

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)

新井清隆

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)

新井清隆

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

(指導教授： 原 康)

平成 29 年 3 月

## 目次

1. 第1章 緒言	1
2. 第2章 損傷脊髄における BM-MNC の血管構造への分化能	5
2-1. 小序	6
2-2. 材料と方法	8
2-2-1. 供試動物と実験デザイン	8
2-2-2. BM-MNC の分離	8
2-2-3. 脊髄損傷と BM-MNC の移植	9
2-2-4. 組織の処理と免疫組織化学	9
2-2-5. 移植した BM-MNC の評価	10
2-2-6. 統計	11
2-3. 結果	12
2-3-1. 損傷脊髄への移植後の BM-MNC (EGFP 陽性細胞) の局在変化	12
2-3-2. BM-MNC が接着する血管の特徴	12
2-3-3. 血管周囲に局在する BM-MNC の抗原解析	13
2-4. 考察	14
2-5. 小活	16
3. 第2章 ラット損傷脊髄における移植 BM-MNC の成長因子産生能	20
3-1. 小序	21
3-2. 材料と方法	22
3-2-1. 供試動物と実験デザイン	22
3-2-2. BM-MNC の分離	22

3-2-3. 脊髄損傷と BM-MNC の移植	22
3-2-4. 組織の処理と免疫組織化学	23
3-2-5. 移植した BM-MNC の評価と治療効果の評価	24
3-2-6. 運動機能評価	24
3-2-7. 統計	25
3-3. 結果	26
3-3-1. 移植した BM-MNC の生存能	26
3-3-2. 移植した BM-MNC の成長因子産生能	26
3-3-3. BM-MNC 移植による治療効果	26
3-3-4. 後肢運動機能評価	27
3-4. 考察	29
3-5. 小活	32
4. 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	39
4-1. 小序	40
4-2. 材料と方法	42
4-2-1. PC12 細胞の培養と細胞処理	42
4-2-2. 成体ラット由来初代大脳皮質神経細胞の分離と BM-MNC との共培養	42
4-2-3. BM-MNC の分離と培養上清の作製	43
4-2-4. 細胞生存能の解析	43
4-2-5. アポトーシスの検出	43
4-2-6. ウェスタンブロッティング	44
4-2-7. Reactive oxygen species 産生量の解析	44
4-2-8. 免疫細胞化学	45
4-2-9. 統計	45



4-3. 結果	46
4-3-1. BM-MNC の PC12 細胞に対する細胞保護効果	46
4-3-2. BM-MNC による PC12 細胞の c-met のリン酸化	47
4-3-3. BM-MNC による PC12 細胞に対する抗アポトーシス効果	47
4-3-4. BM-MNC による PC12 細胞に対する Reactive oxygen species 産生抑制効果およびアポトーシス関連タンパク発現への影響	48
4-3-5. BM-MNC による神経突起伸展促進効果	48
4-4. 考察	50
4-5. 小活	52
5. 第 5 章 急性期脊髄損傷に対する BM-MNC および HGF の脊髄実質投与方法による治療効果の比較	58
5-1. 小序	59
5-2. 材料と方法	60
5-2-1. 供試動物と実験デザイン	60
5-2-2. BM-MNC の分離	60
5-2-3. 脊髄損傷と BM-MNC および HGF の投与方法	60
5-2-4. Magnetic resonance imaging および Diffusion tensor imaging	60
5-2-5. 組織の処理と免疫組織化学	61
5-2-6. 運動機能試験	61
5-2-7. 統計	62
5-3. 結果	63
5-3-1. T2 強調画像における損傷脊髄の経時的変化	63
5-3-2. DTI における損傷脊髄の経時的変化	63
5-3-3. 免疫組織化学による治療効果の評価	64

5-3-4. 後肢運動機能評価	65
5-3-5. DTI FA 値と免疫組織化学の相関性	66
5-4. 考察	67
5-5. 小活	69
6. 第6章 総括	76
7. 参考文献	83

# 第 1 章

## 緒言

日本では毎年 5000 人の脊髄損傷患者が発生する。ヒト脊髄損傷の原因の多くは事故やスポーツであり、完全横断性病変を形成する場合もしばしばみられる。このうち完全麻痺を呈する症例ではその後の運動および感覚機能回復率が 10%程度しかない (Yoon et al., 2007; Harrop et al., 2011)。獣医学領域では主に椎間板ヘルニアや椎骨の形態的異常を原因として脊髄損傷の発症を認める。特に軟骨異栄養犬種の椎間板ヘルニアは臨床の現場で比較的多く遭遇する疾患である。完全麻痺に加え、深部痛覚が消失した椎間板ヘルニア症例は、一般的な治療法である外科的減圧術を施しても機能的回復が得られるのは 50%程度である (Tamura et al., 2012)。このように人医および獣医学領域では現在の治療法では回復が困難な脊髄損傷患者が存在し、新たな治療法の開発が急務となっている。

脊髄損傷の病態は大きく二つに分けられる。脊柱に外力が加わると脊髄に物理的傷害が生じ、これは一次損傷と呼ばれる。一次損傷によって惹起される病態は二次損傷と呼ばれ、炎症や細胞死などの生理的反応のことをさす (Burda et al., 2014)。基本的には皮膚における創傷の病態と類似するが、脊髄損傷は神経組織の構造的再建および機能的再建が困難なうえ、その後の生活に支障をきたす点で重大な疾患である。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、急性期の治療によって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ことがある。したがって脊髄損傷の治療は急性期の二次損傷をターゲットとしたものが多く開発された (Bains and Hall., 2012; Harvey et al., 2015)。メチルプレドニゾロンはヒトおよび獣医学領域で浸透している古くからある急性期脊髄損傷の治療薬である。主に活性酸素種の産生抑制を目的に使用されるが、その有効性についてコンセンサスは得られていない。その他、これまでにあらゆる投薬療法が考案されてきたが、劇的な効果が確認されている治療法はないのが実状であった (Bains and Hall., 2012)。

しかしここ 20 年で脊髄損傷に対する治療は劇的に進歩した。骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cell: BMSC) は古くからその存在が知られ、骨髄の恒常性を維持する細胞として認知されていた。その後、BMSC は多分化能を有することが明らかにされ、さ

らにあらゆる組織の再生を促すことが報告された。BMSC は急性期脊髄損傷に対する治療にも応用され、2000 年にラットモデルを用いた基礎研究においてその治療効果が初めて報告された。以来、多数の基礎研究および前臨床研究が報告されている。BMSC 移植療法の発見当初は BMSC が損傷部位で神経系細胞に分化することで治療効果をもたらしていると考えられていた。しかし移植した BMSC はやがて消失すること、さらに BMSC の培養上清の投与でも治療効果が得られることが報告されて以来、BMSC が治療効果をもたらすうえで成長因子のパラクラインが重要であるという考えが急速に広まることとなった。このように BMSC の脊髄損傷に対する治療効果は数々の研究によって証明され、その作用機序が明らかにされてきたが、臨床的に脊髄損傷の急性期に応用する上では重大な問題がある。BMSC は骨髄細胞を組織培養用培養皿で培養することで接着してくる細胞であるが、通常骨髄には一万から十万分の一程度の割合でしか存在していない。すでに述べたように脊髄損傷急性期では二次損傷が進行する前に治療を開始することが肝要となるが、BMSC を十分な数に増殖させて移植に供するためには少なく見積もっても 2 週間要することとなり、治療の開始が遅れてしまう。そこで我々は骨髄由来単核細胞 (bone marrow-derived mononuclear cell: BM-MNC) に着目した。BM-MNC はその名の通り骨髄中に存在する単核細胞の集団であり、成熟赤血球および巨核球系細胞を除いた多種の細胞集団である。(Yoshihara et al., 2007)。BM-MNC は特定の細胞を分離培養する訳ではないため、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。このような特性から BM-MNC は発症した当日でも移植が可能であり脊髄損傷の他、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、血管新生といった治療効果が報告されている (Yoshihara et al., 2007; Guo et al., 2012)。さらに BM-MNC の組織保護効果および運動機能改善効果は BMSC と同程度であることが明らかにされている (Urdzikova et al., 2006)。

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によってさらに有効な移植方法、適応時期の同定、そして治療法の改良が進む。例えば BMSC は多発性硬化症に対して治療効果をもたらすことが知られていたが、その効果は主として肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) のパラクラインを介してもたらされることが詳細に明らかにさ

れた (Bai et al., 2012)。以来、BMSC 移植療法よりも、低侵襲で簡便な HGF 投与療法が新たな治療法として注目されることとなり、臨床応用が期待されている。一方 BM-MNC の治療効果は BMSC と同様に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十分に解明されていないのが現状である。本研究では BM-MNC の成長因子の産生能および移植後の分化能に着目し、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た、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 章および第 3 章では BM-MNC の治療効果に関連すると考えられる所見をスクリーニング的に解析した。第 4 章では作用機序の証明、そして第 5 章では新たな治療法の有効性を解析した。

## 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

## 2-1 小序

骨髄由来単核球 (bone marrow-derived mononuclear cell: BM-MNC) 移植療法は脊髄損傷に加えて、心筋梗塞、下肢虚血および脳梗塞といった様々な血管疾患において血管新生を誘導し、局所循環を改善させることで組織再生を促す (Hess et al., 2002; Fujii et al., 2004; Iwase et al., 2005; Yoshihara et al., 2007)。さらに近年、新生血管由来の血管内皮細胞がプロスタサイクリン I2 を分泌し軸索の伸展を促進することが明らかにされ、中枢神経系疾患の再生医療において血管新生の重要性が再注目されている (Muramastu et al., 2012)。BM-MNC による血管新生促進効果は成長因子のパラクラインによって誘導される機序の他に、BM-MNC が移植部位で血管構造を構成する細胞に分化する機序の存在が示唆されている。例えば、ラットおよびマウスの心筋梗塞、脳梗塞、および下肢虚血モデルでは移植した BM-MNC が血管内皮細胞に分化することが明らかにされている (Hess et al., 2002; Fujii et al., 2004; Iwase et al., 2005)。加えて、脳梗塞モデルでは、移植した BM-MNC が周皮細胞に分化することが確認されている (Fujita et al., 2010)。周皮細胞は血管の周囲に局在し、血流の改善、血管の安定およびサイトカインの産生によって血管新生に関与する (Ribatti et al., 2011; Quaegebeur et al., 2010)。このように BM-MNC は種々の組織固有の細胞に分化するのではなく、血管構成細胞に分化し、血管新生を促すことで間接的に組織再生に寄与していると考えられている。骨髄細胞は BM-MNC として損傷部位に移植した場合のみならず、生理的にも損傷部位に遊走し血管構成細胞に分化する細胞活性を有する。しかも種々の細胞への分化動態は疾患によって異なっており、損傷組織特異的な微小環境によって骨髄細胞の運命が決定されることが推測される。例えば、骨髄細胞のみを緑色蛍光蛋白 (green fluorescent protein: GFP) に置換したキメラマウスを用いた研究では、脳梗塞を発症させると病変部に GFP 陽性の骨髄細胞が遊走し、周皮細胞に分化することが明らかにされている (Kokovay et al., 2006)。一方担癌動物に移植した場合は腫瘍血管内皮に、皮膚外傷モデルでは、これらの細胞に分化せず、損傷部位の血管壁に骨髄由来マクロファージが接着し、血管新生を促進する (Davidoff et al., 2001; Okuno et al., 2011)。これらの疾患とは対照的に、脊髄損傷では移植した BM-MNC が神経系細胞に分化しないことが明らかにされているが、血管構成細胞への分化能は解明されておらず血管新生機構が十分に解明され



ていない。本章ではラット脊髄損傷モデルに対する BM-MNC による血管新生効果の機序を明らかにするために、細胞を GFP でトラッキングし、BM-MNC の移植後の細胞動態を解析した。

## 2-2 材料と方法

### 2-2-1 供試動物と実験デザイン

健康な雌の Sprague–Dawley (SD) ラット (215–250g, 10 週齢, Tokyo Laboratory Animal Science, Tokyo, Japan) 14 匹に脊髄圧挫損傷を施した。EGFP 陽性の BM-MNC を移植し、3、7、14、および 21 日後に安楽殺し、免疫組織化学的解析に供した。移植細胞は 4 匹の雄 SD-Tg (CAG-enhanced green fluorescent protein; CAG-EGFP) ラット (380–400 g, 10 週齢, Japan SLC, Shizuoka, Japan) から採材し、1 匹から採材した BM-MNC は 3 あるいは 4 匹の脊髄損傷モデルラットに移植した。全てのラットは室温 26°C、12:12 時間の明暗周期で飼育した。本章の研究は日本獣医生命科学大学の動物倫理委員会によって承認された (Code: 26S-7)。すべての実験動物は日本獣医生命科学大学の動物実験ガイドラインに従って扱った。

### 2-2-2 BM-MNC の分離

骨髄細胞は過去の報告に従って滅菌下で分離した。すなわち、ドナーより採材した大腿骨および脛骨は骨端部を切除し、10ml の生理食塩水で骨髄腔をフラッシュした。ドナーラットはイソフルラン (Pfizer, NY, USA) の過麻酔によって安楽殺した。ラットは透明なイソフルラン還流ボックスで麻酔し、呼吸および心停止が完全に得られたことを確認した。回収した骨髄細胞液は孔径 100  $\mu\text{m}$  のナイロンメッシュ (Coming, NY, USA)を通して濾過した。BM-MNC は過去の報告に従って、骨髄細胞液から分離した (Iwase et al., 2004)。すなわち、骨髄細胞液 10ml は 5ml の比重 1.077g/ml の比重液 (Lymphoprep: AXIS-SHIELD, Dundee, UK)に注意深く重層し、800g で 20 分間遠心分離した。遠心後、比重液の直上に存在する単核細胞層を 23G SB 針にて吸引回収し、serum-free Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Sigma, MO, USA) を用いて再希釈した。遠心分離後 (800g, 5 分) 得られた細胞ペレットを BM-MNC とした。SD-Tg (CAG-EGFP) ラットから分離した BM-MNC は EGFP 陽性を示すため、移植後の細胞をトレースするために再生医療の研究分野で広く使用されている。移植前後に BM-MNC をトリパンブルー染色し、生存率 95%以上であることを確認した。予

備実験の結果、BM-MNC は氷上保存にて最も高い生存率を示すことから、分離から移植までの間、氷上にて保存した。

### 2-2-3 脊髄損傷と BM-MNC の移植

ペントバルビタール(40 mg/kg i. p, Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan) を用いて SD ラットに麻酔を施し、第 10 胸椎の椎弓を切除し脊髄を露出した。過去の報告に従って脊髄に圧挫損傷を施した (Lee et al., 1999)。すなわち、脊髄を露出したラットを weight-drop 装置 (NYU Spinal Cord Contusion System Impactor; New York University, NY, USA) に固定し、脊髄直上にセットした径 2.5mm, 重さ 10g のロッドを 12.5mm の高さから落下させた。損傷直後、BM-MNC ( $3 \times 10^6$  cells in 10  $\mu$ l of serum-free DMEM) はハミルトンシリンジを用いて 2 分間かけて損傷部位に脊髄背側から注射し、細胞の流出を防ぐために針を穿刺した状態を 2 分間維持した。対照群は細胞溶解液のみを投与した。投与後、軸上筋および皮膚を結紮し閉創した。術前および術後は抗生剤 (cefmetazole sodium, 25 mg/kg, Nipro, Osaka, Japan) および鎮痛剤 (butorphanol tartrate, 0.5 mg/kg, Meiji Seika Pharma, Tokyo, Japan) を皮下投与した。術後はラットを注意深く観察し、活動性および食欲の減退、発熱、疼痛、排尿障害、およびこれらに起因した全身状態の悪化をもってエンドポイントとした。

### 2-2-4 組織の処理と免疫組織化学

パラホルムアルデヒドを用いた経心臓還流固定を実施するためにラットにイソフルランを用いて深麻酔を施した。ラットは透明なイソフルラン還流ボックスの中で観察し、呼吸が停止したことを 2 分間以上確認した。ラットの左心室から生理食塩水 100ml を還流させた後、4% パラホルムアルデヒド (Nakarai, Tokyo, Japan) / 0.1 M リン酸緩衝液 (Wako, Osaka, Japan) 100ml を還流させ、安楽殺と同時に組織固定を実施した。損傷中心を含んで脊髄を 1.5cm の長さで採材し、還流液と同じ固定液を用いて後固定を 12 時間実施した。固定後、右側の脊髄は凍結切片用に処理した。すなわち凍結保護のために 30%スクロースに 1 日浸漬、置換し、O.C.T compound にて包埋した。

組織はクライオスタット (SM2010R; Leica, Hessen, Germany) を用いて  $10\ \mu\text{m}$  に薄切した。免疫組織化学は常法に従って実施した。すなわち、5%ヤギ血清 (Dako, Glostrup, Denmark) を 30 分間処理して非特異反応をブロッキングした後、一次抗体を処理した。一次抗体 は以下の抗体を用いた (マウスモノクローナル抗体 : GFP [1:300; Wako, Osaka, Japan], Rat endothelial cell antigen-1: RECA-1 [1:200; Bio-Rad, CA, USA]、あるいは CD163 [1:200; Santa Cruz Biotechnology, TX, USA]; ウサギポリクローナル抗体 : glial fibrillary acidic protein: GFAP [1:500; Dako, Glostrup, Denmark], Ionized calcium binding adapter molecule-1: Iba-1 [Wako; 1:500; Wako, Osaka, Japan], Neuro-glial protein-2: NG-2 [1:100; Millipore, Darmstadt, German], あるいは von Willebrand factor: vWF [1:200; Abcam, Cambridgeshire, UK])。二次抗体は以下の抗体を用いた (DyLight-405 conjugated goat anti-rabbit antibody [1:500; Jackson ImmunoResearch, PA, USA]、Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse [1:500; Molecular Probes, OR, USA]、あるいは Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit antibodies [1:500; Molecular Probes, OR, USA])。切片は DAPI-Fluoromount-G (SouthernBiotech, AL, USA) で封入し、核染色をした。二次抗体に DyLight 405 標識抗体を用いた場合は DAPI を含まない Fluoromount-G (SouthernBiotech, AL, USA) で封入した。陰性コントロールは第 2 章と同じ方法で作製した。

#### 2-2-5 移植した BM-MNC の評価

移植した BM-MNC の脊髄微小血管構成細胞への分化能を解析するために、RECA-1 あるいは vWF (血管内皮)、NG2 (周皮細胞)、Iba-1 (マクロファージ/ミクログリア)、CD163 (M2 マクロファージ/血管周囲マクロファージ)、および GFAP (アストロサイト) の発現性を移植 3、7、14、および 21 日後に解析した。切片は  $100\ \mu\text{m}$  おきに 3 枚作製し、それぞれの損傷中心部からランダムに 3 視野 [high power field (HPF)、合計 9 視野選択した。取得した画像を用いて、EGFP 陽性 BM-MNC における種々の抗原に対する陽性率を評価した。切片は 共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて観察し、Image J 1.48v software (NIH, MD, USA) を用いて解析した。

#### 2-2-6 統計

データは正規性検定および分散分析後、Paired *t*-test を用いて統計処理した。P 値 0.05 未満をもって有意差ありとした。全ての統計データは SPSS version 16.0 (IBM, NY, USA) を用いて解析し means  $\pm$  standard errors of the mean (SEMs) で示した。

## 2-3 結果

### 2-3-1 損傷脊髄への移植後の BM-MNC (EGFP 陽性細胞) の局在変化

移植 3 日後、EGFP 陽性細胞が損傷中心部に多数確認されたが (図 1A)、移植 7 日後には減少した (図 1B)。移植 14 日後、EGFP 陽性細胞はごくわずか認められたが (図 1C)、移植 21 日後には完全に消失した (図 1D)。移植 3 日後、EGFP 陽性細胞は主に類円形を呈し、損傷組織内における偏在は認められなかった (図 1E)。一方移植 7 日後には、一部 EGFP 陽性細胞が損傷部および一部の周囲の血管周囲に局在し、紡錘形を呈した (図 1F)。血管周囲に局在する EGFP 陽性細胞は z-stack (組織切片の断層画像を連続で撮影し、重ね合わせて立体化する手法) を用いて 3 次元画像化した (図 1G)。その結果、血管周囲に局在する多くの EGFP 陽性細胞は血管壁に付着し (図 1G; 白矢頭)、細胞突起を伸展していることが明らかとなった (図 1G; 黒矢頭)。EGFP 陽性細胞による接着を受ける血管の割合は、移植 3 から 7 日後にかけて  $6.0 \pm 2.8\%$  から  $35.4 \pm 12.7\%$  に有意に増加した (図 1H;  $p < 0.01$ ; 95% CI: 13.4-45.5)。血管周囲に移行した EGFP 陽性細胞の割合は、移植 3 から 7 日後にかけて  $1.42 \pm 2.2\%$  から  $15.6 \pm 2.2\%$  に有意に増加した ( $p < 0.01$ ; 95% CI: 8.34-20.1)。

### 2-3-2 BM-MNC が接着する血管の特徴

損傷中心部において EGFP 陽性細胞が接着する微小血管の多くは GFAP 陽性細胞 (アストロサイト) の支持を失っていた (図 2A)。損傷周囲ではグリオーシスによってアストロサイトの増加が認められたが、同部位でもアストロサイトの支持を伴わない血管が散見され、EGFP 陽性細胞はこのような血管に選択的に接着する傾向が認められた (図 2B-D)。EGFP 陽性細胞の接着を伴う血管のうち、GFAP 陽性アストロサイトによる支持を失っていた血管の割合は  $33.8 \pm 4.1\%$ 、GFAP 陽性アストロサイトによる支持を受けていた血管は  $13.3 \pm 6.8\%$  だった (図 2E)。EGFP 陽性細胞の接着を伴わない血管のうち、GFAP 陽性アストロサイトによる支持を失っていた血管の割合は  $28.2 \pm 0.1\%$ 、GFAP 陽性アストロサイトによる支持を受けていた血管は  $24.7 \pm 0.1\%$  だった。アストロサイトの支持の有無の割合において、有意差は認められなかった。GFAP に対して陽性を示す

