

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 山内 朋裕

学位論文題名

Safe and efficient expansion of human bone marrow stromal cells in platelet lysate and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) for cell therapy

(血小板濃厚液と顆粒球コロニー刺激因子を用いた、安全で効率的なヒト骨髄間質細胞の培養法)

【背景と目的】近年の研究において、不可逆的な中枢神経障害に対して、骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cells ; BMSC) 移植が神経機能の回復に一定の効果を示す報告が数多くされている。自家 BMSC 移植を脳梗塞治療に応用するためには、BMSC の細胞特性を失うことなく安全でより効率的にヒト BMSC (hBMSC) を培養する必要がある。われわれは血小板由来の成長因子を豊富に含むヒト血小板濃厚液 (human platelet lysate ; PL) が、ドナー細胞の培養に必要なウシ胎仔血清 (Fetal calf serum ; FCS) にかわる安全な代替物となることを報告してきた。しかし、高齢者に多い脳梗塞に対する自家 BMSC 移植への臨床応用を考えた場合、適切な治療時期 (therapeutic time window) までに必要な移植細胞数を用意する問題や、ドナー細胞の増殖能低下の懸念がある。ヒト BMSC に PL を用いた培養法で行った中枢神経領域での研究報告は少なく、さらに顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte-colony stimulating factor ; G-CSF) を添加して、細胞増殖能 (培養効率) を促進する試みは報告されていない。そこで本研究の目的は、PL 培養液に G-CSF を添加した培養法を用いて、ヒト BMSC の細胞増殖を促進することが可能であるか検証すること。さらにラット脳梗塞モデルに移植治療を行い、その治療効果および脳梗塞病変への遊走・生着能や神経系細胞への分化能など、BMSC の細胞特性が維持されているかを検証することである。

【材料と方法】LONZA 社から購入した hBMSC (3 名、22-25 歳) を、3 種類 (FCS、PL、PL/G-CSF) の培養液の条件下で細胞培養 (P1 から P4 まで継代) を行い、細胞形態と細胞増殖能を *in vitro* で比較検討した。細胞増殖能は doubling time (倍加時間) での評価を行った。次に P4 まで継代した hBMSC-PL、hBMSC-PL/G-CSF を用いて、ラット中大脳動脈永久閉塞モデルの作成後 7 日目に同側線条体領域に定位的に直接移植を行った。運動機能評価は rotarod テスト を梗塞作成前、作成翌日および、細胞移植後からは 1 週間毎に移植 7 週間まで評価して、vehicle 群との比較を行った。移植 7 週後に灌流固定した大脳を摘出して、脳梗塞面積の評価と組織学的検討を行い、hBMSC-PL 群と hBMSC-PL/G-CSF 群で比較した。数値データは平均±標準偏差で表し、2 群間の差の検定には t 検定、3 群間の差の検定には one-factor ANOVA (Bonferroni's) 検定を行い、 $p < 0.05$ の場合に統計学的に有意と判定した。

【結果】3 種類の培養液条件での細胞培養を比較した結果、いずれの hBMSC も紡錘状の細胞形態であり、プラスチック接着性など BMSC としての性質を保持していた。細胞増殖能は doubling time において、hBMSC-PL は 2/3 名で hBMSC-FCS と同等 (有意差なし)、1/3 名で細胞増殖が促進された。さらに hBMSC-PL/G-CSF は、3/3 名のいずれの hBMSC-FCS および hBMSC-PL より細胞増殖の促進を示した。運動機能評価では vehicle 群に対して、hBMSC-PL/G-CSF 移植群は移植 3 週間後から、hBMSC-PL 移植群は移植 4

週後から有意な改善を示した。移植 7 週後での hBMSC-PL/G-CSF 群と -PL 群の運動機能は同等であった。移植 7 週後に大脳摘出を行い、半球に占める脳梗塞面積の割合を検討した結果、3 群間 (hBMSC-PL/G-CSF 群、-PL 群、vehicle 群) で有意な差を認めなかった (それぞれ $23 \pm 4.9\%$ 、 $23 \pm 3.5\%$ 、 $23 \pm 3.9\%$)。ヒト細胞核特異的モノクローナル抗体 (MAB1281) と神経系細胞マーカー (NeuN または GFAP) との蛍光二重免疫染色により、hBMSC-PL/G-CSF 群と -PL 群で脳梗塞辺縁部に遊走して生着した MAB1281 陽性細胞数に有意な差は見られなかった (それぞれ $2.6 \pm 0.8 \times 10^2/\text{mm}^2$ 、 $2.1 \pm 0.6 \times 10^2/\text{mm}^2$)。さらに脳梗塞辺縁部に生着した MAB1281 陽性細胞の NeuN との二重陽性率 (それぞれ $48.4 \pm 20.5\%$ 、 $45.2 \pm 23.4\%$) および、GFAP との二重陽性率 (それぞれ $26.1 \pm 16.9\%$ 、 $24.3 \pm 14.4\%$) とともに 2 群間での総計学的な有意差を認めなかった。

【考察】動物血清由来の FCS を用いずに PL を用いた hBMSC の培養法は、ヒトに対する臨床応用において安全性の観点から有用性が高い。さらに脳梗塞や高齢者を対象とした細胞移植治療において、BMSC 培養に G-CSF を添加して、細胞増殖を促進することは有用である。今回の研究結果から PL/G-CSF は、PL や FCS よりヒト BMSC の細胞増殖を促進する新たな知見を得た。さらに PL/G-CSF で培養した hBMSC は、その細胞特性を失わずに、脳梗塞モデルに対して、脳梗塞辺縁部に遊走・生着・分化しており、神経保護因子による治療効果を含めた、さまざまなメカニズムを介して運動機能の改善をもたらしたと考えられる。今後は PL に含まれる成長因子の量のばらつきを考慮した PL の適正化や評価法の確立をすること。G-CSF 添加濃度の最適量の検討や、高齢者の hBMSC に対する細胞増殖への効果などを検討する必要がある。

【結論】PL は FCS に代替しうる培養法である。PL/G-CSF において PL や FCS より、ヒト BMSC の増殖能を安全に促進することを示した。PL/G-CSF を用いて培養した hBMSC を脳梗塞モデルに対して直接細胞移植した場合でも、病変への遊走能・生着能および神経系細胞への分化能が維持されており、運動機能は改善して治療効果を示した。本研究によって、PL と G-CSF を用いた培養法は安全かつ有効であり、脳梗塞発症から hBMSC 移植治療までの期間を短縮できる可能性を示している。新たな脳梗塞治療への臨床応用にむけた有用な方法であると考えられた。