

称号及び氏名 博士（獣医学） 西田 英高

学位授与の日付 平成23年3月31日

論文名 骨髄間質細胞によるイヌ脊髄損傷の治療に関する研究

論文審査委員 主査 稲葉 俊夫
副査 中村 洋一
副査 玉田 尋通
副査 杉浦 喜久弥

論文要旨

緒言

脊髄損傷とは強い外力が加えられることにより、脊髄に損傷を受ける病態をいう。脊髄の損傷部位により症状は異なるが、重度の場合は永続的にその機能が障害される。現在、確立している治療法は、損傷された脊髄の二次的な傷害を最小限にするための脊髄の減圧および脊椎の固定術と、残存した脊髄機能を維持するための術後のリハビリテーションである。機能の回復が困難な場合は、寝たきりの生活を余儀なくされる。

近年、成体に存在している組織幹細胞は、損傷を受けた組織を修復・再生する際の細胞供給源になっていると考えられており、再生医療へ利用し得る細胞として注目されている。Friendsteinらは、マウス骨髄中に含まれる線維芽細胞様コロニー（CFU-F）を形成する細胞集団の存在を報告し、これらの細胞は造血幹細胞（HSC）の増殖および分化を支持する細胞であることがわかった。その後 Pittenger らは、ヒト骨髄中にも同様な細胞集団があり、これらの細胞のなかに単一のコロニーから骨・軟骨・脂肪の間葉系細胞へ分化する間葉系幹細胞の存在を発見した。これ以降、骨髄から採取され、CFU-F を形成する細胞は、間葉系幹細胞とそれに由来する異なる分化段階にある雑多な細胞集団として、骨髄間質細胞（Bone marrow stromal cell: BMSC）と呼ばれるようになった。現在までに、マウスやヒトの BMSC は他の種類の細胞、すなわち肝細胞、神経細胞、および内皮細胞など胚葉を超えた細胞へ分化し得ることが報告されており、BMSC の脳脊髄液内の移植は脊髄損傷モデルラットの運動機能を促進することが報告されている。一方、獣医学領域に

においてもイヌ BMSC を用いた再生医療の実現が期待されている。

そこで本研究では、イヌ BMSC の採取および培養方法について検討するとともに、*in vitro* における BMSC の幹細胞を支持する作用について検討した。さらに、脊髄損傷イヌへの細胞移植治療を行い、その効果について検討した。

第 1 章 イヌ骨髄間質細胞の採取法と継代に伴う特性変化

イヌ BMSC の採取法を検討するとともに、培養時における増殖能や分化能の変化について調べた。ビーグル種成犬の大腿骨から灌流法および吸引法により、骨髄細胞を回収した。両法で得られた骨髄単核細胞を分離・培養後、CFU-F の形成能について測定した。CFU-F 形成細胞に誘導培地を用いて骨、脂肪、あるいは神経系細胞への分化誘導を行った。吸引法で得られた単核細胞を 1.5×10^5 cells/cm² で播種して 14 日間培養後、再度、 8×10^3 cells/cm² で播種したものを passage 1 (P1) とし、同様な処理を行って P5 まで継代培養した。各継代の細胞について、表面抗原の解析、骨および脂肪への分化誘導、増殖活性や形態的变化の観察、および老化関連マーカーである β ガラクトシダーゼ (Sa β -Gal) 染色を行った。

その結果、吸引法の CFU-F の形成率は灌流法のそれと比較して、有意に高値を示した。初代の CFU-F 形成細胞から骨および脂肪への分化を確認できた。さらに、神経系細胞への誘導を行ったものでは幼若神経細胞のマーカーである β -III-tubulin の抗体に対して陽性の細胞は認められなかったが、アストロサイトのマーカーであるグリア線維性酸性蛋白 (GFAP) の抗体に対して陽性の細胞を確認できた。採取した BMSC の表面抗原は、CD44 および CD90 陽性、CD34 および CD45 陰性であり、これらの発現について継代による変化は見られなかった。骨および脂肪細胞への分化能は P2 まで維持された。BMSC の増殖能は継代により、徐々に低下を示した。また BMSC は P3 あたりから形態的に扁平・大型化した。この扁平・大型細胞は Sa β -Gal 染色陽性となり、その陽性率は P4 で有意に高くなった。

以上の結果から、イヌ BMSC 採取には吸引法が効率的であることがわかった。また、イヌ BMSC は、他の動物種の BMSC と同様に CD44 および CD90 陽性であり、神経細胞へ分化させることはできなかったが、GFAP 陽性のアストロサイト様細胞、骨および脂肪細胞への分化能を有していた。また本細胞は継代を繰り返すことによって細胞老化に至るが、P2 まで骨および脂肪細胞への分化能を保持することが明らかになった。