EGFP 陽性細胞は認められなかった。

### 2-3-3 血管周囲に局在する BM-MNC の抗原解析

移植 7 日後において、血管周囲に局在する EGFP 陽性細胞が発現する抗原を解析したところ、多くは Iba-1 (マクロファージ/ミクログリア) に陽性を示した ( $86.6 \pm 5.1\%$ ; 図 3A-C)。Iba-1 陽性 EGFP 陽性細胞の一部は少数の細胞突起を伸展していたが、ミクログリア様の多数の枝分かれした細胞突起をもつ、いわゆるラミファイド形態やアメボイド形態を呈する細胞は認められなかった。また一部は CD163 (M2 マクロファージ / 血管周囲マクロファージ) に陽性を示した ( $15.6 \pm 4.0\%$ ; 図 3D-F)。極めて少数であったが EGFP 陽性細胞は NG2 ( $0.8 \pm 0.8\%$ ; 図 3G-I) および RECA-1 ( $0.4 \pm 0.4\%$ ; 図 3J-L) に陽性を示し、RECA-1 陽性細胞の一部は微小血管管腔構造の一部を構成していた。各種マーカーに対する EGFP 陽性細胞の血管周囲および間質における陽性率は、図 3M に示した。Iba-1 に対する陽性率は血管周囲 ( $86.6 \pm 5.1\%$ ) において間質 ( $64.7 \pm 3.0\%$ ) よりも高い値を示したが、有意差は得られなかった ( $p=0.051$ ; 95% CI:  $-0.7-43.0$ )。CD163 に対する陽性率は血管周囲 ( $15.6 \pm 4.0\%$ ) において間質 ( $8.7 \pm 2.4\%$ ) よりも有意に高値を示した ( $p<0.05$ ; 95% CI:  $0.40-13.4$ )。NG2 に対する陽性率は血管周囲 ( $0.8 \pm 0.8\%$ ) において間質 ( $0.5 \pm 0.5\%$ ) よりも高値を示したが有意差は認められなかった。

## 2-4 考察

本章の研究の結果、急性期の脊髄損傷に移植した BM-MNC は移植 3 日後から 7 日後の間に血管周囲に移行し、一時的に血管壁に接着することが新たに明らかとなった。また脊髄損傷では脳梗塞、心筋梗塞、および下肢虚血といった血管疾患と異なり、移植した BM-MNC は周皮細胞や血管内皮に分化しないことが明らかとなった。血管壁に接着した BM-MNC の多くは Iba-1 あるいは CD163 に陽性を示したことから、また形態的にミクログリアではないことからマクロファージであると考えられた。皮膚損傷モデルを用いた研究では骨髄に存在する単球・マクロファージが損傷部位に遊走し、血管新生を誘導することが明らかにされている (Okuno et al., 2011)。このことから BM-MNC 由来マクロファージは血管内皮との相互作用によって BM-MNC 移植療法における血管新生機構に関与している可能性が推測された。

BM-MNC はアストロサイトの支持が消失した血管壁に選択的に接着する傾向が認められた。中枢神経系における血管新生の際、tip cell による誘導を受けて新生血管が sprouting し、その後アストロサイトの支持を受け、血液脳/脊髄関門を構築する (Obermeier et al., 2013)。したがって損傷脊髄におけるアストロサイトの支持が消失した血管は新生血管であることを示唆する。加えて、同血管は支持するアストロサイトの細胞死によって血液脊髄関門が破綻した血管である可能性も考えられる (Abbott et al., 2002; Willis et al., 2011)。本研究において、BM-MNC 由来マクロファージが接着する血管がどのような特徴を持つのか、詳細に明らかにすることはできなかったが、免疫組織学的特徴から新生血管あるいは血液脊髄関門が破綻した血管であると考えられた。

血管周囲に局在する BM-MNC の一部はマクロファージマーカー CD163 に陽性を示した。マクロファージには多数のサブタイプが存在し、主に炎症性マクロファージ (M1) と組織修復に関与するマクロファージ (M2) に分類される (David and Kroner., 2011)。M2 マクロファージは様々な成長因子を産生し、組織修復を促す (David and Kroner., 2011)。本章において血管壁に接着した BM-MNC で高発現がみられた CD163 は組織修復型の M2 マクロファージのマーカーであり M2 マクロファージの亜型である M2c マクロファージにおいて特に高発現する。近年、IL-4, -10, および TGF $\beta$  処理によって極性誘導した M2 マクロファージを脊髄損傷モデルラットに静脈投与した

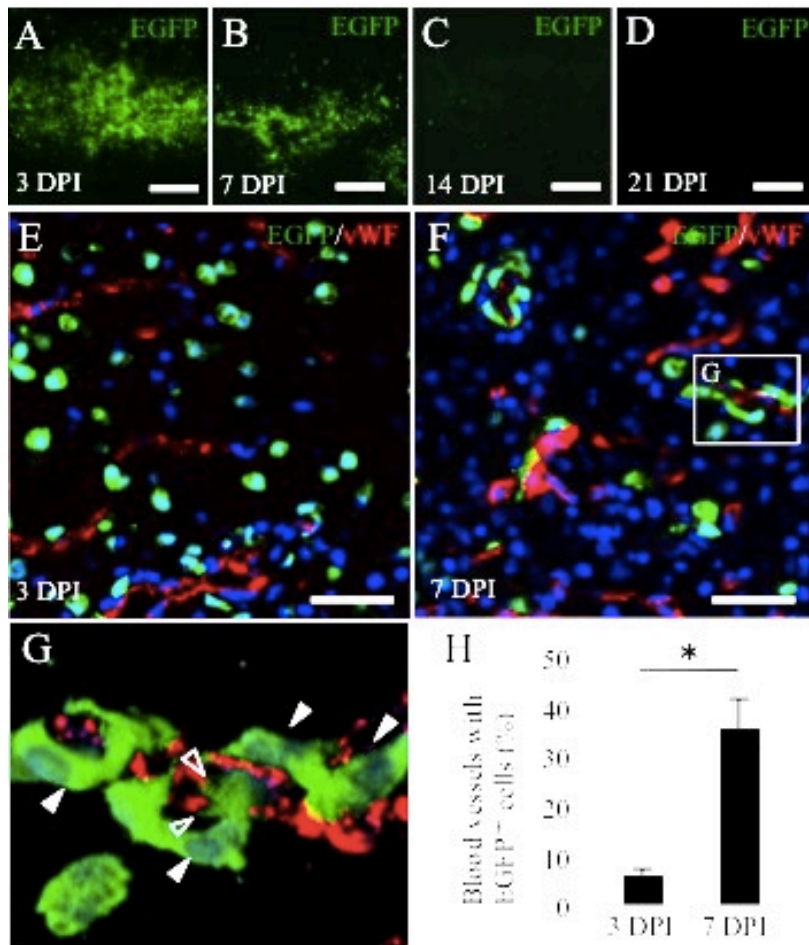


結果、同細胞は創傷部位に遊走し、TNF $\alpha$ の産生抑制およびIL-10の産生を介した抗炎症効果、損傷領域の縮小および運動機能の改善効果をもたらすことが明らかとなった (Ma et al., 2015)。このことから BM-MNC 移植療法においても、BM-MNC 由来 M2 マクロファージが抗炎症作用を介して治療効果をもたらしている可能性が推察された。

CD163 は脳脊髄に常在する血管周囲マクロファージのマーカーとしても知られ、ヘモグロビンスカベンジレセプターとして機能する (Kim et al., 2006)。CD163 はハプトグロビン・ヘモグロビン (Hp-Hb) 複合体の貪食によって、発現が誘導されることが報告されている (Mendes et al., 2009)。このことから、本研究で認められた血管周囲に局在する BM-MNC における CD163 の有意な発現率の上昇は、Hp-Hb 複合体の貪食によって引き起こされた可能性も考えられた。中枢神経系における CD163 陽性の血管周囲マクロファージは組織保護的效果をもたらす一方で、抗原提示や COX-2 の発現を介して血管周囲の炎症に関与する可能性が示唆されている (Serrats et al., 2010)。したがって BM-MNC 由来 CD163 陽性マクロファージが損傷脊髄にとって結果的に有益であるかどうかを明らかにするためには、さらなる研究が必要であると考えられた。

## 2-5 小括

ラット脊髄損傷モデルに対するBM-MNCによる血管新生促進効果の機序を明らかにするために、移植したBM-MNCの脊髄微小血管構成細胞への分化能を明らかにした。結果、血管内皮、周皮細胞およびアストロサイトといった細胞への分化はごくわずかであった一方、BM-MNC由来のマクロファージが血管壁に接着するという特徴的挙動が明らかとなった。骨髄由来マクロファージは損傷組織に遊走し、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ことからBM-MNC移植療法においても、同様の機序によってマクロファージが血管新生を促進している可能性が推測された。



**Fig 1.** Fate of transplanted bone marrow-derived mononuclear cells expressing EGFP. (A–D), Survivability of transplanted BM-MNC at the injured spinal cord. Scale bars = 500  $\mu$ m. (A, B), EGFP<sup>+</sup> cells are observed at the transplantation site 3 and 7 days post injury (DPI). (C, D), EGFP<sup>+</sup> cells drastically decrease in number at 14 DPI and completely disappear at 21 DPI. (E–H), Localization of transplanted BM-MNC. Scale bars = 200  $\mu$ m. (E), EGFP<sup>+</sup> cells are mainly distributed in the parenchyma of the injured spinal cord 3 DPI. (F), A number of EGFP<sup>+</sup> cells surround blood vessels 7 DPI. (G), Z-stack reconstruction of tissues boxed in F. Perivascular EGFP<sup>+</sup> cells wrap around blood vessels (white arrowheads), and extend cell processes (black arrowheads). (H), The fraction of blood vessels populated with EGFP<sup>+</sup> cells is significantly higher at 7 DPI than at 3 DPI. \*,  $p < 0.05$ .

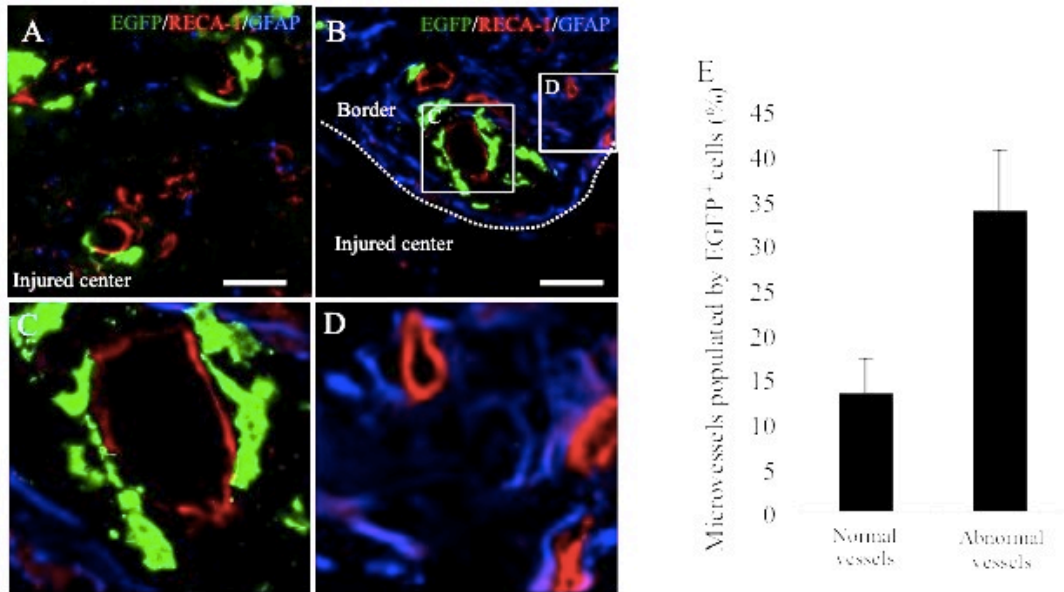


图2 Characteristic of microvessels populated with transplanted BM-MNC at 7 DPI. Scale bars = 50  $\mu$ m.

(A), Microvessels at the injured area. Most of the vessels lose interactions with astrocytes, and part of them are populated with EGFP<sup>+</sup> cells. (B), Microvessels at the border area surrounding injured area. Normal and abnormal vessels losing interactions with astrocytes are intermixed. (C), High magnification image of B. EGFP<sup>+</sup> cells selectively migrate to vessels that have lost interactions of astrocytes. (D), High magnification image of B. Normal vessels with the interaction of astrocyte are not populated by EGFP<sup>+</sup> cells. Scale bars= 50  $\mu$ m. (E), The rates of microvessels populated with EGFP<sup>+</sup> cells. The rate is higher in abnormal vessels lost the interaction of astrocyte than normal vessels.

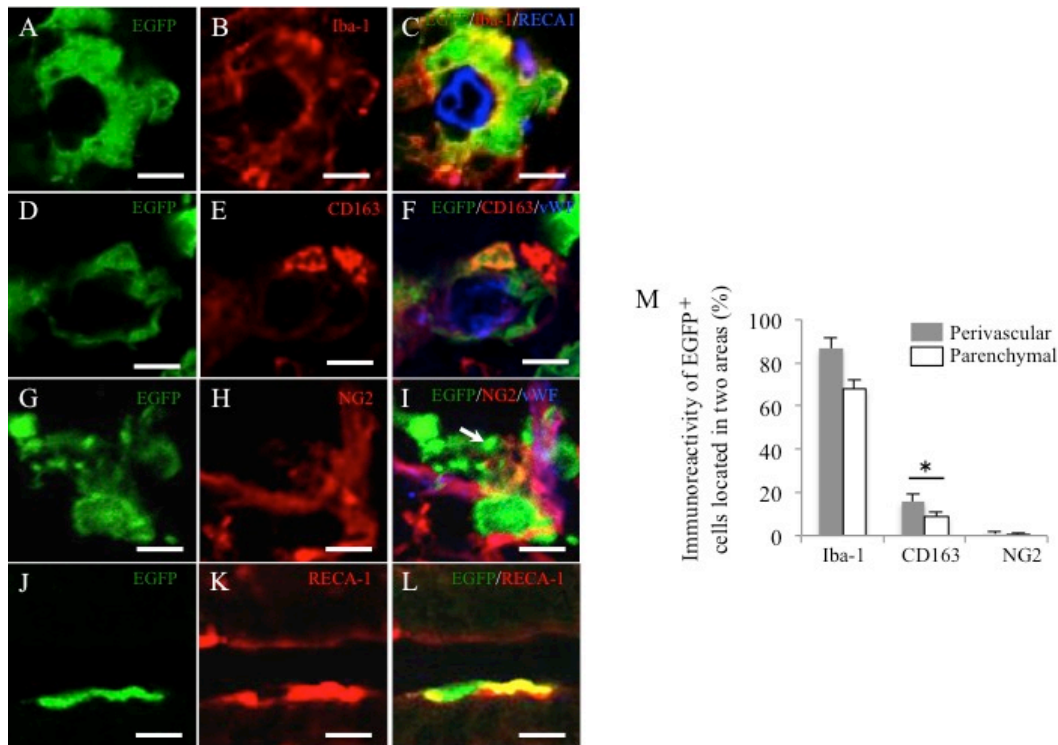


Fig 3. Expression of markers in bone marrow-derived mononuclear cells (EGFP<sup>+</sup>) 7 DPI. Scale bars = 15  $\mu$ m.

(A–C), Immunoreactivity of Iba-1 in EGFP<sup>+</sup> cells localized perivascular area. (A), A number of EGFP<sup>+</sup> cells express Iba-1 (B). (C), Merged image of EGFP, Iba-1, and RECA-1 suggests perivascular localization of macrophages originating from BM-MNCs. (D–F), Immunoreactivity of CD163 in EGFP<sup>+</sup> cells localized perivascular area. (D), An EGFP<sup>+</sup> cell expresses CD163 (E). (F), Merged image of EGFP, CD163, and von Willebrand factor indicates perivascular localization of macrophages derived from BM-MNCs. (G–I), Immunoreactivity of NG2 in EGFP<sup>+</sup> cells localized perivascular area. (G) An EGFP<sup>+</sup> cell expresses NG-2 (H). (I), Merged image of EGFP, NG-2, and von Willebrand factor shows a pericyte originating from BM-MNC (white arrow) and expressing NG-2. (J–L), Immunoreactivity of RECA-1 in EGFP<sup>+</sup> cells. (J), An EGFP<sup>+</sup> cell expresses RECA-1 (K). (L), Merged image of EGFP and RECA-1 shows an endothelial cell originating from BM-MNC and incorporated into vessel wall. (M), Fraction of perivascular and parenchymal EGFP<sup>+</sup> cells expressing Iba-1, CD163, and NG-2. Perivascular EGFP<sup>+</sup> cells express Iba-1 and CD163 more frequently than parenchymal ones. Significant difference is only found in the rate of CD163 expression. \*,  $p < 0.05$ .

### 第3章

ラット損傷脊髄における移植 BM-MNC の成長因子産生能

### 3-1 小序

多くの細胞移植療法において、その治療効果は移植細胞による成長因子のパラクラインによってもたらされる。このような考えは、骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cell: BMSC) がその培養上清の投与でも治療効果をもたらすことが明らかにされたことで急激に浸透した。さらに近年、多発性硬化症モデルにおいて骨髄由来間葉系幹細胞は肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) のパラクラインを介して脊髄保護効果をもたらすことが解明された (Miyazawa et al., 2011)。HGF の受容体 c-Met は損傷後の脊髄において、神経細胞、希突起膠細胞、および星状膠細胞にて up-regulate され、そのシグナルによって細胞死、脱髄、および血液脳関門の破綻を抑制する (Kitamura et al., 2007)。したがって HGF/c-Met signaling は脊髄再生医療において新たな治療ターゲットとして注目されることとなった。骨髄由来単核球 (bone marrow-derived mononuclear cell: BM-MNC) も BMSC と同様に HGF を含めた多様な成長因子産生能を有することが知られ、そのパラクラインによって治療効果をもたらしていると考えられているが詳細な機序は十分に解明されていないのが現状である (Kamihata et al., 2001; Smiler et al., 2010)。骨髄細胞のみを緑色蛍光蛋白 (green fluorescent protein: GFP) に置換したキメラマウスを用いた研究では、人工的に下肢虚血症を発症させると、罹患肢の虚血部に骨髄細胞が遊走し、線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF)、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF)、および単球走化活性因子 (monocyte chemotactic protein-1: MCP-1) といった成長因子を産生することが明らかにされた (Ziegelhoeffer et al., 2004)。これらの成長因子は、HGF と同様に神経系細胞に対して抗アポトーシス効果などの二次損傷抑制効果を有することが知られており (Ma et al., 2007; Madrigal et al., 2009)、脊髄損傷においても BM-MNC が同様の成長因子を産生し、二次損傷抑制効果をもたらしている可能性が推察された。そこで本章では、GFP トランスジェニック SD ラットより採材した GFP 陽性 BM-MNC を急性期脊髄損傷モデルラットの損傷脊髄に直接移植し、免疫組織化学的に移植部位における BM-MNC の生存能および成長因子産生能を解析した。

## 3-2 材料と方法

### 3-2-1 供試動物と実験デザイン

健康な雌の Sprague–Dawley (SD) ラット (215–250g, 10 週齢, Tokyo Laboratory Animal Science, Tokyo, Japan) 26 匹に脊髄圧挫損傷を施した。移植細胞の解析のために 6 匹の脊髄損傷モデルラットに EGFP 陽性 BM-MNC を移植し、EGFP 陽性 BM-MNC 群とした。移植細胞は 3 匹の雄 SD-Tg (CAG-enhanced green fluorescent protein; EGFP) ラット (380–400 g, 10 週齢, Japan SLC, Shizuoka, Japan) から採材し、1 匹から採材した BM-MNC は 2 匹の脊髄損傷モデルラットに移植した。治療効果の確認の為に 20 匹の脊髄損傷モデルラットを BM-MNC 移植群および対照群にそれぞれ 10 匹ずつ使用した。移植細胞は 5 匹の雄 SD ラット (380–400 g, 10 週齢, Tokyo Laboratory Animal Science, Tokyo, Japan) から採材し、1 匹から採材した BM-MNC は 2 匹の脊髄損傷モデルラットに移植した。作製した 3 群のラットは移植 3 および 7 日後に半数ずつ安楽殺し、免疫組織化学的解析に供した。全てのラットは室温 26°C、12:12 時間の明暗周期で飼育した。本章の研究は日本獣医生命科学大学の動物実験委員会によって承認された (Code: 26S-7)。すべての実験動物は日本獣医生命科学大学の動物実験委員によって規定されたガイドラインに従って扱った。

### 3-2-2 BM-MNC の分離

BM-MNC は第 2 章と同じ手法を用いて分離した。すべての BM-MNC は移植前に EGFP 陽性であることを確認した。

### 3-2-3 脊髄損傷と BM-MNC の移植

脊髄損傷と BM-MNC の移植は第 2 章と同じ手法を用いた。



### 3-2-4 組織の処理と免疫組織化学

パラホルムアルデヒドを用いた経心臓還流固定を実施するためにラットにイソフルランを用いて深麻酔を施した。ラットは透明なイソフルラン還流ボックスの中で観察し、呼吸が停止したことを2分間以上確認した。ラットの左心室から生理食塩水 100ml を還流させた後、4% パラホルムアルデヒド (Nakarai, Tokyo, Japan) / 0.1 M リン酸緩衝液 (Wako, Osaka, Japan) 100ml を還流させ、安楽殺と同時に組織固定を実施した。損傷中心を含んで脊髄を 1.5cm の長さで採材し、還流液と同じ固定液を用いて後固定を 12 時間実施した。固定後、右側の脊髄は凍結切片用に処理した。すなわち凍結保護のために 30%スクロースに 1 日浸漬、置換し、O.C.T compound にて包埋した。組織はクライオスタット (SM2010R; Leica, Hessen, Germany) を用いて 10  $\mu$  m に薄切した。一方、左側の脊髄はパラフィン包埋し、ミクロトーム (CM1850; Leica, Hessen, Germany) を用いて 3  $\mu$  m に薄切した。パラフィン切片は常法に従ってヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色およびルクソールファストブルー (LFB) 染色を実施した。免疫組織化学は凍結切片およびパラフィン切片を用いて常法に従って実施した。すなわち、5%ヤギ血清 (Dako, Glostrup, Denmark) を 30 分間処理して非特異反応をブロッキングした後、マウス一次抗体 [抗原 : GFP (1:300; Wako, Osaka, Japan), VEGF (1:200; Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) および CNPase (1:300; Dako, Glostrup, Denmark)] あるいはウサギ一次抗体 [glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1:500; Dako, Glostrup, Denmark), cleaved-caspase-3 (1:100; Cell Signaling Technology, MA, USA), HGF (1:50; Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), MCP-1 (1:500; Abcam, Cambridgeshire, UK), および von Willebrand factor (vWF; prediluted; Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan) ] を 4°C で一晩インキュベートした。PBS で 3 回洗浄した後、二次抗体 [Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse (1:500; Molecular Probes, OR, USA) あるいは Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit antibodies (1:500; Molecular Probes, OR, USA) ] を室温で 30 分間インキュベートした。切片は DAPI を含む VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories, CA, USA) で封入し、核染色をした。陰性コントロールは一次抗体の代わりに mouse IgG<sub>1</sub> negative control (Dako, Glostrup, Denmark) あるいは rabbit Ig fraction negative control (Dako, Glostrup, Denmark) をインキュベートした。

