脊髄損傷に対する模擬微小重力培養骨髄間質細胞移植

武田正明*¹ 籾 拓郎*¹ 河原裕美*² 弓削 類*² 栗栖 薫*¹

目的および背景

骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cells : BMSCs) は採取時の低侵襲性や自家移植が可能な点から再生医療の重要なソースと考えられており、中枢神経障害に対する BMSCs 移植の有効性が報告されている。虚血曝露された海馬スライスの細胞死抑制、低酸素下における血管新生因子産生や、神経栄養因子を産生することにより損傷した中枢神経の保護・修復を行っていることが明らかとなっている。また、脳挫傷モデルラットへの未分化 BMSCs 経静脈移植により運動機能が改善することが報告されている。

脊髄損傷モデルに対する BMSCs 移植が神経症状改善に有用であるとする報告も多く、脊髄損傷周囲部への移植 BMSCs の遊走・生着や NGF, NT-3 などの成長因子高発現が確認されている。BMSCs の移植ルートも多様であるが、経静脈投与による移植は非侵襲的で安全であり、期待される方法である。

近年、重力環境の変化に伴う生体反応が *in vitro*, *in vivo* で研究されており、微小重力環境では細胞分化が抑制され、未分化状態が維持されることが明らかとなっている。そこで、脊髄損傷モデルラットに対し、模擬微小重力環境培養を行った BMSCs を経静脈的に移植し、その効果について検討を行った。

方法

5 週齢 Fisher F344 ラット骨髄より採取した骨髄細胞を接着培養し、BMSCs を得た。模擬微小重力環境を得るには、3D-clinostat (三菱重工業) を使用した。3D-clinostat とは、直交二軸のまわりに試料を 360 度回転させることにより $10^{-3}G$ の微小重力環境を模擬的に作り出

す装置である。Weight drop method で作製した脊髄損傷ラットに、模擬微小重力下培養と通常 (1 G) 培養を行った BMSCs をそれぞれ移植し、運動機能、移植後の細胞分布、アポトーシス関連蛋白発現の比較を行った。細胞移植は脊髄損傷作製直後に行い、尾静脈より 3.0×10^6 個の BMSCs を移植した。

結果

- 1) 微小重力曝露による BMSCs の変化 : 7 日間の模擬微小重力曝露により、未分化マーカーである Oct-4、細胞遊走因子受容体である CXCR4 の発現増強が RT-PCR で確認された。また、CXCR4 発現は蛍光免疫染色でも有意に増強していた (Fig. 1 a, b)。
- 2) 運動機能 : 模擬微小重力曝露細胞移植群は、BBB score, inclined plane test のいずれにおいても 1 G 培養細胞移植群に比して早期より良好な回復を示した (Fig. 2)。
- 3) 損傷局所への細胞分布 : PKH-26 で移植細胞を標識して評価した。模擬微小重力曝露細胞は、通常培養細胞に比して損傷部周囲への強い集積が認められた。また、両群ともに損傷局所において移植細胞由来 GFAP の発現が確認された (data not shown)。
- 4) 模擬微小重力曝露細胞移植群において、脊髄損傷部におけるアポトーシス抑制因子である survivin 発現が増加し、アポトーシス促進因子である Bax の発現は抑制されていた (Fig. 3)。

考察

本研究では、模擬微小重力曝露 BMSCs 移植が脊髄損傷モデルラットの運動機能改善に寄与するかどうかを検

"Transplantation of Bone Marrow Stromal Cells Cultured under Simulated Microgravity into a Spinal Cord Injured Rat"

Masaaki Takeda, M. D., Ph. D.*¹, Takuro Magaki, M. D., Ph. D.*¹, Yumi Kawahara, Ph. D.*², Louis Yuge, RPT, Ph. D.*², Kaoru Kuri-su, M. D., Ph. D.*¹

*¹ 広島大学大学院医歯薬学総合研究科脳神経外科学 / 〒734-8551 広島市南区霞 1-2-3 [連絡先: 武田正明]

Address reprint requests to: Masaaki Takeda, M. D., Department of Neurosurgery, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima-shi, Hiroshima 734-8551, Japan

*² 広島大学大学院保健学研究科生体環境適応科学研究室

a | b

Fig. 1 Exposure to simulated microgravity induced characteristics change in BMSC

RT-PCR demonstrated exposure of BMSCs for 7 days to simulated microgravity enhanced expression of Oct-4 and CXCR4 (a). Enhanced expression of CXCR4 was confirmed by both RT-PCR and immunofluorescent staining (a, b).

