

石坂俊輔 論文内容の要旨

主 論 文

Intra-arterial Cell Transplantation Provides Timing-Dependent Cell Distribution and Functional Recovery After Stroke

脳梗塞に対するヒト間葉系幹細胞の経動脈的移植
ー投与タイミングが細胞分布、機能回復に与える影響ー

石坂俊輔 堀江信貴 福田雄高 佐藤克也 西田教行 永田泉

Stroke. in press. 2012.

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：永田泉教授)

【緒言】

脳梗塞に対する間葉系幹細胞移植は機能回復に向けた新たな治療法として注目されている。一方、脳卒中の臨床においては血管内治療の発展が目覚ましい。血管内治療のテクニックを用いれば血管の支配領域に選択的に細胞を移植できるため、より効果的な幹細胞治療が実現する可能性がある。しかし、その有用性、移植タイミングについては報告が少なく臨床応用に向けて更なる検証が望まれる。そこで我々は脳梗塞に対する間葉系幹細胞の経動脈的移植の有用性、移植タイミングについて基礎的検討を行った。

【対象と方法】

suture method を用いてラット中大脳動脈虚血-再還流モデルを作成した。梗塞作成直後に神経症状を呈したラットのみをエントリーした。梗塞24時間後(D1群)、4日後(D4群)、7日後(D7群)にPBSで希釈した約100万個のヒト骨髄由来間葉系幹細胞(human mesenchymal stem cell: hMSC)を動脈内投与した。投与方法は外頸動脈から内頸動脈に挿入したカテーテルを用いて、脳血流を遮断することなく脳内に投与する方法を用いた。コントロール群には梗塞24時間後に同量のPBSを経動脈的に投与した。すべての群でシクロスポリンによる免疫抑制を行った。移植3日後のhMSCの分布と梗塞21日後の梗塞サイズ、シリンダーテストによる行動学的改善効果について移植タイミングによる違いを検討した。急性期炎症反応の評価として、梗塞7日後の活性化ミクログリアを組織学的に解析した。また移植によるblood brain barrier (BBB)の保護効果を評価するため移植3日後の血清マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP-9)をELISAで測定した。慢性期回復メカニズムの評価として梗塞21日後の血管新生、脳由来神経栄養因子(Brain derived neurotrophic factor: BDNF)、hMSCの分化、生着、活性化アストロサイトを免疫組織学的に解析した。

【結果】

D1 群では梗塞サイズが縮小し行動学的回復がみられた。hMSC は虚血コア、梗塞周囲のいずれにも生着した。D4 群では梗塞サイズは縮小しなかったにも関わらず、行動学的回復がみられた。hMSC は梗塞周囲に主に生着した。D7 群では梗塞は縮小せず、行動学的回復もみられず、生着した hMSC はわずかだった。梗塞 7 日後の活性化ミクログリアは D1 群で虚血コア、梗塞周囲いずれでも抑制されたが、一方、D4 群では梗塞周囲でのみ抑制されており、MSC の分布と一致した。血清 MMP-9 は D1 群においてのみ抑制され、急性期の BBB 保護効果と考えられた。梗塞 2 1 日後には D1、D4 群において梗塞周囲の血管新生が亢進し、BDNF の発現が増加した。免疫二重染色にて BDNF は主に MSC とホストのニューロンに merge した。梗塞 2 1 日後には hMSC は主に血管周囲に生着し、一部の hMSC はアストロサイト、血管内皮のマーカーを発現していた。また移植群においては神経再生を阻害するグリア瘢痕の形成が抑制され、活性化アストロサイトが増加していた。

【考察】

我々は脳梗塞に対する間葉系幹細胞の経動脈的移植の有効性を示した。これまで報告されている MSC の経静脈的移植の報告に比べ、経動脈的移植では脳内に生着する MSC の数が著しく多かった。移植ルートによって最適な移植タイミングや回復メカニズムが異なる可能性が示唆された。また今回の検討により移植タイミングによって細胞の分布や回復メカニズムに相違があることも示した。D1 群では hMSC は虚血コア、梗塞周囲に広く生着し、抗炎症効果や BBB の保護効果を介して神経保護的に作用したことで、梗塞縮小効果と機能回復が見られたと考えられる。一方、D4 群では移植細胞は梗塞周囲に生着し、梗塞縮小効果を示さなかったにも関わらず機能回復がみられた。これは血管新生や hMSC による神経栄養因子の分泌を介した神経再生効果による可能性がある。細胞の分布の違いはホストの血行動態の変化や接着因子等の変化の影響によるものと考えられる。特筆すべきは梗塞 4 日後の移植で機能回復がみられたことであり、脳梗塞治療における time window を大幅に延長する可能性がある。また一部の MSC はニューロンではなくアストロサイトや血管内皮のマーカーを発現しておりその役割に関しても今後の解析が待たれる。

【結論】

ラット脳梗塞モデルに対するヒト間葉系幹細胞の経動脈的投与は有用であった。移植タイミングにより回復メカニズムが異なり、脳梗塞治療の time window を延長する可能性が示唆された。 (1899 字)