### 3-2-5 移植した BM-MNC の評価と治療効果の評価

BM-MNC の生存能および成長因子産生能を解析するために、EGFP 陽性細胞における cleaved-caspase-3, HGF, MCP-1, および VEGF の陽性を移植 3 および 7 日後に解析した。切片は 100  $\mu$  m おきに 3 枚作製し、それぞれの損傷中心部からランダムに 3 視野[high power field (HPF)、合計 9 視野選択した。取得した画像を用いて、EGFP 陽性 BM-MNC における種々の抗原に対する陽性陽性率を評価した。治療効果の解析のために、移植 3 および 7 日後における BM-MNC 群および対照群の cleaved-caspase-3 陽性細胞数および CNPase 陰性率を 100  $\mu$  m おきに作製した 3 枚の切片を用いて算出した。過去の報告において cleaved-caspase-3 陽性細胞は脊髄損傷周辺部において中心部よりも高頻度に観察されることが報告されている(McEwen et al., 2005)。従って本検討では評価領域を損傷中心領域 [epicenter zone (EZ): 0–1000 mm from the epicenter] およびその周辺領域[marginal zone (MZ): 1000–2000 mm from the epicenter] の 2 領域に分けて評価した。CNPase 陰性率は以下の計算式によって算出した [CNPase-negative area/total spinal cord area (4000-mm range in the cranial and caudal directions)]。すべての切片は ApoTome (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて観察し、Image J 1.48v software (NIH, MD, USA) を用いて解析した。

### 3-2-6 運動機能評価

後肢運動機能の評価するために、ラット脊髄損傷モデルのために開発された Basso–Beattie–Bresnahan (BBB) Locomotor Rating Scale を用いた (Basso et al., 1995)。この運動機能評価指標は股関節、膝関節、および足根関節の可動性あるいは前後肢の連動性から 22 段階の運動機能レベルに分類されている(0: 完全麻痺–21: 正常)。運動機能は移植から安楽殺まで毎日 [損傷 1–3 日後 (n = 10 per group), 4–7 (n = 5 per group)] 評価した。損傷 1 日後の評価は術後 24 h 後に行い、その後 24 時間毎に評価した。それぞれの群のラットは独立した二人の評価者によって 4 分間評価した。

### 3-2-7 統計

データは正規性検定および分散分析後、Student's *t*-test あるいは Mann-Whitney *U*-test にて統計解析した。CNPase 陰性率（脱髄率）の比較のために Student's *t*-test を用いた。Cleaved-caspase-3 陽性細胞数の比較のために Student's *t*-test あるいは Mann-Whitney *U*-test を用いた。P 値 0.05 以下をもって有意差ありとした。全ての統計データは SPSS version 16.0 (IBM, NY, USA) を用いて解析し means  $\pm$  standard errors of the mean (SEMs) で示した。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 移植した BM-MNC の生存能

EGFP を発現する移植した BM-MNC は、注射部位を中心に周囲に瀰漫性に拡散するように認められた。脊髄外への流出および脊髄尾側方向への偏在は認められなかった。EGFP 陽性細胞が認められた脊髄領域は頭尾方向において移植 3 日後は  $2880 \pm 151 \mu\text{m}$ 、7 日後は  $2593 \pm 303 \mu\text{m}$  であり、有意な差が認められなかった。一方 EGFP 陽性細胞の細胞密度は移植 3 日後 ( $683 \pm 83 \text{ cells/mm}^2$ ) から 7 日後 ( $395 \pm 64 \text{ cells/mm}^2$ ) にかけて減少傾向を認めた (図 1A,B)。一部の EGFP 陽性細胞は核および細胞質の断片化を呈し、cleaved-caspase-3 に陽性を示した。移植 3 日および 7 日後における cleaved-caspase-3 の陽性率はそれぞれ  $1.90 \pm 0.873\%$  (図 1C-F) および  $3.07 \pm 1.49\%$  (図 1F) だった。移植 3 から 7 日目に陽性率が増加したが有意差は得られなかった。免疫組織化学は実施していないが、移植 3 日後までは分葉核をもつ成熟好中球から高 N/C 比を呈する血液幹細胞様細胞やリンパ球様細胞まで多様な EGFP 陽性骨髄由来細胞が観察された。一方移植 7 日後には成熟好中球やリンパ球は消失し、生存している EGFP 陽性細胞の多くは中から大型核を有する類円形から紡錘形の細胞によって構成されていた。

#### 3-3-2 移植した BM-MNC の成長因子産生能

移植した BM-MNC は HGF、MCP-1、および VEGF に陽性を呈した (図 2A-J)。BM-MNC における HGF、MCP-1、および VEGF の移植 3 日後の陽性率は  $18.2\% \pm 3.77\%$ 、 $13.3\% \pm 3.74\%$ 、および  $9.52\% \pm 2.84\%$  であった。移植 7 日後の陽性率は  $22.8\% \pm 1.13\%$ 、 $5.22\% \pm 1.89\%$ 、および  $8.8\% \pm 3.32\%$  であった。成長因子間の陽性率に有意差はなかったが、移植 3 および 7 日後共に、HGF の陽性率が最も高かった (図 2K)。

#### 3-3-3 BM-MNC 移植による治療効果

損傷組織は背索および背角から一部腹索および腹角にかけて認められた (図 3A-D)。損傷組織に

において変性した好酸性物質の沈着および出血に加え、多数の炎症細胞の浸潤が認められた。炎症細胞は損傷3日後には主に好中球によって構成され、損傷7日後では主としてマクロファージに置換されていた(図3E)。マクロファージは赤血球および好酸性物質を貪食し、好酸性物質の一部はLFB染色において陽性を示した(図3F)。他家移植に起因した免疫反応、たとえばリンパ球集簇やマクロファージによる有核細胞の貪食は観察されなかった。損傷部におけるマクロファージの浸潤細胞数はBM-MNC群と対照群の間に差は認められなかった[損傷3日後:  $91.60 \pm 14.24$  cells vs.  $87.87 \pm 21.96$  cells/HPF;  $P = 0.890$ ]、7日後( $175.33 \pm 14.42$  cells vs.  $195.64 \pm 23.96$  cells/HPF;  $P = 0.488$ )それぞれ対照群 vs. BM-MNC群]。CNPase陰性領域を脱髄あるいは軟化巣と定義しその領域を解析したところ、対照群では背索および背角から一部腹索および腹角にかけて脱髄あるいは軟化領域を認めた。一方BM-MNC群では腹索および腹角における脱髄あるいは軟化巣は一部でしか認められなかった(図3G, H, and K)。脱髄あるいは軟化領域は対照群およびBM-MNC群ともに移植3から7日後にかけて頭尾および背腹方向に拡大したが、BM-MNC群における変化は比較的緩徐であった(図3I, J, and K)。脱髄あるいは軟化領域を定量化したところ、移植3日後では対照群で $24.44\% \pm 2.09\%$ であったのに対して、BM-MNC群では $14.62\% \pm 2.69\%$ だった( $P = 0.011$ ; 図3G, H, and K)。また、移植7日後では対照群で $39.94\% \pm 6.23\%$ であったのに対して、BM-MNC群では $20.90\% \pm 2.42\%$ だった( $P = 0.011$ ; 図3I, J, and K)。アポトーシス抑制効果を評価するためにEZおよびMZ(図4)におけるcleaved-caspase-3に対する反応性を評価したところ、同抗原に陽性を呈する細胞は対照群およびBM-MNC群共に、損傷中心部の周辺領域(MZ)において最も高頻度に認められた。移植3日後のBM-MNC群におけるcleaved-caspase-3陽性細胞数はEZおよびMZ共に対照群よりも有意に減少していた[EZ( $1.58 \pm 0.84$  cells vs.  $4.51 \pm 2.17$  cells/HPF;  $P = 0.005$ ; Fig. 5A, C, and I)、MZ( $6.22 \pm 1.34$  cells vs.  $10.2 \pm 1.94$  cells/HPF;  $P = 0.009$ ; 図5B, D, and I)]。一方移植7日後においては有意差が認められなかった(図5I)。

### 3-3-4 後肢運動機能評価

対照群およびBM-MNC群における全てのラットは移植24時間後のBBBスコアは7以下であ

った。運動機能の改善を示す BBB スコアの上昇は対照群および BM-MNC 群共に経時的に観察され、移植 3 日後までその上昇率は同程度であった。しかし移植 3 日目以降 BM-MNC 群の BBB スコアは対照群よりも高い上昇率を示し、移植 7 日後に有意差を認めた( $13.4 \pm 0.24$  vs.  $11.8 \pm 0.58$ ;  $P = 0.035$ ; 図 6)。

### 3-4 考察

本章ではBM-MNCをGFPでトラッキングすることで急性期における脊髄実質移植後の細胞生存能および成長因子産生能を明らかにした。BM-MNCは第四脳室から投与した場合、損傷部位に少数の移植細胞が到達するが、移植3日後には完全に消失してしまうことが報告されている(Yoshihara et al., 2007)。一方、本研究で実施した脊髄実質投与方法では移植7日後でも損傷部位に多数の移植細胞を確認した。このことから、脊髄実質投与方法は移植細胞を損傷部位に供給する上で、極めて効率的な手法であると考えられた。移植したBM-MNCは移植3日後から7日後にかけて急激に減少した。減少した原因として、脳脊髄液の流向に従って脊髄尾側へ移行した可能性、骨髄へのホーミング、細胞死が推察されたが、一部の移植細胞は核および細胞質の断片化、cleaved-caspase-3への陽性を示したことから、少なくとも一部はカスパーゼ依存性アポトーシスに起因していると考えられた。

BM-MNCは損傷脊髄においてHGF、MCP-1、およびVEGFを持続的に産生することが明らかとなった。特にHGFを産生する細胞の割合が高く、移植したBM-MNCの17から23%が持続的にHGFを産生することが明らかとなった。このことからBM-MNC移植療法は損傷脊髄にHGFを持続的に供給するうえで有効な手法であると考えられた。HGFはマウス肝硬変、腎虚血、および筋萎縮性側索硬化症モデルにおいて抗アポトーシスを介した組織保護効果をもたらすことが報告されている(Kosai et al., 1998; Sun et al., 2002; Mizuno et al., 2005)。これらの研究からHGFは受容体c-Metを発現する組織のあらゆる疾患に対する治療効果が期待されている。正常脊髄においてc-Metは全ての神経系細胞において発現が確認されているが、HGFは組織の恒常性維持には関与せず、疾患の発症に伴って発現が誘導される。内因性のHGFは主に活性化星状膠細胞によって産生されるが、組織濃度の上昇は緩徐であり、特に甚急性期ではc-Metの発現に対してHGFの供給が十分ではない状態にある(Kitamura et al., 2007)。このことは急性期にHGFを投与することで組織保護効果が得られた研究からも明らかである(Kitamura et al., 2011)。従って、BM-MNC移植療法は欠乏状態にあるHGFを供給することで治療効果をもたらしている可能性が推察された。本研究ではHGFの他に、BM-MNCにおけるMCP-1およびVEGFの産生を確認した。これらの成長

因子が BM-MNC 移植療法の治療効果にどの程度関与しているのか、本研究では明らかにできなかったが、内因性 VEGF や MCP-1 の損傷脳や脊髄での産生量は 3 から 4 日程度ですぐに最大となることが知られている (Sköld et al., 2005; Pineau et al., 2010)。従ってこれらのシグナルを介して得られた治療効果はあっても限定的であると推察された。

本研究では BM-MNC 移植群において cleaved-caspase-3 陽性細胞の数が損傷 3 日後の損傷中心及びその周辺領域で対照群よりも有意に減少することが明らかとなった。アポトーシスによる細胞死は脊髄損傷後 1 週間以上収束することなく持続的に発生する (Liu et al., 1997; Casella et al., 2008)。Caspase-3 はアポトーシスシグナルの下流で働き、Fas や TNF $\alpha$  などの TNF ファミリーやミトコンドリアストレスによって活性化され、DNA の断片化を誘導する。従って caspase3 の cleavage (活性化) が抑制されたことは、これらのデスシグナルの入力が減少したこと、あるいはアポトーシス抑制シグナルが働いた可能性を示唆する。本章では詳細な機序まで明らかにすることはできなかったが、少なくとも一部は BM-MNC による成長因子の産生、特に発現率の高かった HGF の産生分泌、同受容体のシグナル活性化を介している可能性が推察された。

これまでの BM-MNC 移植療法の急性期脊髄損傷に対する治療効果に関する研究では、急性期において軸索変性が抑制されることが明らかにされているが、本研究によって強力な脱髄抑制効果も明らかとなった。脊髄損傷における軸索変性は物理的損傷(一次損傷)による尾側へのワーラー変性の他、脱髄による Ca イオンの過剰流入によっても生じる。従って BM-MNC 移植療法は脱髄の抑制を介して軸索保護効果をもたらしている可能性も考えられた。本章において運動機能の改善は移植 7 日後に確認された。運動機能の回復がどのような機序によってもたらされているのか明らかにできなかったが、BM-MNC を移植したことで軸索が再生し神経回路の再構築が誘導されたこと、あるいは二次損傷の抑制による微小環境の正常化に伴って、神経軸索の電気生理学的な伝導機構が回復したことが推察された。

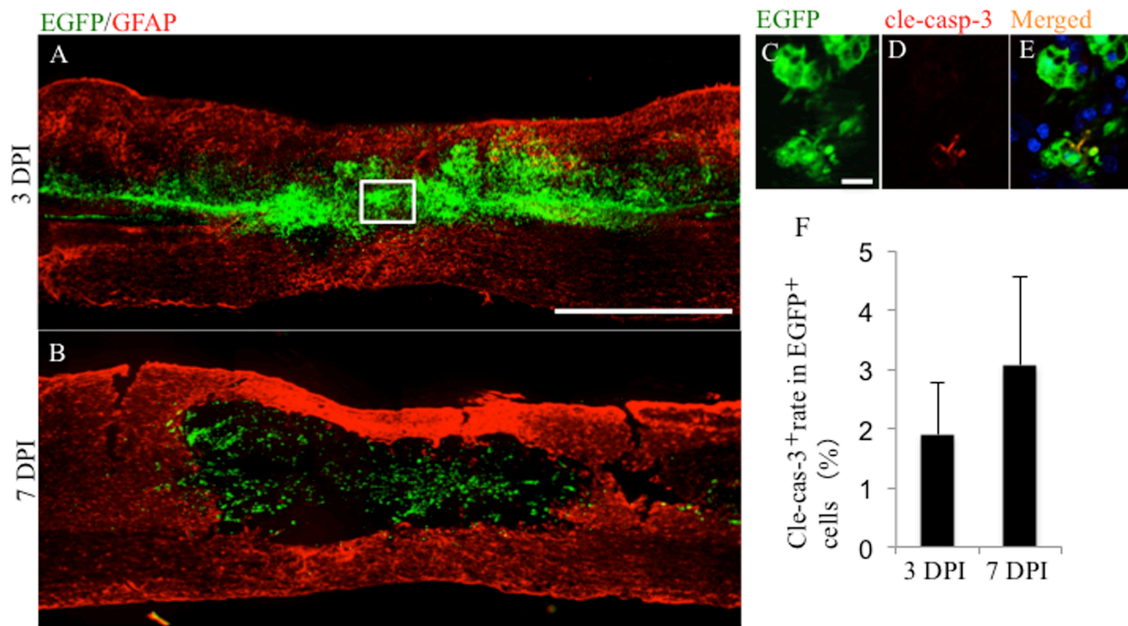
本章では移植細胞のトラッキングのために、近年汎用されている EGFP-Tag SD rat と SD ラット間での同種他家移植を行った。SD ラットは近交系ではないため他家移植によって甚急性あるいは急性の拒絶反応が惹起される可能性が懸念された。しかし、拒絶反応を示唆するリンパ球の集



簇や宿主マクロファージによる GFP 陽性細胞の貪食は確認されなかったこと、さらに組織保護効果が再現されたことからその影響は限定的であったと考えられる。

### 3-5 小括

BM-MNC 移植療法の急性期損傷脊髄に対する作用機序を明らかにするために、BM-MNC の生存能、成長因子産生能、および治療効果を解析した。結果、BM-MNC は移植部位に1週間以上とどまり、HGF、VEGF、およびMCP-1といった成長因子を継続的に産生し、損傷脊髄に抗アポトーシス効果および脱髄抑制効果をもたらすことが明らかとなった。このことから、BM-MNC 移植は損傷脊髄に成長因子を供給するうえで有効な手法であると考えられた。また、BM-MNC による急性期脊髄損傷に対する治療効果はこれらの成長因子、特に発現率の高かったHGFのパラクラインによってもたらされる可能性が推察された。



⊗ 1. Immunohistochemical evaluation of transplanted BM-MNC (EGFP<sup>+</sup> cells) in a rat model of acute spinal cord injury.

(A, B), Survivability of transplanted EGFP<sup>+</sup> cells. Scale bar = 1000  $\mu$  m. (A), Transplanted EGFP<sup>+</sup> cells (green) are observed at the epicenter of the injury site, with a high cell density spread in the cranial and caudal directions over the injury area. (B), The number of cells has decreased at 7 days post injury (DPI). GFAP (red) is merged to clarify the lesion site in A and B. Scale bar = 1 mm. (C–F) Activation of caspase-3 in transplanted EGFP<sup>+</sup> cells. (C), A few EGFP<sup>+</sup> cells immunoreact with cleaved-caspase-3 (red; D). Scale bar = 10  $\mu$  m. (E), A merged image of C and D. An EGFP<sup>+</sup> cell shows co-localization with cleaved-caspase-3 at 3 DPI. EGFP<sup>+</sup> cells were selected from the center of the lesion area, as shown in a white square of A. (F), The rates of cleaved-caspase-3 immunoreactivity in EGFP<sup>+</sup> cells can be observed at the two time points.

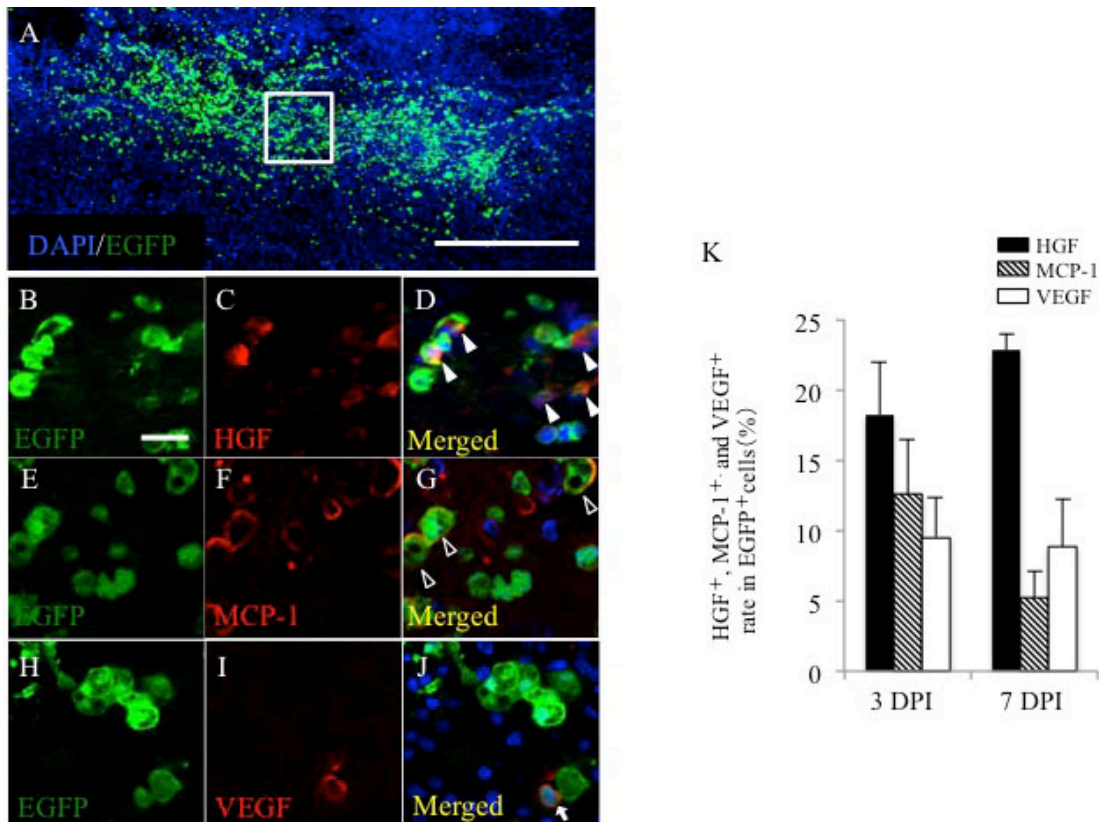


Figure 2. Production of growth factors by transplanted BM-MNC at 3 DPI.

(A), The produced growth factors were investigated in the transplanted BM-MNCs located in the central area, as demarcated by the white square. Scale bar = 500  $\mu$ m. (B), EGFP<sup>+</sup> cells immunoreact with HGF (C). Scale bar = 10  $\mu$ m. (D), A merged image showing co-localization of EGFP and HGF at 3 DPI. EGFP<sup>+</sup> cells strongly express HGF, as indicated with white arrowheads. (E), EGFP<sup>+</sup> cells immunoreact with MCP-1 (F). (G), A merged image showing co-localization of EGFP and MCP-1 at 3 DPI. The black arrowheads indicate cells expressing MCP-1. (H), EGFP<sup>+</sup> cells immunoreact with VEGF (I). (J), A merged image showing co-localization of EGFP and VEGF at 3 DPI. The white arrow indicates a cell expressing VEGF. (K), The percentage of EGFP<sup>+</sup> cells immunopositive for different growth factors at 3 and 7 DPI. HGF is highly expressed at both 3 and 7 DPI. Furthermore, some of the cells also express MCP-1 and VEGF.

