

急性期脊髄損傷に対する骨髄由来単核球移植療法の
作用機序及び肝細胞増殖因子の関与に関する研究

(Studies on therapeutic mechanisms of bone marrow-derived
mononuclear cell and involvement of hepatocyte growth factor in
acute spinal cord injury)

学位論文の内容の要約

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科
獣医学専攻博士課程平成 25 年入学

新井清隆

(指導教授：原 康)

脊髄損傷は人医学および獣医学領域でしばしば遭遇する重篤疾患である。多くの症例は治療に反応し機能的回復が得られるが、重症例では運動、感覚、および生理機能が回復せず QOL の低下を招く。さらに脊髄損傷では QOL の低下を伴いながらも寿命を全うする症例が多い。有効な治療法が確立されていないことから新たな治療法の開発が急務となっている。急性期脊髄損傷に対する治療法の基本は損傷周囲に波及する二次損傷の抑制であり、退行性変化の減弱を目的とする。一方、二次損傷の収束した慢性期の治療は軸索の再伸展を促し、破壊された神経回路の再構築を目的とする。慢性期の治療は困難を極めるが、急性期に二次損傷の拡大を制限することで、慢性期に機能回復が得られる可能性が高まる。近年、細胞移植による脊髄損傷に対する治療効果が明らかにされ、多くの移植用細胞ソースが報告された。骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cell: BMSC) はその代表的存在であるが、分離培養のための時間が必要であり急性期における治療に使用できないことが問題であった。そこで我々は骨髄由来単核球 (bone marrow-derived mononuclear cell: BM-MNC) に着目した。BM-MNC は骨髄細胞から巨核球系細胞および成熟赤血球をのぞいた多種細胞集団で、骨髄を採材後所定の遠心作業によって容易に調整できる。従って、発症した当日でも移植が可能な唯一の移植用細胞ソースとして脊髄損傷の他、脳梗塞や心筋梗塞といった重篤疾患の急性期における治療に応用されてきた。BM-MNC の脊髄損傷に対する治療効果は 2001 年に初めて報告され、それ以降、抗アポトーシス効果および血管新生といった治療効果が報告されている。

BM-MNC の治療効果は成長因子のパラクラインによってもたらされると考えられているが、その詳細な機序は今のところほとんど明らかにされていない。細胞移植療法はその治療効果に注目が集まりがちだが、詳細な機序を明らかにすることでターゲットが明瞭になり、移植適期も明瞭になることが期待される。また主要な作用機序が明確になることでさらに有効な治療法の開発につながると考えられる。本研究では BM-MNC の成長因子の産生能および移植後の血管構成細胞への分化能に着目し、作用機序を明らかにすること、そしてその過程で得られた知見に基づいて、より低侵襲で効果的な治療方法の開発を目的に研究を行った。

第2章. 損傷脊髄における BM-MNC の血管構成細胞への分化能

骨髄細胞は組織が損傷すると病変部に遊走し血管内皮、ペリサイト、あるいは血管周囲マクロファージといった血管構成細胞へ分化し血管新生に関与することが明らかにされている。同様にして BM-MNC が移植部位でどのような分化動態を示すのかについて、心筋梗塞や下肢虚血モデルで解析された結果、多くは血管内皮に分化し、血管新生を促進していることが明らかにされた。一方脊髄損傷においては移植後の BM-MNC を詳細に解析した報告はなく、BM-MNC がどのような細胞動態を示すのかほとんど明らかにされていない。近年、新生血管由来のプロスタサイクリンが神経の再生を促進することが解明され、中枢神経疾患において血管新生を促進することの重要性が再認識されている。第2章ではラット脊髄損傷モデルに対する BM-MNC の血管新生促進効果の機序を明らかにするために、BM-MNC を緑色蛍光蛋白 (green fluorescent protein: GFP) でトラッキングし、脊髄微小血管構成細胞への分化能を明らかにした。結果、BM-MNC 由来マクロファージが一時的に血管周囲に局在し、一部血管周囲マクロファージマーカーCD163 に陽性を示すことが明らかとなった。血管内皮およびペリサイトへの分化もみられたがごくわずかであった。詳細な機序は明らかにされていないがマクロファージは血管内皮との相互作用によって血管新生を促進することが報告されている。脊髄損傷に対する BM-MNC 移植療法でも同様に BM-MNC 由来マクロファージが血管内皮細胞との相互作用によって血管新生機構に関与している可能性が推測された。

第3章. 損傷脊髄における BM-MNC の成長因子産生能

骨髄細胞は恒常的に高い成長因子産生能を有することが明らかにされている。骨髄細胞のみで GFP を発現するキメラマウスに人工的に心筋梗塞を発症させると骨髄細胞が損傷部位に遊走し、種々の成長因子を産生することが報告された。同様の現象はあらゆる疾患モデルにおいて確認されており、骨髄細胞は成長因子のパラクラインによって生理的な組織修復過程に関与していると考えられている。このことから骨髄細胞を主体として構成される BM-MNC も同様に成長因子のパラクラインによって治療効果もたらしている可能性が推察された。第3章では BM-MNC が移植部位でどの程度生存し、どのような成長因子を産生しているのかを解析する目的で、BM-MNC を GFP