1G : culture BMSCs under normal 1G environment, MG : exposed BMSCs to simulated microgravity, * : $p < 0.01$.

Fig. 2 Analysis of locomotor recovery as measured by BBB scores and inclined plane method

Transplantation of BMSCs cultured under simulated microgravity significantly improved motor function.

Cont : control group, 1G : transplantation of BMSCs cultured 1G environment, MG : transplantation of BMSCs cultured under simulated microgravity, * : $p < 0.05$, † : $p < 0.01$.

Fig. 3 Expression of apoptosis related proteins on the periphery of the lesion

Survivin expression was significantly enhanced in both 1G and MG groups compared to control group. Bcl-2 expression was significantly suppressed in MG group compared to both control and 1G groups.

* : v. s. Control group ($p < 0.01$), # : v. s. 1G group ($p < 0.05$), † : v. s. Control group ($p < 0.05$).

討した。1 G 環境下で BMSCs を培養した場合、未分化マーカーである Oct-4 の mRNA 発現はほとんどみられなかったが、模擬微小重力に曝露することにより Oct-4 の発現が認められた。このことにより、模擬微小重力環境下での培養は、BMSCs の未分化性を維持させている可能性が示唆された。

BMSCs の移植ルートとして、直接移植、髄腔内投与、経静脈投与が試みられている。経静脈投与は移植効率、神経症状の改善に関してはほかの方法に劣るが、非侵襲的、簡便である点から期待されている手法である。

BMSCs の病変周囲への遊走に、細胞遊走因子受容体である CXCR4 が重要な役割を果たしていることが、マウス脳梗塞モデルに対する BMSCs 移植で明らかとなっている。BMSCs を模擬微小重力に曝露することにより CXCR4 の発現増強、損傷部位への集積増加が認められた。このことから、模擬微小重力曝露は経静脈移植の細胞移植効率改善に寄与したと考えられる。

微小重力曝露細胞を移植されたラットは、早期より 1 G 培養細胞移植群に比して有意に運動機能が改善することが確認された。本研究では、脊髓損傷局所において移植細胞由来の GFAP 発現が確認されており、これらの細胞から NGF や BDNF などの神経栄養因子分泌により神経細胞の二次的損傷が抑制された可能性がある。また、

模擬微小重力曝露 BMSCs 移植により、脊髓損傷部においてアポトーシスが抑制されていることが survivin, Bcl-2 の免疫染色により明らかとなった。

以上より、模擬微小重力に曝露することにより BMSCs の損傷局所への遊走能が向上し、損傷局所でグリア細胞に分化したことでアポトーシスによる二次損傷が抑制され、運動機能改善に寄与したと考えられる。

今後の検討課題としては、①移植方法、②移植タイミング、③損傷局所における神経栄養因子有無の評価などが挙げられる。本研究では経静脈移植、受傷直後の移植といった不利な条件を選択しており、移植方法や移植のタイミングを変えることによる、さらなる効果が期待できる。また、移植細胞由来グリア細胞の機能を明らかにすることで、移植された BMSCs が直接神経機能の回復に関与しているかどうかが明らかになる可能性がある。

結 語

脊髓損傷モデルラットに対して模擬微小重力曝露 BMSCs を移植することにより、運動機能が改善することが示された。脊髓損傷に対する移植治療に対し、模擬微小重力利用という新たな方法の可能性が示された。中枢神経疾患モデルに対する移植実験全般への、模擬微小重力の応用が期待される。