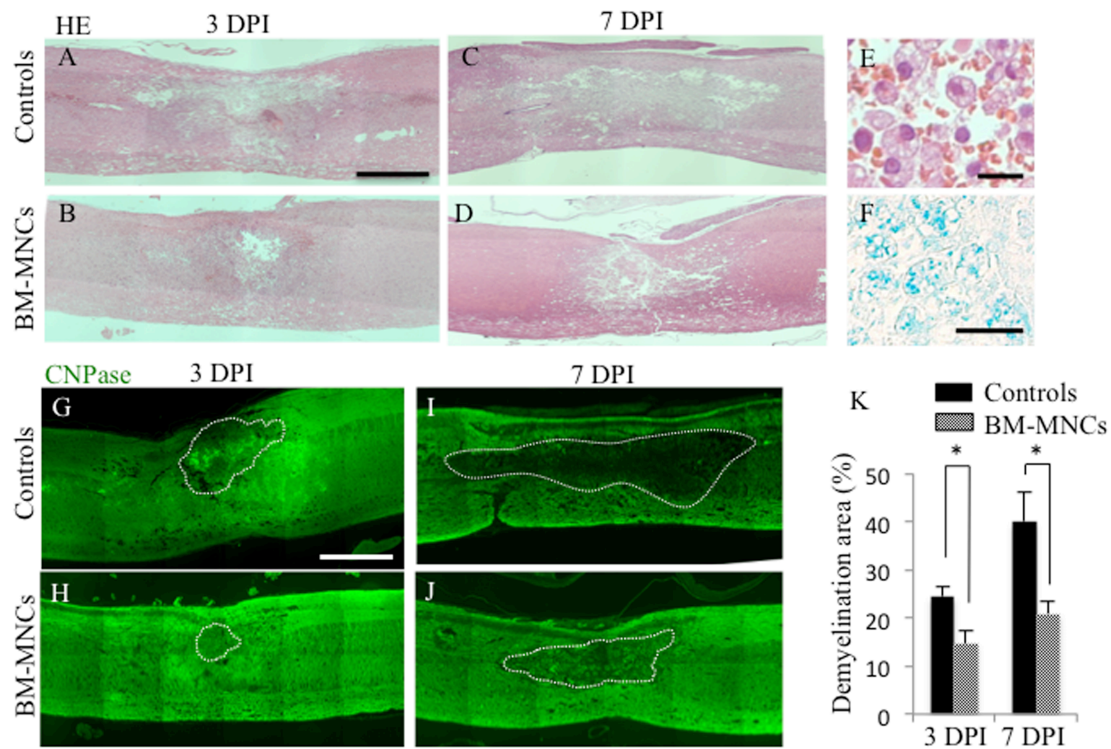
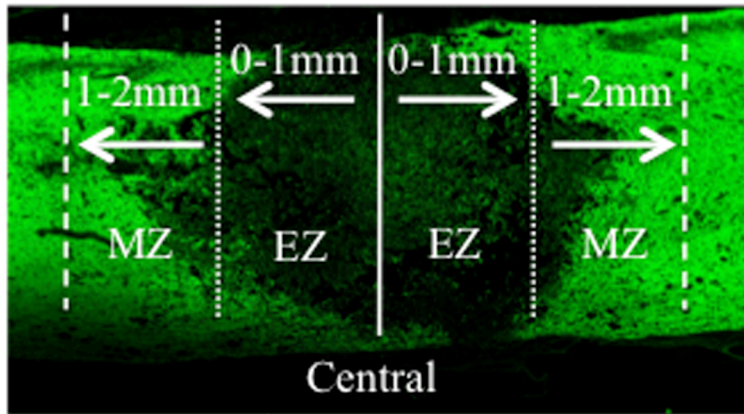


Figure 3. Therapeutic effects of BM-MNC.

(A–D), Histopathological changes in the control and BM-MNC-transplanted groups at 3 and 7 days after spinal cord injury. HE stain. Scale bar = 1 mm. (A, B), The spared tissue area is obviously larger in the control group than in the BM-MNC-transplanted group at 3 DPI. (C, D), Expansion of the spared area is obviously suppressed in the BM-MNC-transplanted group at 7 DPI. (E), A high-magnification image of the spared area stained with HE in the control group at 3 DPI. Infiltration of macrophages and hemorrhage are observed. Scale bar = 20  $\mu$ m. (F), Evaluation of scavenged substance by macrophage. Degenerated myelin stained with LFB is scavenged by infiltrating macrophages in the control group at 3 DPI. Scale bar = 20  $\mu$ m. (G–J), Evaluation of demyelinated area. (G, H), The CNPase-negative area is obviously larger in the control group than in the BM-MNC-transplanted group at 3 DPI. (I, J), Expansion of CNPase-negative area is obviously suppressed in the BM-MNC-transplanted group at 7 DPI. Scale bar = 1 mm. The demyelinated area is shown by the white dotted line. (K), Comparison of demyelinated area between control and BM-MNC group. The demyelinated area is significantly smaller in the BM-MNC-transplanted group than in the control group at 3 and 7 DPI (\* $P < 0.05$ ).



☒ 4. The definition of epicenter and marginal zones in a rat model of acute spinal cord injury. The epicenter zone (EZ) is defined as the area of injury in the gray matter within 1.0 mm from the injury epicenter. The marginal zone (MZ) is defined as the gray matter area 1.0–2.0 mm away from the injury epicenter.

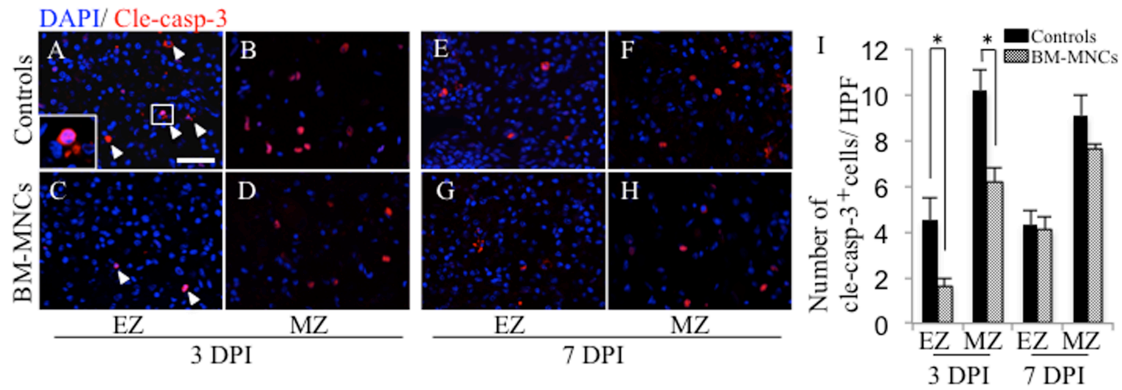


Figure 5. Anti-apoptotic effect of BM-MNC.

(A–H), Immunoreactivity of cleaved-caspase-3 in the Epicenter zone (EZ) and Marginal zone (MZ) of control and BM-MNC-transplanted groups at 3 and 7 days after spinal cord injury. EZ (A) and MZ (B) in the control group at 3 DPI. Scale bar = 50  $\mu$ m. EZ (C) and MZ (D) in the BM-MNC-transplanted group at 3 DPI. EZ (E) and MZ (F) in the control group at 7 DPI. EZ (G) and MZ (H) in the BM-MNC-transplanted group at 7 DPI. A high-magnification image of a cleaved-caspase-3 immunopositive cell marked with a white square is shown in A. The immunoreacted cells are shown by white arrowheads in A and C. (I), Comparison of cleaved caspase-positive cells between control and BM-MNC group. Number of cleaved-caspase-3 immunopositive cells is significantly higher in EZ and MZ in the control group than in EZ and MZ in the BM-MNC-transplanted group at 3 DPI (\* $P < 0.05$ ). There is no significant difference at 7 DPI.

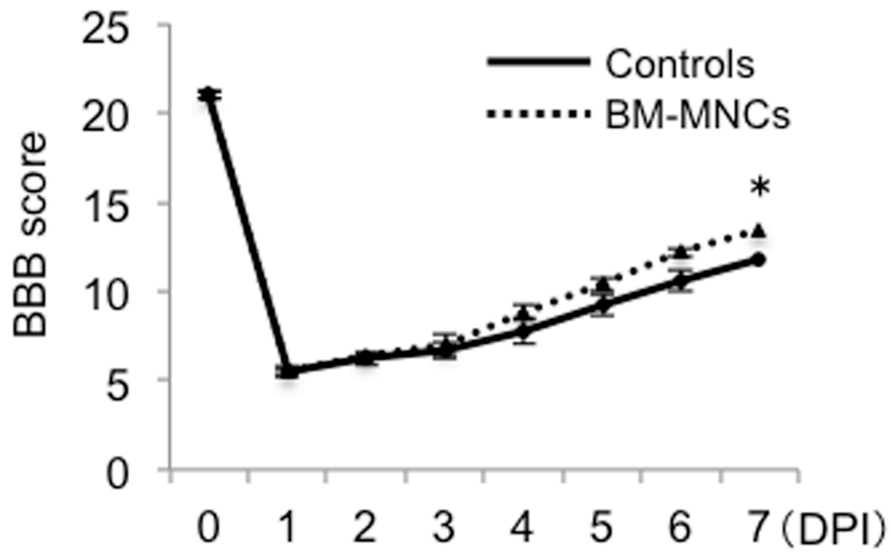


Figure 6. Evaluation of hindlimb function with BBB scores in the control and BM-MNC-transplanted groups at 3 and 7 days after spinal cord injury. The BBB score at 7 DPI is significantly higher for the BM-MNC-transplanted group than for the control group (\*P < 0.05).



## 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

#### 4-1 小序

脊髄損傷や脳損傷の急性期では炎症ストレスや低酸素状態によって、神経細胞内で活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) の産生が誘導される (Xu et al., 2005; Bains and Hall., 2012)。ROS はミトコンドリアによって産生されるが、組織に浸潤した好中球による放出も受ける (Neirinckx et al., 2014)。外部ストレスによって細胞内に急激に Ca イオンが流入すると、ROS の一種である超酸化物が生成される。超酸化物は酸化還元反応を繰り返し、過酸化水素や毒性の高いヒドロキシラジカルを生成する (Bains and Hall., 2012)。細胞質に大量に貯留した ROS は細胞に備わる抗酸化作用を上回ると細胞の脂質やタンパク質を酸化し、ネクローシス性細胞死を誘導する (Fiers et al., 1999)。また ROS はミトコンドリアからチトクローム c やアポトーシス誘導因子の放出を促し、カスパーゼ依存性アポトーシスを誘導する (Fiers et al., 1999)。このような背景から、脊髄損傷や脳損傷の急性期ではメチルプレドニゾロンを始めとした、様々な抗酸化治療が試みられている (Bains and Hall., 2012)。BM-MNC 移植療法は脊髄損傷急性期において細胞死を抑制し、損傷領域の拡大を抑える効果がある。しかし、その詳細な機序は十分に解明されていない。我々は第 2 章において移植した骨髄単核細胞 (bone marrow-derived mononuclear cell: BM-MNC) の高い肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) 産生能を明らかにした。HGF は RAS-related C3 botulinus toxin substrate-1 (Rac-1) の活性を抑えて細胞内 ROS の産生を抑制し、細胞死抑制効果をもたらすことが報告されている (Ozaki et al., 2003)。このことから BM-MNC 移植療法は HGF のパラクラインを介した ROS の産生抑制によって神経細胞保護効果をもたらす可能性が推察された。この仮説に基づいて、本章では神経細胞モデルであるラット褐色細胞腫株 (PC12) を用いて BM-MNC による神経細胞保護効果の機序を解析した。

また、脊髄損傷に対する重要な治療ターゲットとして、細胞保護効果の他に神経軸索の再生促進効果が挙げられる。BM-MNC は神経細胞保護効果をもたらすことが多数の研究により明らかにされてきたが、軸索再生を促進する効果、特に成体中枢神経系細胞に対する効果は解析されていない。これまでに、BM-MNC は軸索伸展阻害物質分解酵素の産生能、そして末梢神経に対する軸索伸展促進効果が報告されている (Coulson-Tomas et al., 2008; Zaverucha-do-Valle et al., 2014)。本章

では、BM-MNC の脊髄損傷に対する軸索再生効果を明らかにするために、成体由来大脳皮質神経細胞を用いて中枢神経に対して突起伸展促進効果をもたらすかどうかを解析した。

## 4-2 材料と方法

### 4-2-1 PC12 細胞の培養と細胞処理

PC12 細胞株は RIKEN cell bank より購入した。PC12 細胞は 10cm dish に播種し、Dalbeco' s modified eagle medium (DMEM; Sigma) に 10% horse serum (Gibco)、5% fetal bovine serum (Sigma)、および 1% antibiotics-antimycotics (Gibco) を添加した培地で、5% CO<sub>2</sub>、37°C の加湿環境下で培養した。細胞密度が 80-90% に達したことを確認し、0.05w/v% トリプシン-0.53mmol/l EDTA・4Na 溶液 (Wako) で細胞を剥離後、 $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞濃度で継代した。PC12 細胞はアポトーシス誘導前に DMEM (Sigma) に 1% horse serum (Gibco)、0.5% fetal bovine serum (Sigma)、および 1% antibiotics-antimycotics (Gibco) を添加した低血清培地によって 24 時間培養した。PC12 細胞は 6 あるいは 96well プレートに播種した。細胞を 24 時間培養した後、BM-MNC 培養上清 ( $1 \times 10^5$  cells、 $5 \times 10^5$  cells、 $1 \times 10^6$  cells /ml) あるいはネコ組み替え HGF (日本全薬工業; 終濃度 100ng/ml あるいは 500ng/ml) を添加した。HGF/c-Met signaling 阻害のために BM-MNC 培養上清に c-Met 阻害剤 SU11274 (Wako) を終濃度  $1 \mu\text{M}$  で添加した。細胞死は塩化コバルト (Wako) を終濃度  $500 \mu\text{M}$  で処理することで誘導した。塩化コバルトは点酸素状態を誘導し、活性酸素の産生量を増加させ、Bcl-2 および Bcl-xl の発現を抑制することでアポトーシスおよびネクローシスを誘導する。陰性対照は塩化コバルトの処理なしで培養した。陽性対照は塩化コバルト処理のみを行った。

### 4-2-2 成体ラット由来初代大脳皮質神経細胞の分離と BM-MNC との共培養

成体ラット由来初代大脳皮質神経細胞は Brewer と Torricelli の報告に従いながら、多少の改良を加えて実施した (Brewer and Torricelli., 2007)。他の実験 (26S-7; 26S-8) で安楽殺した成体ラット (SD, 雄, 10 週齢) の大脳皮質を滅菌下で摘出し、メス刃を用いて髄膜を完全に除去した後、径 1mm 以下に細断した。細断した組織は組織分解液 [6ml HibernateA-Ca (Gibco)、0.2% Papain (Worthington)、0.5m MGlutamax (Gibco)] を用いて 30°C で 30 分間処理し、酵素処理した。先端をあぶって丸くしたシリコン製ピペットを用いて、処理した組織を 45 秒で 10 回出し入れし、さら

に分解した。約 1 分間組織溶解液を静置し、上清を回収した。Optiprep (1.320g/ml) を HibernateA (Gibco) / B27 (Invitrogen) で 4 段階の濃度に希釈し、これらを重層することで比重勾配を作成した。酵素処理で融解した成体ラット大脳皮質を作成した比重液に重層し 800g、22°C で 15 分間遠心した。遠心後、5 層に分かれた分画のうち、神経細胞を含んでいる最下層から 2 および 3 番目の層を回収した。密度勾配液を除去するために、HibernateA/B27 を添加し、200g で 2 分間遠心した。沈渣は NeurobasalA / B27 で溶解し、Poly-D-Lysin でコートしたカバースリップ (Mastunami) 上に  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種した。カバースリップは 12well プレート中で培養し、分離 24 時間後、共培養のために各 well へ cell culture insert (Corning) を挿入した。このインサートは同じ well 中に別種の細胞を細胞間相互作用なしで共培養することを可能にする。インサート中に BM-MNC ( $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ ) あるいは HGF (終濃度 100、500nM) を添加し、72 時間後に突起伸長を評価した。

#### 4-2-3 BM-MNC の分離と培養上清の作成

BM-MNC は他の実験 (26S-7; 26S-8) で安楽殺したラットから採材した。BM-MNC は低血清培地を用いて  $1 \times 10^5$  cells、 $5 \times 10^5$  cells、あるいは  $1 \times 10^6$  cells /ml の細胞濃度に希釈し、3cm dish を用いて 24 時間培養した。対照は細胞を含まずに培養した。培養後、上清を回収し孔径  $0.2 \mu\text{m}$  のメンブレンフィルターに通して BM-MNC 培養上清を得た。培養上清は  $-30^\circ\text{C}$  で凍結保存した。

#### 4-2-4 細胞生存能の解析

PC12 細胞は低血清培地に  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞濃度で懸濁し、96 well プレートで 24 時間培養した。細胞を 4-2-1 で記述した方法で処理した後、各 well に cell counting kit-8 (Dojin) を  $10 \mu\text{l}$  ずつ添加した。インキュベーター内で 2 時間呈色反応させた後、マイクロプレートリーダー で 450 nm の吸光度を測定した。

#### 4-2-5 アポトーシスの検出

PC12 細胞は低血清培地に  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞濃度で懸濁し、6 well プレートで 24 時間培養した。細胞を 4-2-1 で記述した方法で処理した後、0.05w/v% トリプシン-0.53mmol/l EDTA・4Na 溶液 (Wako) を用いて細胞を剥離した。細胞を PBS および Binding buffer で洗浄後、Human-Annexin V-FITC を 5  $\mu$ l 添加し室温で 10 分間インキュベートした。Annexin V 陽性細胞は FACS (BD FACSCaliber; BD Bioscience) を用いて検出した。

#### 4-2-6 ウェスタンブロッティング

PC12 細胞は低血清培地に  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞濃度で懸濁し、6 well プレートで 24 時間培養した。細胞を 4-2-1 で記述した方法で処理した後、PBS で 2 回洗浄した。細胞は protease inhibitor cocktail (Cell signaling) を用いて溶解し 12000g で 10 分間遠心した。遠心後、上清を回収し DC protein assay kit (Bio-Rad) を用いてタンパク質濃度を測定した。タンパク質溶解液に 150mM Dithiothreitol、6% sodium dodecyl sulphate、187.5mM Tris-HCL pH 6.8、30% Glycerol、および 0.03% Bromophenol blue を添加し、95°C で 5 分間煮沸した。処理したタンパク質は 10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) で電気泳動し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Atto) に転写した。タンパク質を転写した PVDF 膜は非特異反応を抑えるためにブロッキング試薬 (Ez Block Chemi; Atto) を 45 分間室温でインキュベートした。Tris buffered saline-tween 20 (TBST) で 2 回洗浄後、一次抗体としてマウスモノクローナル抗体 [c-Met (1:500; Santa crus)、GAPDH (1:1000, Abcam)] あるいはウサギポリクローナル抗体 [phospho-Met (1:50; IBL)、HGF (1:50; IBL)、Bcl-2 (1:500; Abcam)、Bcl-xl (1:500; Cell signaling)、Bax (1:1000; Abcam) を 4°C で 18 時間インキュベートした。TBST を用いて PVDF 膜を 3 回洗浄後、二次抗体として Horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗マウスあるいはウサギ IgG (1:5000) を室温で 30 分反応させた。TBST で PVDF 膜を 3 回洗浄後、ECL prime western blotting detection reagent (GE) を用いて HRP を発色させた。発色させた PVDF 膜は LAS 500 (GE) を用いて撮影した。バンド発色強度は ImageJ software 1.48v を用いて解析し p-Met のリン酸化レベルは p-Met /Met で算出した。

#### 4-2-7 Reactive oxygen species 産生量の解析

PC12 細胞は低血清培地に  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞濃度で懸濁し、96 well プレートで 24 時間培養した。細胞を 4-2-1 で記述した方法で 90 分間処理した後、各 well を wash buffer で 1 回洗浄した。各 well に終濃度 25  $\mu$ M に調整した Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) を添加し、37°C で 45 分間インキュベートした。各 well を wash buffer で 1 回洗浄した後、マイクロプレートリーダーを用いて Ex485nm / Em535nm の蛍光強度を測定した。

#### 4-2-8 免疫細胞化学

カバースリップ上で培養した PC12 細胞および大脳皮質神経細胞は各種処理を行った後、PBS で 2 回洗浄後した。細胞は 4%パラホルムアルデヒドを用いて室温で 10 分間固定した。細胞は 5% ヤギ血清 (Dako, Glostrup, Denmark) を 30 分間処理して非特異反応をブロッキングした後、一次抗体としてウサギポリクローナル抗体 microtubule associated protein-2 (MAP-2; 1 : 200; Abcam) を 4°C で一晩インキュベートした。PBS で 3 回洗浄した後、二次抗体 Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG (1:500; Molecular Probes) を室温で 30 分間インキュベートした。カバースリップは DAPI-Fluoromount-G (SouthernBiotech) で封入し、核染色をした。陰性コントロールは一次抗体の代わりに rabbit Ig fraction negative control (Dako) をインキュベートした。大脳皮質神経細胞の突起伸展長は ImageJ software 1.48v を用いて解析した。

#### 4-2-9 統計

統計処理は 2 群間の比較の場合、分散分析及び正規性の検定の後、Student *t* test 法あるいは Mann-Whitney *U* test 法を実施した。3 群以上の比較の場合は、一元配置分散分析および正規性の検定後、Turkey-Kramer 法あるいは Steel-Dwass 法を実施した。P 値は 0.05 以下をもって「有意差あり」とした。全ての統計データは SPSS version 16.0 (IBM) を用いて解析し means  $\pm$  standard errors of the mean (SEMs) で示した。

