

論文内容の要旨

獣医学専攻
平成 28 年度博士課程入学
氏名 武田妙
指導教員名 西村亮平

論文題目

Development of regenerative medicine for subacute spinal cord injury in dogs using intravenous administration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells
(骨髄由来間葉系幹細胞の静脈投与による犬の亜急性期脊髄損傷に対する脊髄再生医療の開発)

犬では、椎間板ヘルニアや外傷を原因とした脊髄損傷 (SCI) の発生頻度が高い。従来、これらの SCI のうち重症例に対しては主に椎間板や椎体に対する外科手術が行われてきたが、損傷脊髄に対する直接的治療ではないため、機能回復が十分得られず、生涯にわたる歩行困難や排泄障害に陥る場合も少なくなかった。人ではこのような症例に対する新規治療法として、幹細胞を用いた様々な脊髄再生医療の研究が進められ、獣医療においても SCI 症例に対して適応し、一定の治療効果が得られたとする報告もある。しかし、治療効果が得られる機序や安全性についての検討はほとんど行われておらず、現状では盲目的な幹細胞投与が行われる傾向が強く、再生医療の発展の大きな障害となっている。

獣医療では、再生医療に用いるセルソースとして細胞の分離・培養の簡便さやコスト等の理由から、骨髄や脂肪組織から得られる間葉系幹細胞 (MSCs) が用いられることが多い。MSCs は、生体内で様々な組織中にわずかに含まれ、自己増殖能と骨・軟骨・脂肪などへの多分化能を有する細胞である。犬では最近、骨髄の脂肪細胞に付着する幹細胞能の高い MSCs が見出され、骨髄脂肪細胞周囲細胞 (BM-PACs: Bone marrow peri-adipocyte cells) と名付けられた。従来の骨髄由来 MSCs と比べ増殖能・多分化能に優れており、再生医療の治療戦略の幅を広げる有望な細胞材料であると期待されている。

MSCs は損傷部へのホーミング機能や組織修復・炎症抑制に寄与する液性因子の分泌能 (trophic effects) を有することで、生体組織の恒常性を維持しており、MSCs を利用した再生医療の概念は、これらの能力を利用して組織損傷の抑制あるいは修復を促し、治療効果を得ることである。脊髄損傷部では、特に亜急性期において細胞走化性因子としてケモカイン CXCL12 の発現が上昇することが知られており、マウス MSCs では受容体である CXCR4 を発現し、損傷部へのホーミングを示すことが明らかになっている。犬 MSCs にお

ける CXCR4 発現や CXCL12 に対する走化性の報告はないが、CXCR4- CXCL12 を軸としたホーミングが可能であれば、静脈投与などの全身投与でも損傷部へ MSCs が到達でき、汎用性の高い移植法となることが期待される。さらに、投与した MSCs が trophic effects をもてば、神経再生や炎症が波及した周囲の脊髄組織における神経保護あるいは血管新生作用なども期待できる。

一方、MSCs を用いた脊髄再生医療をより有効に実施するためには、SCI の病期や病態の正確な把握も重要となる。SCI は機械的損傷による一次損傷と、その後の炎症に伴う二次損傷からなるが、炎症は急性期から亜急性期にかけ沈静化し、亜急性期から慢性期にかけて軸索再生阻害因子であるグリア瘢痕の形成が進行する。したがって、亜急性期は炎症やグリア瘢痕の影響が少なく、MSCs が生着しやすいと考えられる。前述のように、ホーミング効果も得られやすいと期待されるため、脊髄再生医療の最も良いターゲット期と考えられる。

以上から、本研究では、犬の亜急性期 SCI をターゲットとした安全で効果的かつ汎用性の高い脊髄再生医療の開発を目標とし、まず、犬 MSCs として BM-PACs を使い、CXCR4- CXCL12 を軸としたホーミング機能を評価し（第 1 章）、神経栄養因子や血管新生因子の発現および分泌能から trophic effects について *in vitro* で評価した（第 2 章）。次に、ヌードマウス亜急性期 SCI モデルへの静脈投与を行うことで、*in vivo* でホーミング機能を評価し、組織学的修復と運動機能回復の評価から trophic effects を介した治療効果が得られるかを検討した（第 3 章）。最後に、SCI の代替として皮膚損傷を作製した健常ビーグル犬に対して、CXCL12 発現が上昇することが知られている損傷 10 日後に自己 BM-PACs の静脈投与を行い、生体における安全性の評価を行うとともに、BM-PACs の損傷部へのホーミング機能を評価した（第 4 章）。

