に関係していると考えられる。BMSCs はインターロイキンなどの様々なサイトカインを分泌する。これらサイトカインの一部が神経細胞への分化、増殖に重要な役割をしていることが明らかとなっておりこれらが中枢神経再生を促進すると考えられる。

【結語】マウス脳梗塞モデルおよび脊髄損傷モデルに対するマウス BMSCs 移植が中枢神経再生に使用可能であることが確認できた。また移植細胞の標識としてビスベンザマイドは移植細胞の遊走および分化を評価するために非常に簡便で有用な方法であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 佐々木 秀 直

副 査 教 授 岩 崎 喜 信

学 位 論 文 題 名

Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells (BMSCs) after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice

(マウス脳梗塞および脊髄損傷モデルに対する骨髄間質細胞移植)

骨髄間質細胞 (Bone marrow stromal cells; BMSCs) は移植細胞として注目されており BMSCs が生体内外いずれの環境においても神経細胞などへ分化することが明らかとなっている。本研究ではマウス脳梗塞モデルおよび脊髄損傷モデルへ BMSCs を移植し移植細胞の遊走と神経細胞などへの分化を確認することを目的とした。

対象および方法は 5-8 週齢の C57BL/6 系統マウスを用いた。大腿骨両端を切断し骨髄腔に注射針を挿入し BMSCs を採取した。培養液は週 3 回の交換した。フローサイトメトリーにて CD34、CD45、CD90 および Sca-1 を測定し培養細胞が BMSCs であることを確認した。マウス脳梗塞モデルは吸入麻酔後右側頭骨に骨窓を設け双極性電気凝固器にて中大脳動脈を凝固し脳梗塞を作製した。脊髄損傷は吸入麻酔後ニューマチックインパクトデバイスを用いて不完全脊髄損傷を作製した。BMSCs の蛍光標識のため移植 24 時間前に 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のビスベンザマイドを培養液に混合した。蛍光標識した BMSCs の移植は、脳梗塞に対してはブレグマから 3 mm 右に骨窓を設けて 5 μl のハミルトンシリンジ針を硬膜から深さ 4 mm まで挿入し線条体に速度 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ で 5 μl (5×10^3 個)で注入した。脊髄に対しては脊髄損傷部位から 2 mm 頭側で硬膜から深さ 1 mm に 1.5 μl (1.5×10^3 個)の細胞液を速度 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ で移植した。対照群 ($n = 2$) として Balb/c 系統マウスの正常脳に移植した。実験群として Balb/c 系統マウスで作製した脳梗塞マウス ($n = 4$) に脳梗塞 24 時間後に移植し、C57BL/6 系統マウスで作製した脊髄損傷マウス ($n = 3$) に損傷 7 日目に移植した。BMSCs 移植 28 日目に吸入麻酔後、灌流固定を行い脳および脊髄を採取し液体窒素にて凍結保存した。5 μm の厚さで切片を作製し 4 種類の蛍光免疫染色 (GFAP, MAP2, NeuN, Doublecortin) を行った。

結果は、フローサイトメトリーでは CD34 は陰性、CD45 は低レベル、CD90 および Sca-1 は高発現しており培養液の大部分が BMSCs であることが確認できた。マウス正常脳における BMSCs の分化は移植 28 日後の病理学的検査で BMSCs は移植部位である線条体を中心として生着し移植部位から離れた視床においても確認できた。蛍光免疫染色では移植した BMSCs の一部が神経細胞表面マーカーである MAP2, NeuN および

Doublecortin で陽性であったがアストロサイトのマーカーである GFAP は陰性であった。脳梗塞マウスにおける BMSCs の分化は移植 28 日目の病理学的検査で BMSCs は損傷した大脳皮質および脳梁に遊走していた。蛍光免疫染色では MAP2, NeuN および Doublecortin で陽性であったが GFAP は陰性であった。脊髄損傷マウスにおける BMSCs の分化は移植 10 日目および 28 日目の病理学的検査で BMSCs は移植部位に生着しほとんどの細胞は GFAP 陽性であった。

以上、本研究の結果からマウス脳梗塞モデルおよび脊髄損傷モデルに対するマウス BMSCs 移植が中枢神経再生に使用可能であることが確認できた。また移植細胞の標識としてビスベンザマイドは移植細胞の遊走および分化を評価するために非常に簡便で有用な方法であると考えられた。

公開発表において佐々木秀直教授から脳梗塞と脊髄損傷で移植時期を変えた理由・BMSCs の最適な移植時期について等の質問があった。次いで岩崎喜信教授から移植した BMSCs が脳梗塞では神経細胞に、脊髄損傷ではアストロサイトに分化した理由・BMSCs 移植群とコントロール群との機能的差について質問があった。さらに長嶋和郎教授から脳梗塞に移植した BMSCs で NeuN 陰性であった細胞について・MAP2 陽性であった細胞について・他の標識方法と比較してビスベンザマイドが有用な点について等の質問があった。またフローアから正常脳と脳梗塞での移植細胞の遊走能の違いについて・脊髄損傷での移植細胞の遊走の程度について質問があった。いずれの質問に関しても申請者は自らの研究に基づき経験や過去の論文の結果を引用し明確に回答した。

本研究はマウス脳梗塞モデルおよび脊髄損傷モデルに対してマウス BMSCs を移植し中枢神経再生を確認した初めての実験であり、今後の中枢神経再生における基礎的実験として貴重な研究であると考えられた。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。