### 4-3 結果

#### 4-3-1 BM-MNC の PC12 細胞に対する細胞保護効果

PC12 細胞の生存率は塩化コバルト濃度依存性に低下した (図 1A)。塩化コバルト濃度  $0 \mu\text{M}$  における細胞生存率を 100 とすると、 $100 \mu\text{M}$ 、 $200 \mu\text{M}$ 、 $300 \mu\text{M}$ 、 $400 \mu\text{M}$ 、および  $500 \mu\text{M}$  における細胞生存率はそれぞれ  $111.4 \pm 2.8\%$ 、 $100.1 \pm 3.9\%$ 、 $72.6 \pm 1.6\%$ 、 $47.4 \pm 0.6\%$ 、および  $30.5 \pm 0.4\%$  であり  $300$ 、 $400$ 、および  $500 \mu\text{M}$  で無処置に対して有意に低下した (それぞれ  $p = 0.001$ 、 $p = 0.00005$ 、および  $p = 0.00001$ )。以降の実験には塩化コバルト濃度  $500 \mu\text{M}$  を使用した。BM-MNC 培養上清が PC12 細胞の増殖活性に与える影響を調べるために、PC12 細胞を塩化コバルトの処理なしで BM-MNC 培養上清処理をした。処理 24 時間後の対照群の生存率は  $197.3 \pm 4.8\%$  であったのに対し、BM-MNC 培養上清処理を加えた場合は  $204.5 \pm 5.7\%$  であり、有意差は認められなかった (図 1B)。BM-MNC の至適濃度を同定するために BM-MNC の細胞濃度を  $0$ 、 $1 \times 10^5 \text{cells}$ 、 $5 \times 10^5 \text{cells}$ 、および  $1 \times 10^6 \text{cells} / \text{ml}$  に設定し細胞保護効果を比較した。結果、それぞれの処理による細胞生存率は処理開始 12 時間後では  $79.6 \pm 2.7$ 、 $74.8 \pm 2.7$ 、 $84.5 \pm 1.9$ 、および  $93 \pm 4.2\%$ 、18 時間後は  $41.1 \pm 2.2$ 、 $35.5 \pm 2.2$ 、 $44.4 \pm 2.1$ 、および  $55.6 \pm 2.7\%$ 、24 時間後では  $28.5 \pm 1.7$ 、 $25.7 \pm 1.8$ 、 $34.7 \pm 2.3$ 、および  $47.9 \pm 6.7\%$  であった (図 1C)。全ての解析時間 (12,18, および 24h) において  $1 \times 10^6 \text{cells} / \text{ml}$  の培養上清でのみ有意な細胞生存率の上昇が観察されたため (12h;  $p = 0.024$ , 18h;  $p = 0.003$ 、および 24h;  $p = 0.024$ )、以降の実験は細胞濃度  $1 \times 10^6 \text{cells} / \text{ml}$  の培養上清を用いた。対照および BM-MNC 培養上清処理による細胞保護効果は c-Met 阻害剤 SU11274 の濃度  $0 \mu\text{M}$  ではそれぞれ  $22.3 \pm 3.9\%$  および  $55.6 \pm 7.5\%$ 、 $0.1 \mu\text{M}$  では  $34.6 \pm 1.5\%$  および  $47.6 \pm 8.4\%$ 、 $1 \mu\text{M}$  では  $22.6 \pm 3.9\%$  および  $31.9 \pm 7.2\%$ 、 $10 \mu\text{M}$  では  $3.4 \pm 1.8\%$  および  $4.3 \pm 2.2\%$  であった (図 1D)。BM-MNC 培養上清の細胞保護効果は阻害剤濃度  $1 \mu\text{M}$  および  $10 \mu\text{M}$  で有意に低下した (それぞれ  $p = 0.03$  および  $p = 0.00004$ )。SU11274 の濃度  $10 \mu\text{M}$  では対照の生存率にも影響を及ぼしたため、以降の実験は SU11274 の濃度  $1 \mu\text{M}$  で実施した。



#### 4-3-2 BM-MNC による PC12 細胞の c-Met のリン酸化

BM-MNC は培養上清作成過程で HGF を発現していることを確認した (図 2A)。対照および BM-MNC 培養上清処理による c-Met リン酸化レベルは処理開始時においてそれぞれ  $0.52 \pm 0.15$  および  $0.51 \pm 0.13$  であった。処理開始 15 分後はそれぞれ  $0.48 \pm 0.14$  および  $0.75 \pm 0.06$ 、処理開始 30 分後はそれぞれ  $0.86 \pm 0.36$  および  $1.11 \pm 0.06$ 、処理開始 90 分後はそれぞれ  $0.86 \pm 0.36$  および  $1.12 \pm 0.23$  であり、開始 15 分から 90 分後にかけて BM-MNC 培養上清処理によって c-Met のリン酸化レベルが上昇していた。また開始 90 分後に BM-MNC 培養上清に SU11274 を  $1 \mu\text{M}$  加えるとリン酸化レベルは  $0.66 \pm 0.12$  まで低下した (図 2B、C)。これらの解析結果から BM-MNC が HGF をパラクラインしている可能性が示唆されたため、HGF 単体の効果と BM-MNC 培養上清の細胞保護効果を比較した。対照、BM-MNC 培養上清、HGF100ng/ml、および HGF500ng/ml の細胞生存率はそれぞれ  $39.7 \pm 1.7\%$ 、 $56.3 \pm 4.2\%$ 、 $39.4 \pm 2.3\%$ 、および  $46.8 \pm 2.3\%$  であり、BM-MNC 培養上清および HGF500ng/ml の処理によって有意に細胞生存率が上昇することが確認された (それぞれ  $p = 0.0009$ ,  $p = 0.016$ ; 図 2D)。HGF 100ng/ml では有意な細胞保護効果が得られなかったため、以降の実験は HGF 濃度 500ng/ml で実施した。

#### 4-3-3 BM-MNC による PC12 細胞に対する抗アポトーシス効果

PC12 細胞の Annexin V 陽性率は対照群では  $68.5 \pm 3.5\%$  であったが、BM-MNC 培養上清処理では  $42.1 \pm 3.0\%$  と有意に低下した ( $p = 0.042$ ; 図 3A、B)。BM-MNC 培養上清に SU11274 を添加すると Annexin V 陽性率は  $72.9 \pm 5.9\%$  と BM-MNC 培養上清単独の処理と比較して有意に増加した ( $p = 0.002$ )。対照に SU11274 を添加したところ、Annexin V 陽性率が  $84.8 \pm 4.8\%$  と対照よりも上昇したが有意差はなかった。PC12 細胞における Annexin V 陽性率は HGF 単体の処理によっても  $43.2 \pm 9.8\%$  と有意に低下した ( $p = 0.0004$ )。形態的な変化すなわち核あるいは細胞質の断片化を呈した細胞を算出し抗アポトーシス効果を評価したところ、アポトーシス形態を示す細胞の割合は対照群では  $67.9 \pm 0.7\%$  であったが、BM-MNC 培養上清処理では  $34.0 \pm 9.5\%$  と低下傾向を示した (図 3C、D)。BM-MNC 培養上清による効果は SU11274 存在下で  $58.1 \pm 7.2\%$  と有意に低

下した。対照に SU11274 を添加したが、アポトーシス形態を示す割合は  $62.7 \pm 1.0\%$  であり、変化はわずかしみられなかった。PC12 細胞における Annexin V 陽性率は HGF 単体の処理によっても  $42.8 \pm 5.5\%$  と低下傾向を示した。

#### 4-3-4 BM-MNC による PC12 細胞に対する Reactive oxygen species 産生抑制効果およびアポトーシス関連タンパク発現への影響

PC12 細胞における ROS 産生相対量は対照群では  $3.6 \pm 0.4\%$  であったが、BM-MNC 培養上清処理では  $2.3 \pm 0.3\%$  と有意に低下した ( $p = 0.048$ ; 図 4A)。BM-MNC 培養上清による効果は SU11274 存在下で  $3.0 \pm 0.3\%$  と有意に低下した ( $p = 0.042$ )。対照に SU11274 を添加したところ、ROS 産生相対量は  $3.5 \pm 0.4\%$  と変化がなかった。PC12 細胞における ROS 産生相対量は HGF 単体の処理によっても  $2.2 \pm 0.2\%$  と有意に低下した ( $p = 0.023$ )。Bcl-2、Bcl-xl、および Bax の相対発現量を解析したところ対照ではそれぞれ  $1.0 \pm 0.1$ ,  $0.9 \pm 0.2$ , および  $1.0 \pm 0.1$  であった。一方、BM-MNC 培養上清の処理ではそれぞれ  $1.3 \pm 0.9$ ,  $1.5 \pm 0.7$ , および  $1.2 \pm 0.2$ 、HGF の処理では  $1.2 \pm 0.2$ ,  $0.7 \pm 0.1$ , および  $1.2 \pm 0.5$  であり、対照より Bcl-2 の発現量がわずかに上昇したが有意差は得られなかった(図 4B、C)。

#### 4-3-5 BM-MNC による神経突起伸展促進効果

分離した成体ラット由来大脳皮質神経細胞は MAP-2 に陽性を示した。分離直後は細胞体からの突起伸展はみられなかったが、3 日後には一部の MAP-2 陽性神経細胞において複数の突起伸展が確認された(図 5A)。培養 3 日後において、大脳皮質神経細胞の神経突起長は対照群において  $15.9 \pm 1.9 \mu\text{m}$  だったが BM-MNC 細胞密度  $1 \times 10^6 \text{ cells/ml}$  との共培養では  $28.8 \pm 5.3 \mu\text{m}$  と有意に長く伸展した ( $p = 0.007$ ; 図 5B)。BM-MNC 細胞密度  $1 \times 10^5 \text{ cells/ml}$  では伸展長  $14.6 \pm 3.2 \mu\text{m}$  と、対照群に対して有意な差が得られなかった。HGF 処理における神経突起伸展長は  $100 \text{ ng/ml}$  で  $26.2 \pm 5.1 \mu\text{m}$ 、 $500 \text{ ng/ml}$  では  $19.4 \pm 2.1 \mu\text{m}$  と若干の伸展促進効果が観察されたが有意差は得られなかった。大脳皮質神経細胞における神経突起を伸展する最簿の割合は対照群において  $21.4 \pm 5.3\%$

だったが BM-MNC 細胞密度  $1 \times 10^6$  cells/ml との共培養では  $34.4 \pm 5.4\%$  と増加傾向が見られたが有意差は得られなかった(図 5C)。BM-MNC 細胞密度  $1 \times 10^5$  cells/ml では伸展率  $24.5 \pm 3.7\%$  であり、対照とほぼ同じであった。HGF 処理における伸展率は 100ng/ml で  $26.4 \pm 5.3\%$ 、500ng/ml では  $21.6 \pm 4.3\%$  であり対照との有意差は得られなかった。

#### 4-4 考察

BM-MNC の培養上清は神経細胞モデル PC12 細胞に発現する HGF の受容体、c-Met をリン酸化し、ROS 産生量を減少させることが明らかとなった。これらの効果は c-Met 阻害剤存在下において抑制され、同時に細胞死抑制効果も低下した。本章の結果から BM-MNC による神経細胞保護効果の少なくとも一部は HGF のパラクラインによって HGF/c-Met signaling を活性化し、ROS 産生量を低下させることでもたらされていることが明らかとなった。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。驚くべきことに、HGF をのぞく多くの成長因子、例えば FGF、PDGF、EGF、および IGF-1 は ROS の産生を誘導することが報告されている (Sundaresan et al., 1995; Bae et al., 1997; Meng et al., 2008)。BM-MNC はこれらの成長因子を産生すると報告されているが (Leblond et al., 2009)、本検討の結果から、HGF のパラクラインを介して総合的には ROS 産生量を低下させることが可能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効果が期待されると考えられた。

HGF は PI3K-Akt pathway を介して Rac-1 の活性化を抑制し、ROS 産生量を抑えることに加え、Bcl-2 および Bcl-xl の発現を誘導しアポトーシスを抑制することが知られている (Ozaki et al., 2003; Funakoshi et al., 2011)。本検討ではアポトーシス関連タンパクの発現量は BM-MNC 培養上清あるいは HGF の処理を受けても変化がみられなかった。詳細な要因は不明であるが、ROS の産生抑制によってアポトーシスが抑制されたことで、Bcl-2 ファミリーの発現を誘導する抗アポトーシスシグナルへの入力低下したのかもしれない。

BM-MNC は  $1 \times 10^6$  cells / ml 未満の細胞濃度では有意な細胞保護効果をもたらさなかった。これまで BM-MNC が細胞保護効果をもたらすためにどの程度の細胞が必要か十分に解明されてこなかったが、本章の解析によって比較的高い細胞密度を要することが明らかとなった。BM-MNC の脊髄損傷に対する移植方法は脊髄実質、クモ膜下腔、第 4 脳質、および静脈投与が報告されてきたが (Inoue et al., 2003; Yoshihara et al., 2007; Tamura et al., 2015)、急性期における細胞保護効果

をターゲットとする場合は、損傷部位への細胞供給効率の観点から脊髄実質あるいは脊髄クモ膜下腔への投与が望ましいと考えられた。

BM-MNC は成体の大脳皮質神経細胞の突起伸展を促進させることが明らかとなったが HGF の処理では同様の効果が確認できなかった。HGF は発生時期の神経細胞や末梢神経に対して軸索の伸展を促進することが報告されているが (Maina et al., 1998; David et al., 2008; Tonges et al., 2011)、成体の中枢神経細胞に対しては同活性をもたない可能性が示唆された。BM-MNC は視神経において NGF のパラクラインを介して軸索再生効果をもたらすことが報告されているが (Zaverucha-do Valle et al., 2011; Sarkar et al., 2013) 中枢神経細胞に対しても同様に NGF 等のパラクラインによって軸索伸展促進効果をもたらしている可能性が推察された。

#### 4-5 小括

BM-MNC の急性期脊髄損傷に対する作用機序を明らかにするために、*in vitro* において BM-MNC の神経細胞保護効果の機序を解析した。加えて、BM-MNC が成体の中枢神経細胞に対して軸索伸展促進効果をもたらすかどうかを解析した。結果、BM-MNC は HGF のパラクラインを介して ROS 産生を抑制し、細胞保護効果をもたらすことが明らかとなった。また、BM-MNC は成体大脳皮質神経細胞に対して突起伸展促進効果をもたらすことが明らかとなった。このことから、BM-MNC 移植療法は ROS の産生が顕著な甚急性期の脊髄損傷あるいは脳損傷において特に有効であると考えられた。また成体中枢神経細胞に対する突起伸展促進効果を有すること、さらに軸索伸展阻害物質分解酵素の産生能が報告されていることから慢性期の治療にも有効である可能性が示唆された。

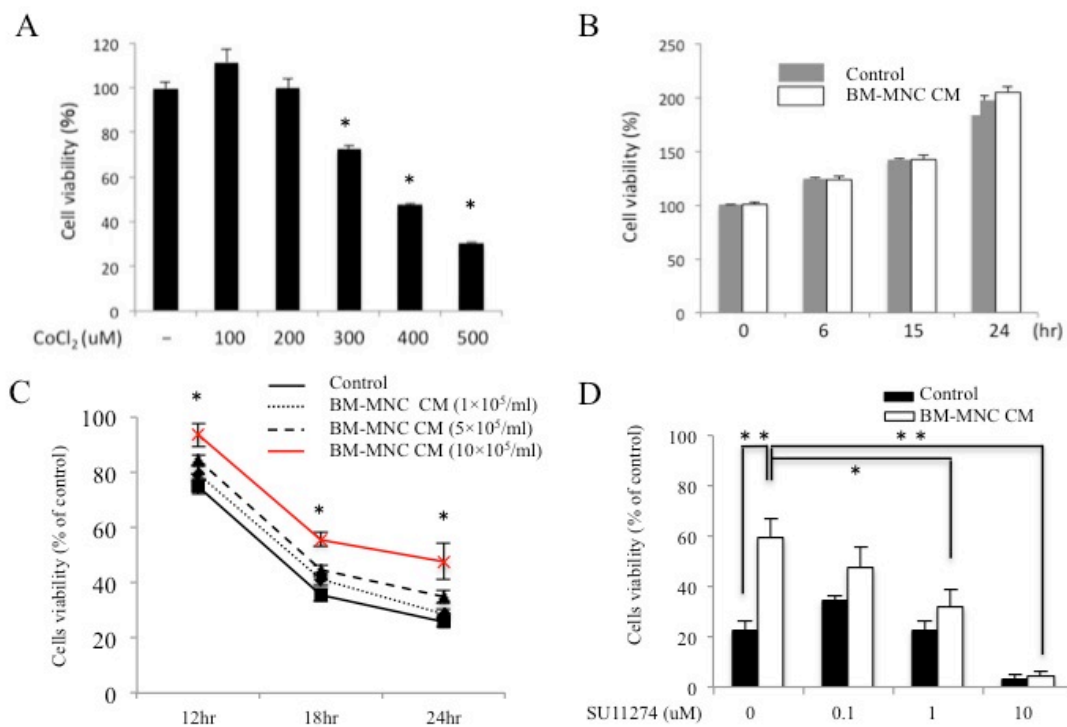


Figure 1 Influence of CoCl<sub>2</sub>, BM-MNC conditioned media (CM), and SU11274 on PC12 cells.

(A), Influence of CoCl<sub>2</sub> treatment for 24 h on PC12 cells. Cell viability is significantly decreased in final concentration of CoCl<sub>2</sub> exceeds 300μM compared with negative control. (B), Influence of BM-MNC CM to proliferation activity of PC 12 cells. BM-MNC CM does not affect to proliferation activity of PC12. (C), Influence of BM-MNC CM on survivability of PC12 cells. Cell viability of PC12 is increased with increasing the number of BM-MNC. Cell viability of PC12 cells is significantly increased with the treatment of BM-MNC CM (10×10<sup>5</sup>/ml). (D), Influence of SU11274 treatment for 24 h on the cell protective effect of BM-MNC CM. Protective effect of BM-MNC CM is diminished with increasing concentration of SU11274. Cell viability of PC12 treated with BM-MNC CM is significantly decreased in final concentration of SU11274 exceeds 1μM. Significant difference between control and BM-MNC CM is disappeared in the presence of SU11274 at any concentration. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  vs. Control.

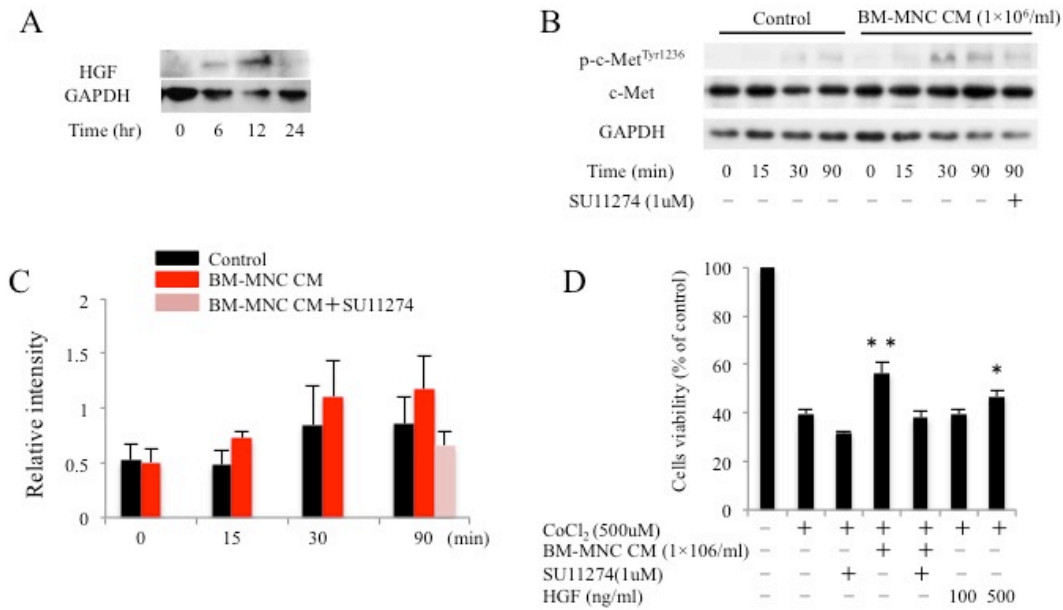


Figure 2 Influence of c-Met phosphorylation on cell protective effect of BM-MNC CM. (A), HGF productivity of BM-MNC. BM-MNC expresses HGF in low serum medium. (B, C), c-Met phosphorylation by BM-MNC CM. Western blot shows phosphorylation of c-Met kinase upon addition of BM-MNC CM. The level of phosphorylation increases with assay time and peaks at 30–90 minutes, whereas the level is decreased in presence of SU11274. The level of c-Met phosphorylation of control is low compared with BM-MN CM treatment. (D), Influence of HGF treatment for 18 h on cell viability of PC12 cells. Cell viability of PC12 treated with HGF increases to the same extent of BM-MNC CM. \*:  $p < 0.05$  versus positive control, \*\*:  $p < 0.01$  versus positive control, positive control plus SU11274, and BM-MNC CM plus SU11274.



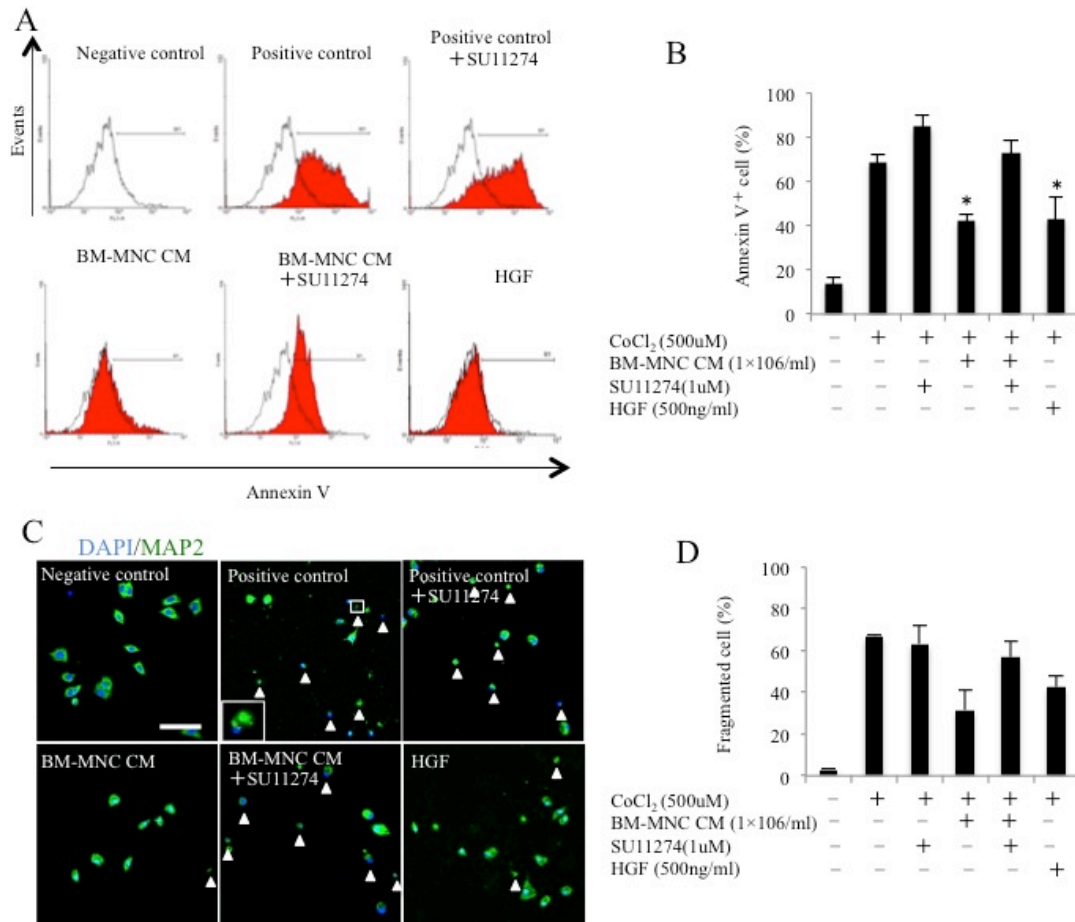


Fig 3 Anti-apoptotic effect of BM-MNC CM and HGF.