第 1 章では、BM-PACs の CXCR4 発現および CXCL12 に対する走化性を評価した。MSCs の機能を明確にするため、対照として non-stem な間葉系細胞である皮膚線維芽細胞（Dermal fibroblasts; DFs）を用いた。免疫細胞染色および CXCL12 に対するケモタキシンアッセイの結果、いずれの細胞も CXCR4 を発現し CXCL12 濃度依存的な走化性を示した。したがって、これらの細胞は SCI 亜急性期に対する静脈投与により損傷部へのホーミングが期待出来ると考えられた。

第 2 章では、BM-PACs と DFs における神経栄養因子（NGF、BDNF）および血管新生因子（VEGF、HGF、CTGF、FGF-2、PDGF）の発現量を定量的 PCR を用いて検討した。その結果、VEGF の発現量に有意差がみられ、ELISA による評価においても BM-PACs は有意に高い VEGF 分泌能を示した。さらに、各細胞の馴化培地でヒト臍帯血由来血管内皮細胞を用いた tube formation assay を行ったところ、BM-PACs の馴化培地が有意に血管新生を促進したことから、BM-PACs は VEGF 分泌を介した血管新生効果を示すことが期待された。

第3章では、ヌードマウス亜急性期 SCI モデルに対して BM-PACs および DFs の静脈投与を行い、損傷部へのホーミング機能と、血管新生を含めた組織修復効果および運動機能回復効果を評価した。ヌードマウス第10胸椎レベルの脊髄に重度圧挫傷を作製し、亜急性期である損傷10日後に蛍光標識した BM-PACs および DFs を静脈投与した。また、対照として培地のみ投与する無治療群も設定した。その後、In Vivo Imaging System (IVIS) を用いて体内における細胞の局在を観察した。その結果、BM-PACs、DFs とも投与翌日には脊髄損傷部での蛍光が認められ、1週後に蛍光強度がピークとなった。ピーク時の蛍光強度は両細胞間で差はなかった。損傷部での蛍光は2週後には減退し、3週後にはほぼ消失した。また、BM-PACs の投与と同時に CXCR4 阻害薬を投与したところ、損傷部における蛍光強度の有意な減少が見られた。一方、運動機能は BM-PACs 投与群でのみ、投与1週間後から無治療群に対して有意な運動機能促進が認められ、損傷4週間後には歩行可能なレベルまで回復した。投与6週後に損傷部を含めた脊髄組織の組織学的評価を行った結果、BM-PACs 投与群で血管数、脊髄白質量、残存軸索量の有意な増加がみられた。また、損傷中心部において、軸索再生マーカーである GAP43 の発現を定量した結果、BM-PACs 投与群で再生軸索の有意な増加がみられた。これらの結果から、亜急性期 SCI に対して BM-PACs を静脈投与することで、CXCR4-CXCL12 軸を介して損傷部へホーミングし、治療効果を発揮すると考えられた。また、DFs 投与群では十分な血管や軸索の再生と運動機能回復がみられなかったことから、VEGF 分泌能の差が治療効果に影響を与えた原因であると考えられた。VEGF と血管新生の直接的な関連は明らかにはならなかったが、BM-PACs による血管新生作用が、損傷部における栄養や酸素供給を促進し、神経保護および再生に寄与することで、機能回復が得られることが示唆された。

第4章では、犬で皮膚損傷を作製し、蛍光標識した BM-PACs を損傷10日後に静脈投与し、IVIS を用いて損傷部へのホーミング機能を評価した。同時に BM-PACs に超磁性体も取り込ませ、MRI を用いたホーミング機能の評価が可能かについても検討した。BM-PACs 投与1週間後まで、定期的に身体検査、血液検査、X線検査、CT検査を行ったが、アナフィラキシー反応や細胞塞栓等を疑う有害事象はみられず、自己 BM-PACs 投与の安全性が示された。また、投与1週間後に損傷部へのホーミング機能が IVIS により確認されたが、MRI による評価では検出が困難であった。

以上の結果から、犬骨髄由来 MSCs である BM-PACs は亜急性期 SCI に対して CXCR4-CXCL12 軸によるホーミング機能と VEGF 分泌による trophic effects を介して、組織学的修復および運動機能回復促進効果を持つ可能性が示唆された。また、犬における自己 BM-PACs 静脈投与の安全性が示されたことから、脊髄損傷後早期に深部痛覚の消失を示すなど、重度 SCI と診断された症例では骨髄を採取して BM-PACs を培養しておき、術後の機能回復が十分でない場合、培養 BM-PACs 静脈投与を行うことで、従来の治療法では得られなかった高い治療効果が得られることが期待された。今後は、有効性と安全性

を両立可能な細胞数の上限の決定や、複数回投与の有効性と安全性の検証などを通し、より効果的な治療プロトコルの確立を進める必要がある。