第 2 章 骨髄間質細胞の幹細胞に及ぼす影響

BMSC の生体内の役割について、骨や脂肪細胞などの供給源となる可能性があるとともに、骨髄中において、HSC の増殖や分化を助けるとされている。そこで、本章では、BMSC を用いた細胞移植実験を行う前段階として、HSC および神経幹細胞 (NSC) の増殖や分化に対する BMSC の *in vitro* 作用について調べた。

第 1 節 骨髄間質細胞の造血幹細胞に及ぼす影響

骨髄中の HSC が増殖および分化する機構に関しては、これまでに多くの研究が行われてきたが、

BMSC との関係については未だ十分には明らかにされていない。現在、ヒトの骨髄移植においては、自己と他者を区別する標識となる主要組織適合抗原複合体クラス I (MHC-1) 分子がドナーとレシピエントで一致した場合のみ行われおり、同時にドナーの BMSC を移植すると、HSC の生着率が促進されることが報告されている。そこで本章では、自己の BMSC を細胞移植に用いる上で、免疫拒絶反応を防ぐ以外に、HSC との MHC-1 の一致の有無が BMSC の造血支持機能に影響を及ぼすか否かを検討した。

マウス BMSC の細胞株である MS-5、および MHC-1 分子を欠損したノックアウトマウス胎子骨由来の BMSC (KO BMSC) を用いた。自己の MHC と同一であることを認識させるための MHC-1 分子に対する抗体、BMSC に発現する接着分子 (血管内皮細胞接着分子-1 (VCAM-1)、フィブロネクチン) に対する抗体をそれぞれ培養液中加入してこれらの分子を刺激し、細胞の形態的变化や増殖能について調べた。また、培養上清中のサイトカイン (幹細胞成長因子 (SCF) およびインターロイキン-6 (IL-6)) 濃度を ELISA によって測定し、さらに、ウエスタンブロッティング法によりチロシンリン酸化蛋白質の検出を行った。

その結果、MS-5 において、抗 MHC-1 抗体刺激により、突起状の形態を示す細胞が有意に増加したが、抗 VCAM-1 および抗フィブロネクチン抗体刺激ではこのような変化は認められなかった。また、いずれの抗体刺激によっても、 $[^3\text{H}]$ -thymidine の取込量に有意な差は認められなかった。さらに、抗 MHC-1 抗体刺激によって培養上清中の IL-6 が有意に増加し、約 66, 77, および 185kDa のチロシンリン酸化蛋白質が有意に増加した。一方、KO BMSC においては、いずれの抗体刺激によっても形態や増殖能に有意な変化は認められなかった。

以上の結果から、自己の BMSC を用いることで、免疫拒絶反応を防ぐだけでなく、BMSC の突起状の形態的变化や IL-6 産生増強が起こり、BMSC の造血支持能がさらに高められる可能性が示唆された。

第 2 節 イヌ骨髄間質細胞の神経幹細胞に及ぼす影響

第 1 節の結果から、BMSC はサイトカイン産生を高めて神経の幹細胞へも細胞支持機能を発揮することが推測される。第 2 節では、これを確かめた。サル ES 細胞から誘導した NSC にイヌ BMSC の培養上清を添加し、神経細胞およびアストロサイトへの分化について検討した。また、イヌ BMSC 培養上清中のサイトカイン (IL-6, 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF), および腫瘍成長因子- β (TGF- β)) 濃度を ELISA によって測定した。

その結果、イヌ BMSC の培養上清の添加により、サル NSC から神経細胞およびアストロサイトへの分化誘導が促進された。また、イヌ BMSC 培養上清中の IL-6, VEGF, および TGF- β 濃度は培養時間と共に増加した。

以上のことから、イヌ BMSC は、神経細胞への分化および突起伸長に関連する IL-6, VEGF, および TGF- β などの液性因子を分泌し、神経再生に寄与する可能性が示唆された。

第 3 章 自己骨髄間質細胞によるイヌの重度脊髄損傷の治療

前章までで得られたイヌ BMSC の基礎的知見をもとに、本章では、重度脊髄損傷を伴った胸腰部椎間板ヘルニアのイヌに対して、慢性期に自己の BMSC を第 5, 6 腰椎間より脳脊髄液中へ移

植し、その治療効果について検討した。脊髓の減圧および逸脱した椎間板物質の除去手術を行い、術後1カ月の時点で感覚および運動機能に改善の認められない23例のイヌを対象とした。BMSC投与群および非投与群に分けて、術後6ヶ月間、運動および感覚機能の改善について検討した。運動機能の評価については、Texas Spinal Cord Injury Scale (TSCIS) を用いて検討した。