(A, B), Flowcytometric analysis of apoptosis 18 h after the treatments. Flowcytometry shows a significant decrease of Annexin V-positive cells upon addition of BM-MNC CM or HGF. Annexin V-positive cells are increased in presence of SU11274. (C, D), Morphological analysis of apoptosis 18 h after the treatments. The rate of cells fragmented nucleus or cytoplasm is decreased when treated with BM-MNC CM or HGF. Significant differences are not found. \*:  $p < 0.05$  versus positive control, positive control plus SU11274, and BM-MNC CM plus SU11274. Scale bar = 50  $\mu$  m.

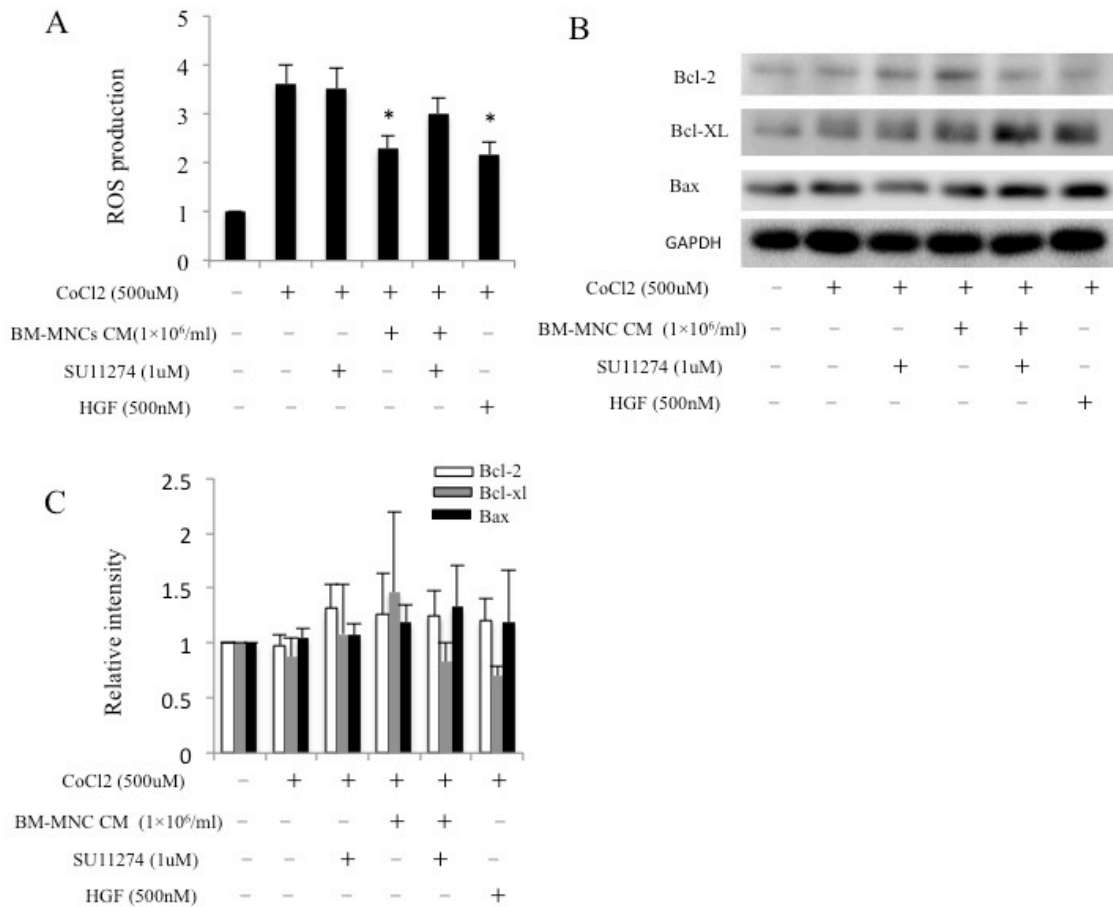
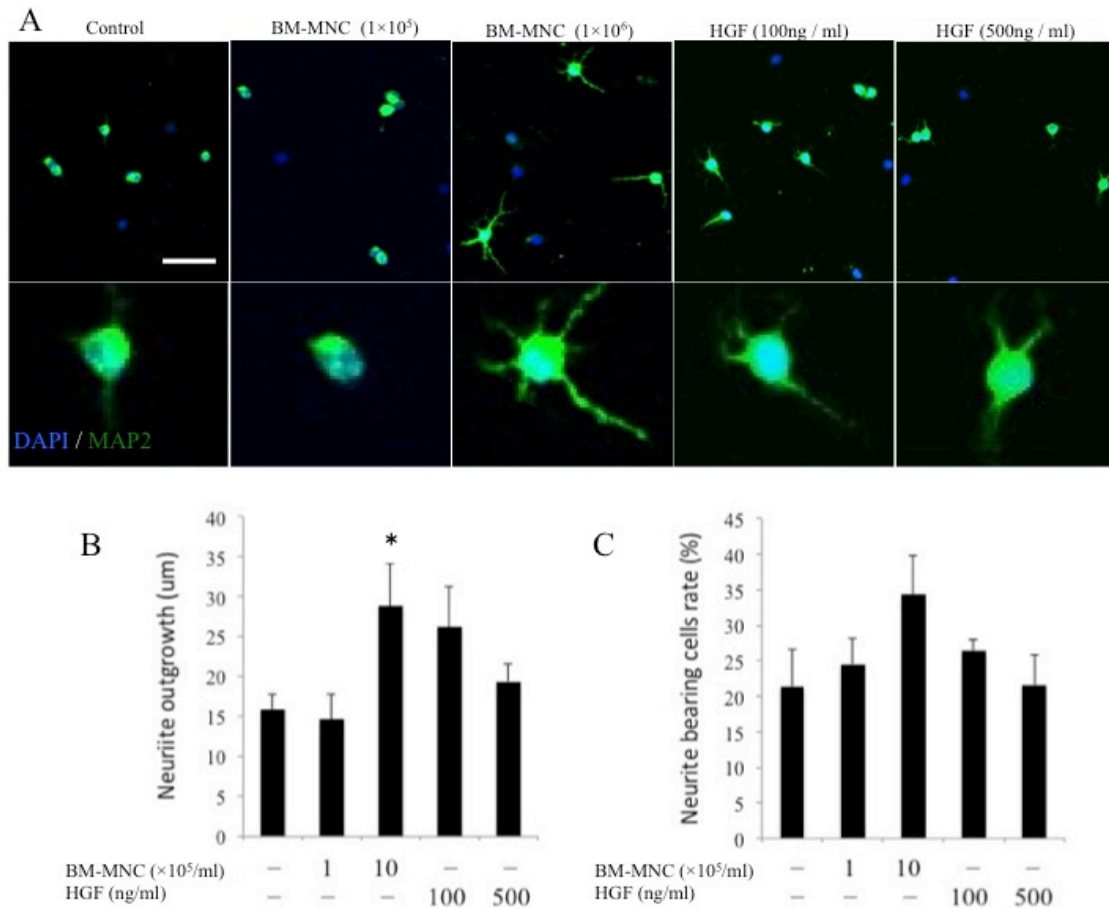


Figure 4 Influence of BM-MNC CM and HGF on ROS production and Bcl-2 family protein expression in PC 12 cells.

(A), Influence of BM-MNC CM and HGF treatment for 1.5 h on ROS production in PC12 cells. ROS production is significantly decreased upon addition of BM-MNC CM or HGF. The effect of BM-MNC CM is diminished in the presence of SU11274. (B, C), Influence of BM-MNC CM and HGF treatment for 18 h on Bcl-2 family protein expression in PC12 cells. The expression level of Bcl-2 family protein does not change by any treatments. \*:  $p < 0.05$  versus positive control.



☒ 5 BM-MNC regulate neurite outgrowth of adult cortical neuron.

(A), Immunohistochemical evaluation of adult cortical neurons co-cultured with BM-MNC or treated with HGF for 72 h. Part of the neurons extend their cell processes. (B), Morphometric analysis of neurite outgrowth. BM-MNC, but not HGF promote neurite outgrowth of cortical neuron. The length of neurite is significantly long when co-cultured with BM-MNC. (C), Morphometric analysis of neurite bearing cell rate. The rate of neurite bearing neuron is increased co-cultured with BM-MNC. Significant difference is not found. \*:  $p < 0.05$  versus no treatment and BM-MNC ( $1 \times 10^5/\text{ml}$ ). Scale bar =  $50 \mu\text{m}$ .

## 第 5 章

急性期脊髄損傷に対する BM-MNC および HGF の脊髄実質投与方法  
による治療効果の比較

## 5-1 小序

近年、細胞移植療法に代わる新たな急性期脊髄損傷の治療法として成長因子投与療法が盛んに研究されている。細胞移植療法では細胞分離のために生体を侵襲する必要があるが、成長因子の投与であればその必要がなく短時間で治療を開始できる。このような観点から成長因子投与療法は特に脊髄損傷や脳梗塞といった重篤疾患の急性期治療への応用が期待されている。これまでに急性期脊髄損傷に対して *glia-derived neurotrophic factor (GDNF)* や *neurotrophin (NT) -3* といった神経栄養因子や *FGF*、*EGF*、*IGF*、および *VEGF* といった多様な生理活性を有する成長因子が応用され、治療効果をもたらすことが明らかにされてきた (Harvey et al., 2015)。これらの成長因子の有効性を評価する上で、作用機序を詳細に明らかにすることは重要であるが治療法の選択肢が増えた現在、個々の治療法を比較し、より治療効果の高い手法を選別することも急務となっている。これまでに細胞同士あるいは成長因子同士の治療効果の比較は試みられてきたが、細胞移植療法と成長因子投与療法の効果は比較されることがなかった。細胞移植および成長因子の投与はそれぞれに長所短所があり、両者を比較することで適切な治療法の選択が可能になると考えられる。第4章の結果、骨髄由来単核球 (*bone marrow-derived mononuclear cell: BM-MNC*) は肝細胞増殖因子 (*hepatocyte growth factor: HGF*) のパラクリンによって治療効果をもたらすこと、そして *HGF* は *BM-MNC* と同程度の神経細胞保護効果をもたらすことがあきらかとなった。このことから *HGF* を *BM-MNC* の代わりに投与することで、さらに効率的に高い治療効果が得られる可能性が推察された。*HGF* 投与療法は、*osmic pump* による持続投与法と遺伝子導入による投与方法が報告されている (Kitamura et al., 2007; Kitamura et al., 2011)。*Osmic pump* によるくも膜下腔への持続投与法は治療効果や供給効率の観点から臨床応用への期待が高まっているが、この手法では異物反応や感染の懸念が伴う。遺伝子による供給法は導入効率や遺伝子投与量制限などの問題が生じる。そのほかの経路として、他の成長因子投与療法では静脈や皮下投与法が報告されてきたが、*HGF* を末梢投与すると肝臓への集積および血液脳関門でのトラップされることで中枢神経への供給効率が非常に低くなる (Pan et al., 2006)。そこで本章では効率的に *HGF* を損傷脊髄に供給するために脊髄実質単回投与法を試行し、その有効性を *BM-MNC* 移植法と比較しながら解析した。

## 5-2 材料と方法

### 5-2-1 供試動物と実験デザイン

健康な雌 Sprague-Dawley (SD) ラット (360–400g, 10 週齢, Tokyo Laboratory Animal Science, Tokyo, Japan) 15 匹に脊髄圧挫損傷を施した。損傷直後に脊髄実質に BM-MNC あるいは HGF を移植し、28 日後に安楽殺した。移植細胞は 5 匹の雄 SD ラット (240–260g, 10 週齢, Japan SLC, Shizuoka, Japan) から採材した。全てのラットは室温 26°C、12:12 時間の明暗周期で飼育した。本章の研究は日本獣医生命科学大学の動物実験委員会によって承認された (Code: 26S-8)。すべての実験動物は日本獣医生命科学大学の動物実験委員によって規定されたガイドラインに従って扱った。

### 5-2-2 BM-MNC の分離

BM-MNC は第 2 章と同じ手法を用いて分離した。

### 5-2-3 脊髄損傷と BM-MNC および HGF の投与方法

脊髄損傷は第 2 章と同じ方法を用いた。損傷の重症度を上げ、後肢完全麻痺モデルを作成するために NYU impactor のロッドの高さを、12.5mm から 50.0mm に上げた。BM-MNC の移植は第 2 章と同じ手法を用いた。ネコ組み替え HGF (rfHGF; 日本全薬工業) は 600ng/ml に調整し、10  $\mu$ l (投与量は 6ng) を脊髄実質に投与した。投与量は HGF 遺伝子導入法で報告された研究結果を参考にした。この研究では損傷を与える 3 日前に HGF 遺伝子を脊髄に導入し、HGF 濃度を高めておくことで治療効果が得られることが明らかにされている。そのときの HGF 増加量は約 8.5ng/脊髄 1g (脊髄長 13.4cm に相当) であり、この量を in vivo における有効量とした。本研究で使用する脊髄損傷モデルは損傷領域が約 2cm であるため有効量は約 1.2ng であるが、単回のみのため 5 倍に増量し 6ng を投与した。

投与方法は第 2 章の細胞移植と同じ手法を用いたが、溶媒を DMEM から生理食塩水に変更した。

#### 5-2-4 Magnetic resonance imaging (MRI) および Diffusion tensor imaging (DTI)

脊髄損傷から 3、7、14、28 日後、ラットにペントバルビタール (30mg/kg, ip) を用いて麻酔を施し、3 Tesla MRI scanner (Signa; GE) を用いて T2 強調画像および DTI を撮像した。麻酔を施したラットは仰臥位で knee coil に固定した。T2 強調画像は Sagittal および Axial 像を以下の条件で撮影した。[repetition time: 2600ms, echo time: 120ms, thickness: 1.5mm, space: 0, field of view: 8, acquisition matrix: 320×224, NEX: 10]。DTI は Axial 像を以下の条件で撮影した。[b value: 1000s/mm<sup>2</sup>, repetition time: 3500ms, echo time: 90ms, thickness: 2.4mm, space: 0, field of view: 10, acquisition matrix: 64×64, NEX: 10]。DTI のデータから FuncTool (GE) を用いて fractional anisotropy (FA) map を作成し、脊髄実質に設定した Region of interest 内における平均 FA 値を算出した。ファイバートラッキング画像は FuncTool (GE) を用いて作成し、FA 値を合成した。

#### 5-2-5 組織の処理と免疫組織化学

組織の処理および免疫組織化学は第 2 章と同じ手法を用いた。脊髄は損傷を与えた部位を損傷中心 0 とし、そこから DTI の slice 厚と同じになるように 2.4mm の分節に分けて評価した。一次抗体 は以下の抗体を用いた [マウスモノクローナル抗体: Neurofilament (1:200; Wako), Rat endothelial cell antigen-1: RECA-1 (1:200; BIO-RAD); ウサギポリクローナル抗体 [glial fibrillary acidic protein: GFAP (1:500; Dako), Microtubule associated protein-2 (MAP-2; 1:200; Abcam)]。二次抗体は以下の抗体を用いた[Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse (1:500; Molecular Probes, OR, USA), Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit antibodies (1:500; Molecular Probes, OR, USA) ]。切片は DAPI-Fluoromount-G (SouthernBiotech, AL, USA)

で封入した。陰性コントロールは第 2 章と同じ方法で作成した。

#### 5-2-6 運動機能試験

運動機能は第 2 章と同様に BBB score を用いて評価した。BBB score は脊髄損傷後 3、7、14、21、および 28 日後に評価した。

#### 5-2-7 統計

多群比較のために一元配置分散分析後、Turkey-Kramer 法あるいは Steel-Dwass 法を実施した。DTI FA 値と免疫組織化学の相関性を明らかにするために、ピアソン相関係数を求めた。P 値は 0.05 以下をもって有意差ありとした。全ての統計データは SPSS version 16.0 (IBM) を用いて解析し means  $\pm$  standard errors of the mean (SEMs) で示した。



### 5-3 結果

#### 5-3-1 T2 強調画像における損傷脊髄の経時的変化

T2 強調画像の経時的変化を図 1 に示した。損傷 6 時間後の T2 強調画像では、損傷中心を囲むように瀰漫性の軽度の高信号領域が観察され、損傷 3 日後には同領域が増強した。損傷 7 日後には全ての群において高信号領域が縮小したが、群間において明瞭な差がなかった。損傷 14 日後では全ての群において高信号領域が縮小したが、HGF 群および BM-MNC 群ではより顕著に縮小していた。損傷 14 日後から 28 日後にかけては、全ての群において明瞭な変化が認められなかった。

#### 5-3-2 DTI における損傷脊髄の経時的変化

DTI の経時的変化を図 2 に示した。損傷によって変性した領域は FA map において低信号 (寒色) を呈した (図 2A)。損傷 3 および 7 日後では、全ての群において損傷部を中心に FA 値の低下が観察された。HGF 群および BM-MNC 群の FA 値は対照群よりも高値を維持する傾向が見られたがいずれの領域においても有意差は得られなかった (図 2B,C)。損傷 14 日後では損傷中心より尾側 2.4mm における HGF 群および BM-MNC 群の FA 値 (それぞれ  $0.313 \pm 0.019$  および  $0.374 \pm 0.018$ ) は、対照群の FA 値 ( $0.237 \pm 0.001$ ) よりも高値を示した。有意差は対照および BM-MNC 群間において認められた ( $p = 0.014$ ; 図 2D)。また、尾側 9.6mm における HGF 群および BM-MNC 群の FA 値 (それぞれ  $0.453 \pm 0.028$  および  $0.433 \pm 0.009$ ) は、対照群の FA 値 ( $0.340 \pm 0.028$ ) よりも有意に高値を示した (それぞれ  $p = 0.012$  および  $p = 0.014$ )。損傷 28 日後では損傷中心より尾側 2.4mm における HGF 群および BM-MNC 群の FA 値 (それぞれ  $0.255 \pm 0.011$  および  $0.303 \pm 0.017$ ) は、対照群の FA 値 ( $0.205 \pm 0.010$ ) よりも有意に高値を示した (それぞれ  $p = 0.012$  および  $p = 0.006$ ; 図 2E)。また尾側 7.2mm における HGF 群および BM-MNC 群の FA 値 (それぞれ

0.388±0.026 および 0.407±0.011)は、対照群の FA 値 (0.306±0.041)より高値を示したが有意差は BM-MNC 群および対照群の間のみで認められた ( $p = 0.015$ )。

### 5-3-3 免疫組織化学による治療効果の評価

受傷 28 日後において免疫組織化学的に神経系マーカー陽性領域を評価した。結果、対照群、HGF 群、および BM-MNC 群全ての群において損傷中心 (0mm)における MAP2 の反応性はわずかしか認められなかった(図 3A)。しかし頭側 2.4mm の脊髓横断領域では HGF 群の MAP2 陽性領域 (1769349±252802  $\mu\text{m}^2$ ) および BM-MNC 群の MAP2 陽性領域 (1994314±343178  $\mu\text{m}^2$ ) は対照群の陽性領域 (461002±118496  $\mu\text{m}^2$ ) よりも有意に広がった (それぞれ  $p = 0.015$  および  $p = 0.029$ )。また、尾側 4.8mm の脊髓横断領域においては BM-MNC 群の MAP2 陽性領域 (3869308±509638  $\mu\text{m}^2$ ) は対照群の陽性領域 (2668607±284188  $\mu\text{m}^2$ )よりも有意に広がった ( $p = 0.014$ ; 図 3B)。そのほかの脊髓横断領域において有意差は得られなかったが、ほぼすべての横断領域において BM-MNC 群および HGF 群の MAP2 陽性領域は対照群よりも広域が維持されている傾向が見られた。また、BM-MNC 群の陽性領域は HGF 群の陽性領域よりも広域が維持されている傾向が見られた。Neurofilament の反応性は 図 3C に示した。損傷中心 (0mm) における Neurofilament 陽性領域は HGF 群 (508176±35466  $\mu\text{m}^2$ ) および BM-MNC 群 (581859±51995  $\mu\text{m}^2$ ) において対照群 (338047±28473  $\mu\text{m}^2$ ) よりも有意に広がった (それぞれ  $p = 0.048$  および  $p = 0.033$ ; 図 3D)。損傷中心領域で認められる Neurofilament 陽性の軸索は固有構造と異なり、あらゆる方向に蛇行していた。損傷中心 (0mm) 以外の脊髓横断領域では有意差は認められなかったがほぼすべての横断領域において BM-MNC 群および HGF 群の Neurofilament 陽性領域は対照群よりも広域が維持されている傾向が見られた。また、BM-MNC 群の陽性領域は HGF 群の陽性領域よりもさらに広域が維持されている傾向が見られた。GFAP の反応性は 図 3E に示した。多くの脊髓横断領域において BM-MNC 群および HGF 群の GFAP

陽性領域は対照群よりも広域が維持されている傾向がみられたが有意差は得られなかった。また、BM-MNC 群の陽性領域は HGF 群の陽性領域よりもさらに広域を維持している傾向がみられたが、同様に有意差は得られなかった。損傷中心における血管数を評価したところ、GFAP 陰性で示される損傷領域では全ての群においてごく少数の血管が散見される程度であった。しかし損傷領域を囲む損傷周辺領域に注目して観察すると血管が高頻度に観察された (図 4A)。同領域においては、全ての群で血管の増生が認められたが、BM-MNC 群では対照および HGF 群と比較して最も密に血管が観察された (図 4A)。損傷中心 (0mm) の脊髄全域における血管密度は BM-MNC 群において最も高値を示したが、有意差は得られなかった ( $170.5 \pm 23.6$  vessels/mm<sup>2</sup>,  $175.3 \pm 9.6$  vessels/mm<sup>2</sup>,  $197.7 \pm 8.9$  vessels/mm<sup>2</sup>; それぞれ対照、HGF、BM-MNC 群の順)。