でトラッキングし、ラット脊髄損傷モデルに移植した。結果、BM-MNCは移植7日後においても損傷中心部において多数確認されたが、移植3から7日後にかけては減少し、一部は活性型 caspase-3 に陽性を呈していた。BM-MNCは肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF)、血管内皮増殖因子、および単球走化性因子-1 といった成長因子に陽性を示し、なかでも HGF の発現率が特に高いことが明らかとなった。BM-MNC による治療効果を検討した結果、損傷3日後において BM-MNC 移植群では、活性型 caspase-3 の陽性細胞数が有意に低下していた。本章の研究の結果、移植した BM-MNC が少なくとも7日間は損傷部位に留まり HGF を主体とした成長因子を産生していることが明らかとなった。急性期の損傷脊髄は HGF の受容体 c-Met の発現量に対して、内因性 HGF の産生量が極めて低いことが知られている。このことから BM-MNC は枯渇状態にある HGF を組織に供給することで HGF/c-Met signaling を活性化させ、抗アポトーシス効果といった治療効果をもたらしている可能性が考えられた。

第4章. BM-MNC による HGF のパラクラインを介した神経細胞保護効果

HGF は血管新生、細胞保護を始めとするあらゆる生理活性を有する成長因子として知られている。これまでに肝硬変、腎不全、および多発性硬化症といったあらゆる疾患モデルで治療効果が確認されている。特に HGF は Rac-1 の不活性化を介した活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) 産生抑制や Bcl-2 の発現誘導によって細胞死を強力に抑制することが報告されている。我々は第3章の結果から BM-MNC の急性期脊髄損傷に対する抗アポトーシス効果は HGF のパラクラインによってもたらされているのではないかと仮説した。そこで第4章では神経細胞モデルであるラット褐色細胞腫細胞株 (PC12) に塩化コバルトで細胞死を誘導し、BM-MNC による神経細胞保護効果の機序を HGF のパラクラインおよび ROS 産生に着目して解析した。結果、BM-MNC は HGF のパラクラインによって PC12 細胞の c-Met をリン酸化し、ROS 産生および細胞死を有意に抑制することが明らかとなった。ROS 産生量および細胞保護効果は c-Met 阻害剤存在下で有意に低下した。本章の結果から BM-MNC は少なくとも一部は HGF/c-Met signaling を介して ROS 誘発性細胞死を抑制していると考えられた。本章で使用した阻害剤濃度は PC12 細胞の生存能に影響がない

濃度であり、PC12 細胞による HGF のオートクラインの影響はあってもごくわずかであると考えられた。脊髄損傷では損傷直後には ROS の産生が誘導され 2-3 日以内に収束する。したがって BM-MNC 移植療法は損傷後 2 日以内に移植することで最も高い細胞保護効果が得られると考えられた。

第 5 章. 急性期脊髄損傷に対する BM-MNC および HGF の脊髄実質投与法による治療効果の比較

第 4 章の結果から BM-MNC の細胞保護効果の少なくとも一部は HGF のパラクラインを介してもたらされることが明らかとなった。このことから HGF を BM-MNC の代わりに急性期脊髄損傷に投与することで、同等あるいはさらに効率的に治療効果が得られる可能性が推測された。HGF はすでに脊髄損傷に対して応用され、カテーテルによるくも膜下腔持続投与および遺伝子導入による投与法が考案されている。本検討ではさらに簡便かつ有効な手法の開発を目的に、HGF を脊髄実質に単回投与し、その治療効果を BM-MNC 移植療法と比較しながら解析した。結果、HGF 投与群および BM-MNC 移植群は、損傷 14 および 28 日後に拡散テンソル画像の Fractional anisotropy 値が対照群よりも有意に高値を示すことが明らかとなった。また、損傷 28 日後における免疫組織化学的解析の結果、HGF 投与群の神経細胞体、軸索およびアストロサイト陽性領域は対照群よりも有意に広く、組織保護効果が確認されたが BM-MNC 移植療法と比較するとその効果は限定的であった。本章の結果から HGF 脊髄実質単回投与法は急性期脊髄損傷に対して組織保護効果をもたらすが、BM-MNC と比較するとその効果は低いことが明らかとなった。HGF 単回投与法では BM-MNC と同程度の効果が得られなかった理由としては長期的な投与が必要であった可能性、あるいは複数の成長因子の投与が必要であった可能性などが考えられるが本研究では明らかにできなかったため、今後の研究課題とした。

結論として、BM-MNC は損傷部位で HGF を主体とする種々の成長因子を産生し、少なくとも一部は HGF の受容体 c-Met のリン酸化を介して ROS 産生を減少させることによって細胞死を抑制することが示唆された。また、in vivo における解析の結果、HGF 単回投与法の効果は BM-MNC

移植療法と比較すると劣ることが明らかとなったが、組織保護効果はある程度認められたことから新たな治療法の可能性が示唆された。また BM-MNC 由来マクロファージは一時的ではあるが移植後に血管壁に接着するという特徴的挙動を呈することが明らかとなった。このような細胞挙動は血管新生を誘導することが知られていることから、BM-MNC 由来のマクロファージは血管との細胞間相互作用により BM-MNC 移植療法の血管新生機構に関与している可能性が推察された。今後さらに詳細に解析することで血管新生機構の解明や、さらに有効な治療法の開発に繋がることが期待される。