発症から投与までの日数は平均51.5日(30-90日)、投与細胞数は平均 4.7×10^6 ($1.7-5.6 \times 10^6$)であった。その結果、投与群は10例中6例が歩行可能となり、1例で感覚機能の改善が認められた。また、非投与群は13例中2例が歩行可能となったが、感覚機能の改善は認められなかった。投与群のTSCISのスコアは、非投与群と比較して、有意に高くなった。全症例で副作用は認められなかった。

以上のことから、重度脊髓損傷を伴った椎間板ヘルニアのイヌにおいて、手術に加えて慢性期に自己のBMSCを投与することによって、運動機能の改善が認められた。

総括

イヌBMSCの採取・培養方法と細胞特性の検討および脊髓損傷イヌへのBMSCの移植治療を行い、以下のことを明らかにした。

1. イヌBMSC採取には吸引法が効率的であることがわかった。イヌBMSCは神経細胞への分化能を有していないが、骨、脂肪細胞への分化能を有していることが示唆された。また本細胞は継代を繰り返すことによって細胞老化に至るが、P2まで骨および脂肪細胞への分化能を保持していることが示唆された。
2. 自己のBMSCを用いることで、免疫拒絶反応を防ぐとともに、BMSCの突起状の形態的变化やIL-6の産生増強が起こり、BMSCの造血支持能が促進される可能性が示唆された。
3. BMSCはIL-6、VEGF、およびTGF- β などさまざまなサイトカインを産生し、神経細胞への分化および突起伸長を促進することが示唆された。
4. BMSCの移植により、脊髓損傷イヌの運動機能が改善された。

以上、本研究の結果から、自己の骨髄間質細胞は脊髓損傷イヌの有効な治療法となり得ることが示唆された。今後、これらの技術がヒトにおける臨床試験へ応用できるものと期待される。

審査結果の要旨

脊髓損傷は、排尿・排便障害、四肢(後躯)麻痺、呼吸困難など永続的にその機能が障害される疾患である。イヌにおいては、椎間板ヘルニアによって、重度脊髓損傷を引き起こすことがある。現在、脊髓損傷に対する治療として、損傷された脊髓の二次的な傷害を最小限にするための脊髓の減圧および脊椎の固定術と術後のリハビリテーションが行われているが、重度の脊髓損傷の場合、機能回復は期待できない。そのため、新規治療法の開発が望まれて

いる。

近年、成体に存在している組織幹細胞は、損傷を受けた組織を修復・再生する際の細胞供給源になっていると考えられており、再生医療へ利用し得る細胞として注目されている。移植に利用できる細胞の中で骨髄中の骨髄間質細胞（BMSC）は間葉系幹細胞とそれに由来する異なる分化段階にある雑多な細胞集団で、胚性幹細胞のように受精卵を用いないので倫理的な問題が生じないこと、比較的容易に採取・増殖できること、腫瘍化する可能性が低いこと、さらに自己細胞を用いることで免疫拒絶を受けないことなどから臨床応用に適しているといわれている。

そこで本研究では、イヌ BMSC の採取法と継代に伴う特性変化、*in vitro* における BMSC の幹細胞に及ぼす影響、および自己 BMSC によるイヌの重度脊髄損傷の治療について検討し、以下の成果を得た。

1. イヌ BMSC の採取には大腿骨近位端に骨髄穿刺針を刺入し、シリンジで骨髄液を吸引する方法が効率的であることが明らかになった。採取した BMSC は、神経細胞への分化能を有していないが、2 継代まで骨および脂肪細胞への分化能を有しており、さらに、継代を繰り返すことによって細胞老化に至ることが明らかになった。
2. 自己の BMSC は、免疫拒絶反応を防ぐとともに、突起状の形態的变化やインターロイキン-6 (IL-6) を産生し、造血幹細胞に対する造血支持能を促進し得ることが明らかになった。
3. BMSC は神経幹細胞から神経系細胞への分化誘導を促進するとともに、神経細胞の突起伸長に関連する IL-6、血管内皮細胞増殖因子、腫瘍成長因子- β などを産生し、神経再生に寄与し得ることが明らかになった。
4. 重度脊髄損傷を伴った椎間板ヘルニアのイヌにおいて、手術に加えて慢性期に自己の BMSC を移植することにより、運動機能が改善し得ることが明らかになった。

以上のように本研究では、イヌ BMSC の採取および培養方法を確立するとともに、*in vitro* で BMSC の幹細胞に及ぼす影響を明らかにし、得られた基礎的知見をもとに、重度脊髄損傷イヌへの本細胞の移植試験の結果、本法が有効な治療法となり得ることを実証した。本研究の成果に基づく BMSC を用いた細胞治療法の開発は、獣医学の発展のみならず、ヒトの臨床応用にもつながるものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。