#### 5-3-4 後肢運動機能評価

各群における運動機能の経時的変化は図 5 に示した。対照群、HGF 群、および BM-MNC 群における全てのラットは損傷 24 時間後の BBB スコアが 0 で完全麻痺を呈していた。損傷 3 日後も全ての群の score はおおむね 0 で群間差は認められなかった ( $0.2 \pm 0.2$ ,  $0.0 \pm 0.0$ ,  $0.1 \pm 0.1$ ; それぞれ対照、HGF、BM-MNC 群の順)。損傷 7 日後において、対照群は BBB score がおおむね 0 であったのに対して、HGF 群および BM-MNC 群は上昇し、改善傾向を認めたが ( $0.4 \pm 0.2$ ,  $0.9 \pm 0.2$ ,  $1.4 \pm 0.4$ ; それぞれ対照、HGF、BM-MNC 群の順) 有意差は認められなかった。損傷 14 日後においては、すべての群における BBB score の上昇が観察されたが、有意差はなかった ( $2.4 \pm 0.6$ ,  $3.4 \pm 0.8$ ,  $3.2 \pm 0.8$ ; それぞれ対照、HGF、BM-MNC 群の順)。HGF および BM-MNC 群は損傷 21 日 ( $3.4 \pm 1.0$ ,  $4.3 \pm 0.5$ ,  $4.7 \pm 0.9$ ; それぞれ対照、HGF、BM-MNC 群の順) および 28 日後 ( $4.5 \pm 1.3$ ,  $5.3 \pm 0.5$ ,  $6.1 \pm 0.4$ ; それぞれ対照、HGF、BM-MNC 群の順) においても対照群と比較して高い BBB score を呈したが、有意差は認められなかった。

#### 5-3-5 DTI FA 値と免疫組織化学の相関性

損傷 28 日後の DTI FA 値と免疫組織化学の相関性を解析した。結果、FA 値は Nurofilament 陽性領域と相関性を示した ( $R = 0.529$ ,  $p = 0.004E-05$ )。また、FA 値は MAP2 ( $R = 0.432$ ,  $p = 0.002E-03$ )と GFAP( $R = 0.501$ ,  $p = 0.009E-05$ ) の陽性領域とも相関性を示した。

#### 5-4 考察

本章では HGF 脊髄実質単回投与法の効果を BM-MNC 移植療法と比較しながら DTI によって経時的に評価したところ、HGF 投与群および BM-MNC 移植群は、損傷 2 週および 4 週後に拡散テンソル画像の FA 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、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いことが明らかとなったが、BM-MNC 移植療法と比較するとその効果は限定的であった。詳細な作用機序は解析していないが、損傷直後に単回投与した HGF が損傷部位で長期間生理活性を及ぼすことは考えにくい。従って甚急性期に投与した HGF が細胞死などの急性期変化を抑制した結果、それに惹起される炎症等の長期的に持続する二次損傷が減弱されたものと推察された。HGF 単回投与の効果は BM-MNC と比較すると弱いことが明らかとなったが、その理由として、BM-MNC は HGF 以外の複数の成長因子を傍分泌することで成長因子の作用が相加的に得られている可能性が考えられた。また HGF による c-Met シグナルの活性化は単回投与では不十分で、治療効果をもたらすためには複数回あるいは持続投与の必要があると考えられた。

HGF は古くから血管新生因子として認知され、血管内皮細胞に対して増殖、遊走、および管腔形成を促進することが報告されているが (Bussolino et al., 1992)。HGF 脊髄実質単回投与法では血管新生促進効果は認められなかった。脊髄損傷急性期では血管新生を含めた組織の再生を阻害する微小環境が形成され、組織再性が誘導されにくくなる (McDonough and Martines-Cerderio, 2012)。例えば、Notch1 は損傷後 1 週間で急激に発現が上昇し、血管新生および神経再生を阻害することが知られている (Liu et al., 2006; McDonough and Martines-Cerderio, 2012)。脊髄実質単回投与法は、生理活性が投与後一時的にしか作用しないため、二次損傷カスケードの減弱を目的とする場合は有用であるが、血管新生を含め組織再生の誘導は脊髄損傷急性期においては困難であると考えられた。

本検討では治療効果の解析に DTI を用いた。これまでいくつかの報告においてラット脊髄損傷モデルの治療効果の評価に DTI が利用されてきたが、すべては 7tesla 以上の MR を用いた解析であり 3 tesla MR を用いた治療効果の評価は本研究が初めての報告である (Zhang et al., 2009; Kelly et al., 2014)。7 tesla の MRI は 3 tesla に比べて約 2.3 倍の信号雑音比を持ち、高解像度の撮像が可能だが日本ではごく限られた施設でしか稼働していない。本研究では 3 tesla MR を用いて撮影した DTI の有用性を明らかにするために、DTI の FA 値と免疫組織化学との相関性を解析した。結果、FA 値は Neurofilament, MAP2, および GFAP 陽性領域と相関性を示すことが明らかとなった。7Tesla MR によって得た FA 値では損傷脊髄のいずれの領域も軸索マーカー-neurofilament と相関を示すことが報告されているが (Kozlowski et al., 2008)、3Tesla MR を用いて得られた FA 値でも組織学的変化を反映した評価が可能であると考えられた。

## 5-5 小括

HGF 脊髄実質単回投与法の急性期脊髄損傷に対する治療効果を明らかにするために、ラット脊髄損傷モデルに対する治療効果を BM-MNC 移植療法による効果と比較しながら解析した。結果、HGF 脊髄実質単回投与法は神経細胞の脱落および軸索変性を抑制することが明らかとなったが BM-MNC 移植療法と比較するとその効果は限定的であることが明らかとなった。治療効果をもたらすためには、成長因子単回の供給では不十分であり、持続的な供給が必要であると考えられた。

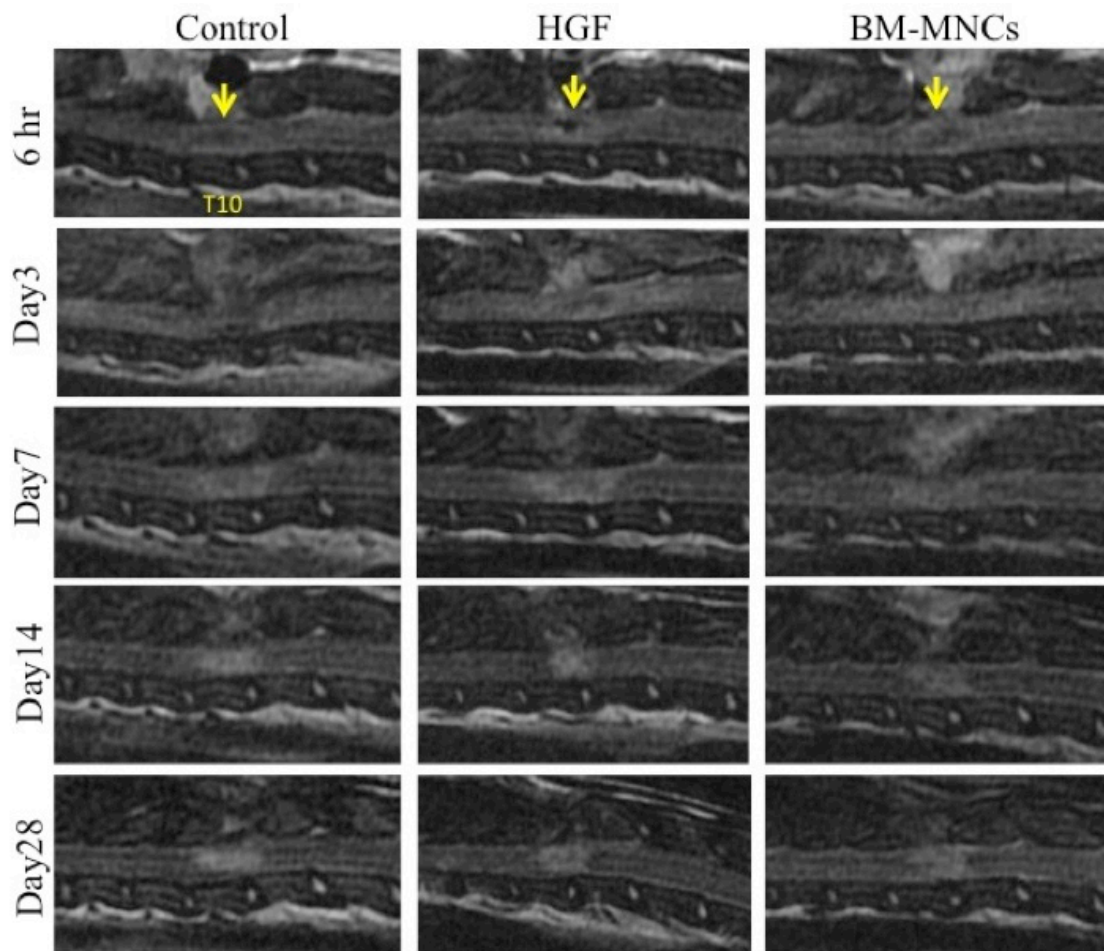


Figure 1. T2 weighted images of injured spinal cord received saline (control), HGF, or BM-MNC.

Focal area of spinal cord shows low-intensity at 6 hours after injury. High-intensity signal expands around focal area at 3 days post injury (DPI) and thereafter diminishes at 7 DPI. An apparent difference is not found between groups. The area of high-intensity signal continuously diminishes from 7 to 14 DPI. However, the diminished high-intensity area seems smaller in HGF and BM-MNC group than control. The high-intensity area nearly unchanged from 14 to 28 DPI in all groups. Yellow arrows indicate injured site.



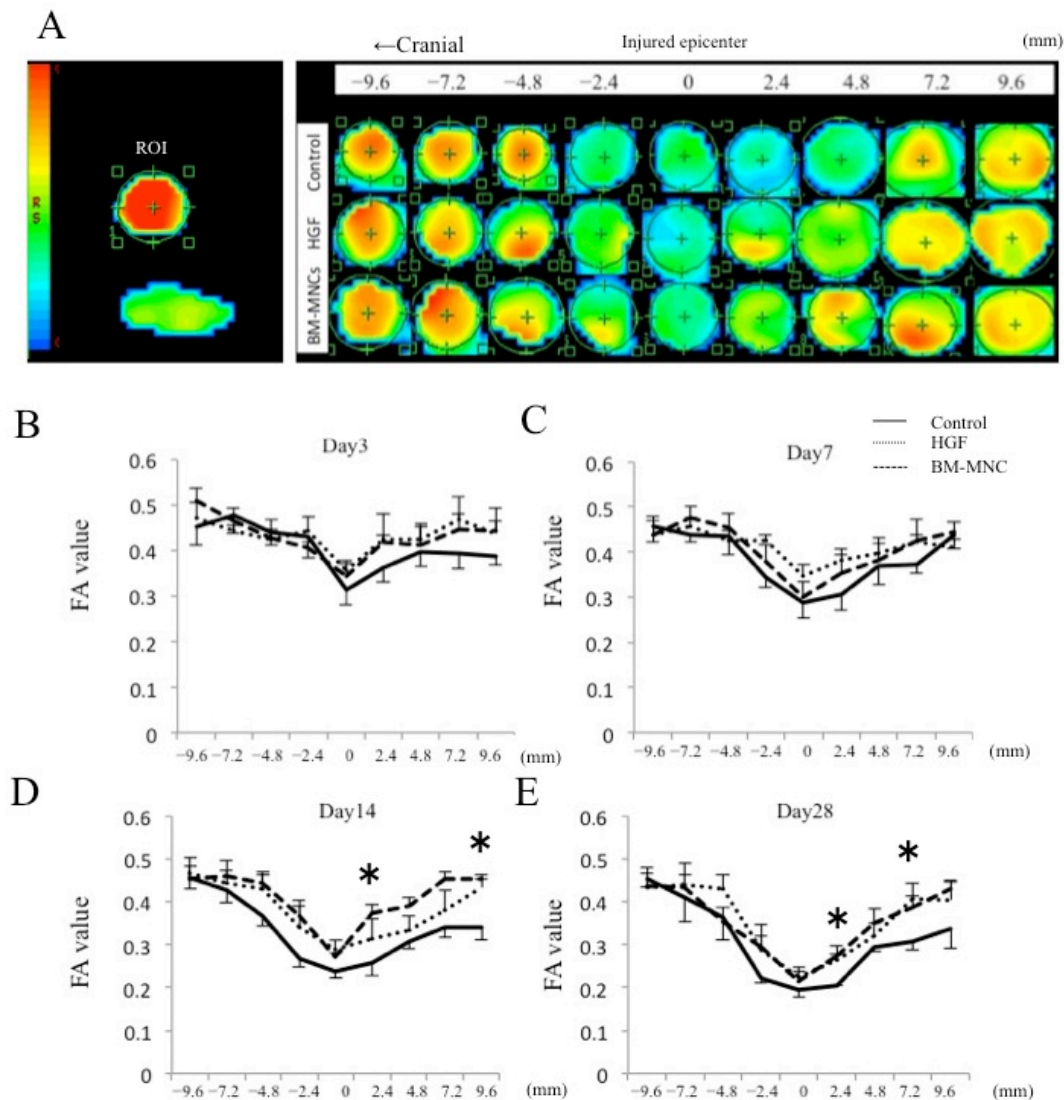


Figure 2. FA value of injured spinal cord received saline (control), HGF, or BM-MNC. (A), Images of FA mapping of injured spinal cord at 28 DPI. (B), FA value of ROI at 3 DPI. A decrease of FA value is observed mainly around injured site. Significant difference is not observed between the groups. (C), FA value of ROI at 7 DPI. The area decreased FA value is widely spread in all the groups. (D), FA value of ROI at 14 DPI. A further decrease of FA value is observed. However, FA values at the segment of posterior 2.4 and 9.6mm from injured site are significantly large in HGF and BM-MNC groups than control. (E), FA value of ROI at 28 DPI. FA value is continuously decreased in all the groups. However, FA values at the segment of posterior 2.4, 7.2, and 9.6mm from injured site are significantly large in HGF and BM-MNC groups than control. \*:  $p < 0.05$  versus control.

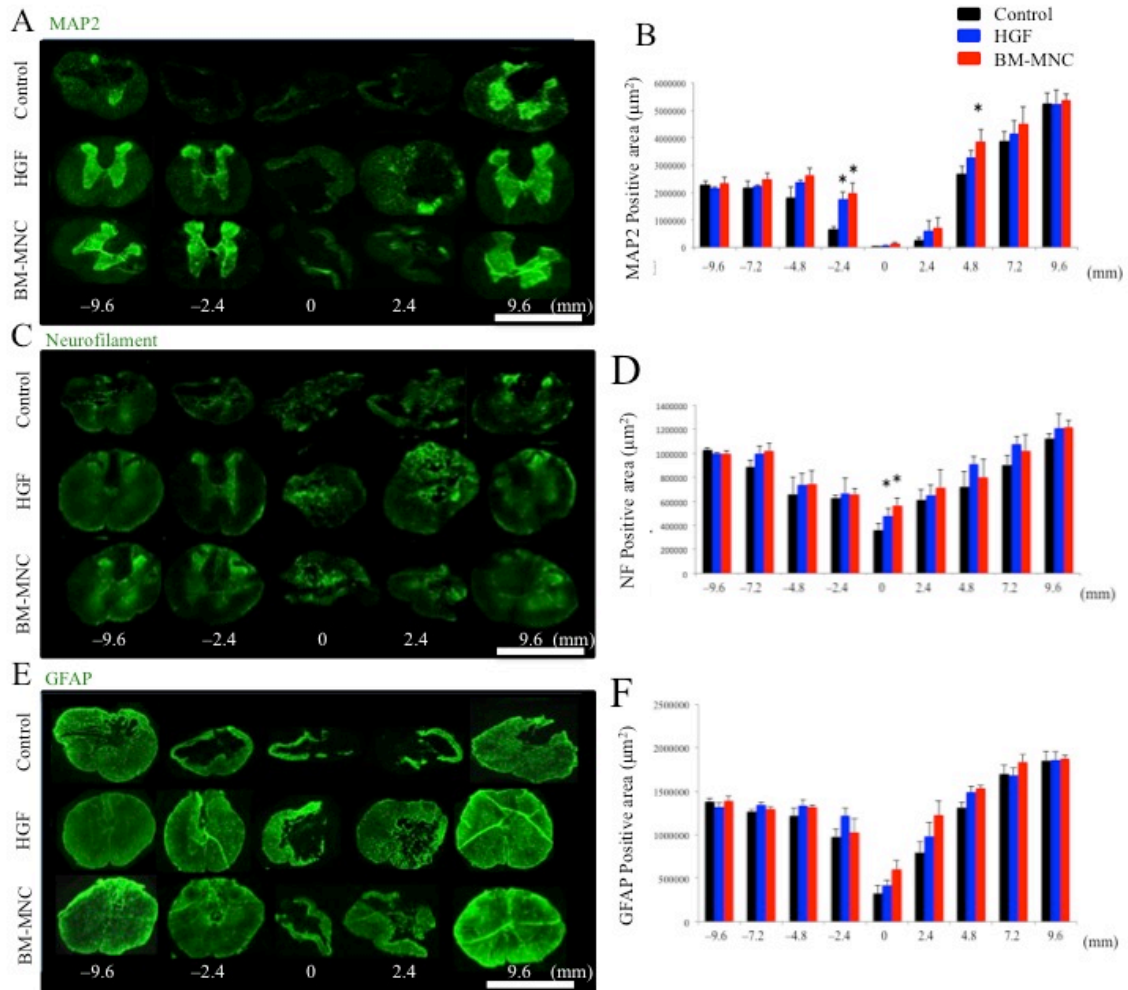


Figure 3. Histopathological changes in the control, HGF, and BM-MNC groups at 28 DPI.

(A, B) Immunoreactivity of MAP2 in spinal cord cross-section. MAP2 immunoreacted area is significantly large in HGF and BM-MNC groups than control at anterior 2.4mm and posterior 4.8mm from injured epicenter. (C, D) Immunoreactivity of Neurofilament in spinal cord cross-section. Neurofilament immunoreacted area is significantly large in HGF and BM-MNC groups than control at injured epicenter. (E, F) Immunoreactivity of GFAP in spinal cord cross-section. GFAP immunoreacted area is larger in HGF and BM-MNC groups than control at injured epicenter, posterior 2.4mm from injured epicenter, and posterior 4.8mm from injured epicenter. Significant differences are not found. \*:  $p < 0.05$  versus control. Scale bar = 2000  $\mu$  m

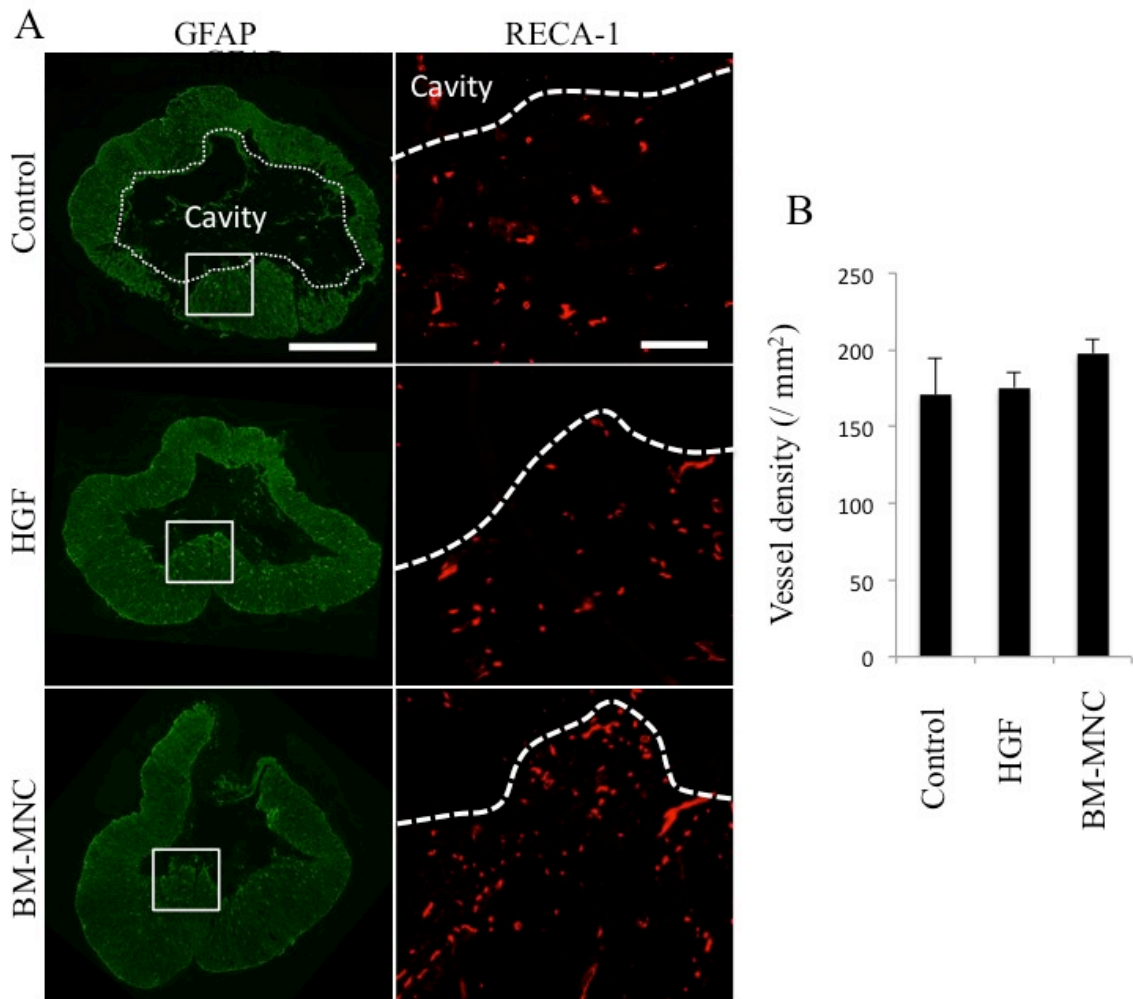
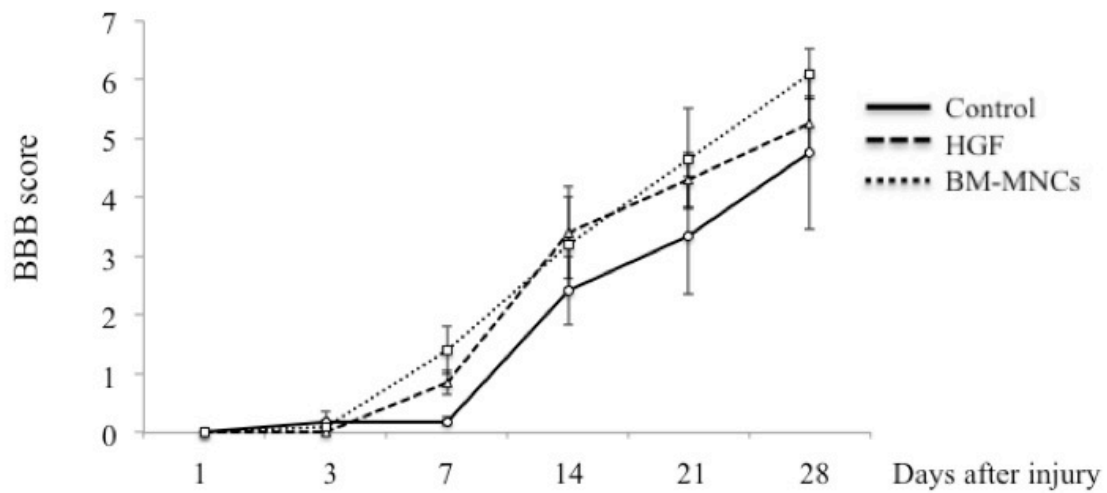
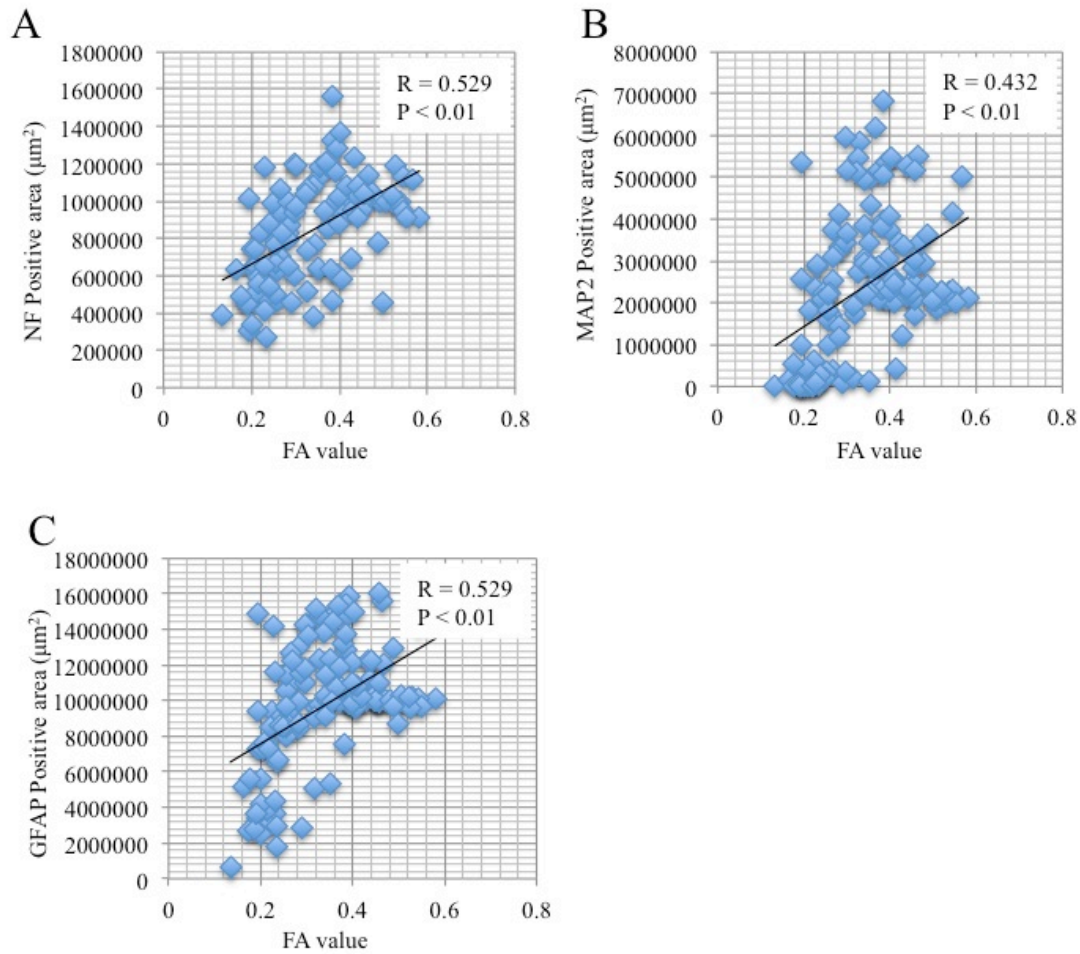


Figure 4. Histopathological changes in the control, HGF, and BM-MNC groups at 28 DPI.

(A), Immunohistochemical detection of blood vessels. Blood vessels immunoreacted with RECA-1 are frequently observed at the area surrounding spared tissue identified as GFAP-negative. (B), Comparison of vessel density at the injured epicenter. The vessel density in BM-MNC group is higher than others. However significant difference is not found. GFAP: Scale bar = 500  $\mu$  m, RECA-1: Scale bar = 500  $\mu$  m. White dotted lines indicate a contour of cavity.



⊠ 5. Evaluation of hindlimb function with BBB scores in the control, HGF, and BM-MNC group. The BBB scores of HGF and BM-MNC are gradually increased after 3 DPI. The BBB score at 7 DPI is higher for the HGF and BM-MNC group than for the control group. The BBB score of control group is gradually increased after 7 DPI. The BBB score at 28 DPI is higher for the HGF and BM-MNC group than for the control group. However significant differences are not found.



☒ 6. Correlation between FA value and immunoreactivity of neuronal markers in the injured spinal cord at 28 DPI. (A), Correlation between FA value and immunoreactivity of Neurofilament. FA value significantly correlate with immunoreactivity of Neurofilament. (B), Correlation between FA value and immunoreactivity of MAP2. FA value significantly correlate with immunoreactivity of MAP2. (C), Correlation between FA value and immunoreactivity of GFAP. FA value significantly correlate with immunoreactivity of GFAP.

## 第 6 章

### 総括

脊髄損傷後に機能回復が得られるかどうかは QOL を維持するために重要な課題である。イヌネコの場合、内科的あるいは外科的治療によって機能回復が得られることが多いが重症例では回復が得られず QOL の低下をきたす。脊髄損傷の予後を左右する重要な要因の一つに治療介入時期が挙げられる。これは多くの治療のターゲットである二次損傷が損傷後早期に進行するためである。骨髄由来単核球 (bone marrow-derived mononuclear cell: BM-MNC) は脊髄損傷急性期に利用可能な唯一の移植細胞ソースであり、抗アポトーシス効果および血管新生効果をもたらすことが報告されている。BM-MNC の治療効果は BMSC と同様に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十分に解明されていない。細胞移植療法はその効果に注目が集まりがちだが、作用機序を明らかにすることでターゲットが明瞭になり、移植適期も明らか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た、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 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



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 1 週間損傷部位に留まり 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 の脊髄実質投与方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方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 脊髄実質単回投与方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 単回投与方法では 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

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。

## 謝辞

本研究を進めるにあたりご指導、ご鞭撻を頂きました、日本獣医生命科学大学獣医外科学教室の神野信夫助教、余戸拓也講師、原田恭治准教授、および原康教授に深く感謝申し上げます。また的確なアドバイス、そして実験試薬を提供して頂いた同大学獣医解剖学教室の添田聡准教授、同大学獣医病理学教室の道下正貴准教授、高橋公正教授、および同大学獣医臨床病理学教室の盆小原誠教授に深く感謝申し上げます。また、的確なアドバイスを賜りましたテキサス大学の小林正人博士研究員、国立長寿医療センターの小原幸弘博士研究員、および日本獣医生命科学大学獣医放射線学教室大学院生の浜本裕二氏に厚くお礼申し上げます。

## 7. 参考文献

Abbott, J., 2002. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *Journal of anatomy* 200, 629–638.

Akiyama, Y., Radtke, C., Honmou, O., and Kocsis, J.D., 2002. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. *Glia* 39, 229–236.

Amer, F., Courtney, P., Randal, B., Itzhak, F., and Birgit, N., 2009. Transplantation of human marrow stromal cells and mononuclear bone marrow cells into the injured spinal cord. *Spine (phila Pa 1976)* 34, 2605–2612.

Bae, Y., 1997. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. *Journal of biological chemistry* 3, 217–221.

Bai, L., Lennon, D.P., Caplan, A.I., DeChant, A., Hecker, J., Kranso, J., Zaremba, A., and Miller, R., 2011. Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models. *Nature neuroscience* 15, 862–870.

Bains, M., and Hall, E., 2012. Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. *Biochemistry biophysics acta* 1822, 675–684.

Basso, M., Beattie, S., and Bresnahan, C., 1995. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of neurotrauma* 12, 1–12.

Brewer, G. J. and Torricelli, J. R., 2007. Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. *Nature protocols* 2, 1490–1498.

Bussolino, F., Di Renzo, M., Ziche, M., Bocchietto, E., Olivero, M., Naldini, L., Gaudino, G., Tamagnone, L., Coffey, A., and Comoglio, P., 1992. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *Journal of cell biology* 199, 629–641.

Casella, T., Bunge, B., and Wood, M., 2006. Endothelial cell loss is not a major cause of neural and glial cell death following contusion injury of the spinal cord. *Experimental neurology* 202, 8–20.

Crowe, J., Bresnahan, C., Shuman, L., Masters, N., and Beattie, S., 1997. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nature medicine* 3, 73–76.

David, M., Yeramian, A., Dunach, M., Llovera, M., Cinti, C., Herreros, A., Comella, J., and Herreros, J., 2008. Signaling by neurotrophins and hepatocyte growth factor regulates axon morphogenesis by differential beta-catenin phosphorylation. *Journal of cell signaling* 121, 2718–2730.

Dohle, E., Bischoff, I., Bose, T., Marsano, A., Banfi, A., Unger, R., and Kirkpatrick, C., 2014. Macrophage-mediated angiogenic activation of outgrowth endothelial cells in co-culture with primary osteoblasts. *European cells and materials* 27, 149–165.

Fabriek, O., Van Haastert, E., Galea, I., Plofliet, M., Dopp, E., Van Den Heuvel, M., Van Den Berg, T., De Groot, C., Van Der Valk, P., and Dijkstra, C., 2005.

CD163-positive perivascular macrophage in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation, *Glia* 51, 297–305.

Fujii, T., Nagaya, N., Iwase, T., Murakami, S., Miyahara, Y., Nishigami, K., Ishibashi-Ueda, H., Shirai, M., Itoh, T., Ishino, K., Sano, S., Kanagawa, K., and Mori, H., 2005. Adrenomedullin enhances therapeutic potency of bone marrow transplantation for myocardial infarction in rats, *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 288, H1444–1450.

Funakoshi, H and Nakamura, T., 2011. Hepatocyte growth factor (HGF): Neurotrophic functions and therapeutic implications for neuronal injury/diseases. *Current signal transduction therapy* 6, 156–167.

Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., and Vandenabeele, P., 1999. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18, 7719–7730.

Fujita, Y., Ihara, M., Ushiki, T., Hirai, H., Kizara-Kondoh, S., Hiraoka, M., Ito, H., and Takahashi, R., 2010. Early protective effect of bone marrow mononuclear cells against ischemic white matter damage through augmentation of cerebral blood flow. *Stroke* 41, 2938–2943.

Guo, X., Bu, X., Li, Z., Yan, Z., Jiang, J., and Zhou, Z., 2012. Comparison of autologous bone marrow mononuclear cells transplantation and mobilization by granulocyte colony-stimulation factor in experimental spinal injury. *International journal of neuroscience* 122, 723–733.

Hayashi, T., Abe, K., and Itoyama, Y., 1998. Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 18, 887–895.

Hess, D., Hill, W., Martin-Studdard, A., Carroll, J., Brailer, J., and Carothers, J., 2002. Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells after stroke, *Stroke* 33, 1362–1368.

Inoue, M., Honmou, O., Oka, S., Houkin, K., Hashi, K., Kocsis, J., 2003. Comparative analysis of remyelinating potential of focal and intravenous administration of autologous bone marrow cells into the rat demyelinated spinal cord. *Glia* 44, 111–118.

Iwase, T., Nagaya, N., Fujii, T., Itoh, T., Murakami, S., Matsumoto, T., Kanagawa, K., Kitamura, S., 2005. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovascular research* 66, 543-551.

Kamihata, H., Matsubara, H., Nishiue, T., Fujiyama, S., Tsutsumi, Y., Ozono, R., Masaki, H., Mori, Y., Iba, O., Tateisi, E., Kosaki, A., Shintani, S., Murohara, T., Imaizumi, T., and Iwasaka, T., 2001. Implantation of bone marrow mononuclear cells



into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblast, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 104, 1046-1052.

Kitamura, K., Fujiyoshi, K., Yamane, J., Toyota, F., Hikishima, K., Nomura, T., Funakoshi, H., Nakamura, T., Aoki, M., Toyama, Y., Okano, H., and Nakamura, M., 2011. Human hepatocyte growth factor promote functional recovery in primates after spinal cord injury. *Plos one* 6, e27706.

Kitamura, K., Iwanami, A., Nakamura, M., Yamane, J., Watanabe, K., Suzuki, Y., Miyazawa, D., Shibata, S., Funakoshi, H., Miyatake, S., Coffin, R., Nakamura, T., Toyama, Y., and Okano, H., 2007. Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury. *Journal of neuroscience research* 85, 2332–2342.

Kokovay, E., Li, L., and Cunningham, L., 2006. Cunningham, Angiogenic recruitment of pericytes from bone marrow after stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 26, 545–555.

Kosai, K., Masumoto, K., Nagata, S., Tsujimoto, Y., and Nakamura, T., 1998. Abrogation of fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochemical and biophysical research communication* 244, 683–690.

Leblond, A., O’Sullivan, J and Caplice, N., 2009. Bone marrow mononuclear stem cells: potential in the treatment of myocardial infarction. *Stem cells and cloning* 2, 11–

19.

Lee, T., Green, B., Dietrich, W., and Yeziarski, R., 1999. Neuroprotective effects of basic fibroblast growth factor following spinal cord contusion injury in the rat. *Journal of neurotrauma* 16, 347–356.

Li, X, Li, J., He, X., Wang, F., Huang, S., and Bai, Z., 2015. Timing of diffusion tensor imaging in the acute spinal cord injury of rats. *Scientific reports* 5, 12639.

Liu, X., Xu, X., Hu, R., Du, C., Zhang, S., McDonald W., Dong, H, Wu, Y., Fan, G., Jacquin, M., Hsc, C., and Choi, D., 1997. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *Journal of neuroscience*. 17, 5395–5406.

Liu, Z., Xiao, M., Balint, K., Soma, A., Pinnix, C., Capobianco, A., Velazquez, O., and Heriyn, M., 2006. Inhibition of endothelial cell proliferation by Notch1 signaling is mediated by repressing MAPK and PI3K/Akt pathways and requires MAML1. *Faseb journal* 20, 1009–1011.

Ma, J., Wang, Q., Fei, T., Han, J., and Chen, Y., 2007. MCP-1 mediates TGF $\beta$ -induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration. *Blood* 109, 987–994.

Madrigal, J.L., Leza, J.C., Polak, P., Kalinin, S., and Feinstein, D.L., 2009. Astrocyte-derived MCP-1 mediates neuroprotective effects of noradrenaline. *Journal of neuroscience* 29, 263–267.

Maina, F., Hillton, M., Andres, R., Wyatt, S., Klein, R., and Davies, M., 1998. Multiple role for hepatocyte growth factor in sympathetic neuron development. *Neuron* 1998, 835–846.

McDonough, A and Martinez-Cerderio, 2012. Endogenous proliferation after spinal cord injury in animal models. *Stem cells international* 2012, 387513.

Meng, D., Lv, D., and Fang, J., 2008. Insulin-like growth factor-1 induces reactive oxygen species production and cell migration through Nox4 and Rac1 in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research* 80, 299–308.

Miyazawa, T., Matsumoto, K., Ohmichi, H., Katoh, H., Yamashima, T., and Nakamura, T., 1998. Protection of hippocampal neurons from ischemia-induced delayed neuronal death by hepatocyte growth factor: a novel neurotrophic factor. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 18, 345–348.

Mizuno, S and Nakamura, T., 2005. Prevention of neutrophil extravasation by hepatocyte growth factor leads to attenuations of tubular apoptosis and renal dysfunction in mouse ischemic kidneys. *American journal of pathology* 166, 1895–1905.

Mondragon-Lozano, R., Diaz-Ruiz, A., Rios, C., Gonzalez, R., Favila, R., Salgado-Ceballos, H., and Roldan-Valadez, E., 2013. Feasibility of in vivo quantitative MRI with diffusion weighted imaging, T2-weighted relaxometry, and

diffusion tensor imaging in a clinical 3T MR scanner for the acute traumatic spinal cord injury of rats. *Spine* 38, E1242–1249.

Neirinckx, V., Coste, C., Franzen, R., Gothot, A., Rogister, B., and Wislet, S., 2014. Neutrophil contribution to spinal cord injury and repair. *Journal of neuroinflammation* 11, 150–159.

Okuno, Y., Nakamura-Ishizu, A., Kishi, K., Suda, T., and Kubota, Y., 2011. Bone marrow-derived cells serve as proangiogenic macrophages but not endothelial cells in wound healing. *Blood* 117, 5264–5272.

Ozaki, M., Haga, S., Zhang, H., Irani, K., and Suzuki, S., 2003. Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress in HGF-stimulated antiapoptotic signaling: role of PI3K and Akt kinase upon rac1. *Cell death and differentiation* 10, 508–515.

Pineau, I., Sun, L., Bastien, D., and Lacroix, S., 2010. Astrocyte initiate inflammation in the injured mouse spinal cord by promoting the entry of neutrophils and inflammatory monocytes in an IL-1 receptor/MyD88-dependent fashion. *Brain, behavior, and immunity* 24, 540–553.

Samdani, A., Paul, C., Betz, R., Fischer, I., and Neuhuber, B., 2009. Transplantation of human bone marrow stromal cells and mono-nuclear bone marrow cells into the injured spinal cord: a comparative study. *Spine (Phila Pa 1976)* 34, 2605-2612.

Sarkar, J., Chaudhary, S., Jassim, S., Ozturk, O., Chamon, W., Ganesh, B., Tibrewal, S., Gandhi, S., Byun, Y., Hallak, J., Mahmud, D., Mahmud, N., Rondelli, D., and Jain, S., 2013. CD11b+GR+myeroid cells secrete NGF and promote trigeminal ganglion neurite outgrowth: Implications for corneal nerve regeneration. *Investigative ophthalmology and visual science* 54, 5920–5936.

Schaer, C., Schoedon, G., Imhof, A., Kurrer, M., and Schaer, D., 2006. Contusive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin, *Circulation research* 99, 943–950.

Serrats, J., Schiltz, C., Garcia-Bueno, N., van Rooijen, N., Reyes, T., and Sawchenko, P., 2010. Dual roles for perivascular macrophages in immune-to-brain signaling, *Neuron* 65, 94–106.

Sköld, M., Gertten, C., Sanderberg-Nordqvist, A., Mathiesen, T., and Holmin, S., VEGF and VEGF receptor expression after experimental brain contusion in rat. *Journal of neurotrauma* 22, 353–367.

Smiler, D., Soltan, M., Soltan, C., and Matthews, C., 2010. Growth factors and gene expression of stem cells: bone marrow compared with peripheral blood. *Implant dentistry* 19, 229-240.

Sun, W., Funakoshi, H., and Nakamura, T., 2002. Overexpression of HGF retards disease progression and prolongs life span in a transgenic mouse model of ALS. *Journal of neuroscience* 22, 6537-6548.

Sundberg, L., Herrera, J., and Narayana, P., 2011. Effect of vascular endothelial growth factor treatment in experimental traumatic spinal cord injury: in vivo longitudinal assessment. *Journal of neurotrauma* 28, 565–578.

Tonges, L., Ostendorf, T., Lamballe, F., Genestine, M., Dono, R., Koch, J., Bahe, M., Maina, F., and Lingor, P., 2011. Hepatocyte growth factor protects retinal ganglion cells by increasing neuronal survival and axonal regeneration in vitro and in vivo. *Journal of neurochemistry* 117, 892–903.

Urdzíkova, L., Jendelová, P., Glogarová, K., Burian, M., Hájek, M., and Syková, E., 2006. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *Journal of neurotrauma* 23, 1379–1391.

Xu, W., Chi, L., Xu, R., Ke, Y., LUo, C., Cai, J., Qiu, M., Gozal, D., and Liu, R., 2005. Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. *Spinal cord* 43, 204–213.

Yoshihara, T., Ohta, M., Itokazu, Y., Matsumoto, N., Dezawa, M., Suzuki, Y., Taguchi, A., Watanabe, Y., Adachi, Y., Ikehara, S., Sugimoto, H., Ide, C., 2007. Neuroprotective effect of bone marrow-derived mononuclear cells promoting functional recovery from

spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* 24, 1026–1036.

Zaverucha-do-valle, C., Gubert, F., Bargas-rega, M., Coronel, J., Mesentier-Louro, L., Mencialha, A., Abdelhay, E., Santiago, M., and Mendez-Otero, R., 2011. Bone marrow mononuclear cells increase retinal ganglion cell survival and axon regeneration in the adult rat. *Cell transplantation* 20, 391–406.

Zhang, D., Li, X., Zhai, X., and He, X., 2015. Feasibility of 3.0 T diffusion-weighted nuclear resonance imaging in the evaluation of functional recovery of rats with complete spinal cord injury. *Neural regeneration research* 10, 412–418.

Ziegelhoeffer, T., Fernandez, B., Kostin, S., Heli, M., Voswinckel, R., Helisch, A., and Schaper, W., 2004. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circulation research* 94, 230–238.