

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
池田 直廉	主査 教授 黒 岩 敏 彦 副査 教授 佐 野 浩 一 副査 教授 北 浦 泰 副査 教授 芝 山 雄 老 副査 教授 玉 井 浩
<b>主論文題名</b> Bone Marrow Stromal Cells That Enhanced Fibroblast Growth Factor-2 Secretion by Herpes Simplex Virus Vector Improve Neurological Outcome After Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats. (1 型単純ヘルペスウイルスベクターにて FGF-2 遺伝子を導入した骨髄間質系細胞によるラット一過性局所脳虚血モデルに対する治療効果の検討)	
<b>学位論文内容の要旨</b>	
<p><b>【緒言】</b></p> <p>近年、閉塞性脳血管障害における治療法には進歩が見られるものの、依然として我が国に於いて死因の第3位にあげられ、その治療法は限られている。塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)は中枢神経系において、neuron, glia、血管内皮細胞へ trophic factor として作用し、閉塞性脳血管障害においてもその治療効果が報告されている。一方、骨髄間質系細胞(MSC)は近年閉塞性脳血管障害への治療ツールとしても注目を集めている。特に MSC の脳虚血病変への治療効果は、MSC が分泌する様々なサイトカインが寄与するとされる。そこで、FGF-2 遺伝子を MSC へ導入することで FGF-2 分泌能を強力にした MSC を脳虚血病変へ移植することで、通常の MSC 投与に比してより強力な治療効果を得ることができないかと考えた。FGF-2 遺伝子導入 MSC を一過性中大脳動脈閉塞(MCAO)モデルラット脳内へ移植し、その神経保護効果について評価を行った。特に神経症状の改善度の変化、脳梗塞面積の縮小効果という観点より検討を行った。</p> <p><b>【対象および方法】</b></p> <p>1) HSV-1/ 1764/-4/pR19/ssIL2-FGF-2 による MSC への遺伝子導入効率の検討</p> <p>遺伝子導入が困難とされる MSC へ FGF-2 遺伝子導入を効果的に行うために、以前当研究室で開発した HSV-1 strain 17 由来で、複製にかかわる遺伝子を 3 箇所欠失させた HSV-1/ 1764/-4/pR19 を用いた。同 virus 遺伝子に ssIL2/ FGF-2 遺伝子を homologous recombination にて組み込んで、FGF-2 産生複製不能型 HSV-1(HSV-1/ 1764/-4/pR19/ssIL2-FGF-2 以下; FGF-2/HSV-1)を作成した。7-9 週齢 Wistar rat より採取した MSC に multiplicity of intensity (MOI) 0, 0.1, 1, 5 および 10 にて感染させてその培養上清中の FGF-2 濃度を測定した。</p> <p>2) MCAO ラットモデルに対する FGF-2 遺伝子導入 MSC(以下; FGF-2-modified MSC)の治療効果の検討</p> <p>MCAO モデルに関しては、体重 250-300g Wistar rat に 糸付きシリコン塞栓子を内頸動脈から挿入し、中大脳動脈起始部を閉塞する方法を使用、塞栓子は2時間後に抜去する再灌流モデルとした。中大脳動脈閉塞より 24 時間後に stereotactic head-holder (DAVID KOPF, model 900)を使用し、定位的に FGF-2-modified MSC を脳虚血同側線条体へ投与した(FGF-2 modified MSC 群)。MSC</p>	

への遺伝子導入は移植 24 時間前に FGF-2/HSV-1 を MOI=5 にて *ex vivo* で感染させて、移植直前に trypsin にて回収して使用した。中大脳動脈閉塞後の神経症状の改善度の変化は発症後 day1, 3, 7, 14, 21 にそれぞれ modified Neurological Severity Scores (mNSS)による神経症状評価を行った。比較検討のため PBS 投与群、遺伝子未導入 MSC 投与群(nonmodified MSC 群)を設け、これら3群間での比較検討を行った(各群 n=6)。脳梗塞範囲の検討のため、虚血導入 3 日後、14 日後に rat を sacrifice して脳を摘出、摘出脳は 2mm 間隔冠状断で等分割し 2,3,5-triphenylterazolium (TTC)にて染色、未染色部分を梗塞巣として測定した後、それらの総和を intact side の volume に対する割合で算出した。(各群 n=5)

### 3)各群における MCAO ラット脳実質内の FGF-2 産生、および移植細胞の FGF-2 産生の観察

次に 3 群それぞれにおいて脳虚血導入 3 日後、7 日後脳虚血同側脳実質内の FGF-2 濃度を ELISA 法にて測定して比較検討した。(各群 n=5)また、あらかじめ Hoechst 33258 にて mark した MSC を用いて各群において脳梗塞発症 14 日後に移植部中心を含む 6 $\mu$ m の冠状断切片を作成し、FGF-2 に対する免疫組織染色を行い、MCAO ラット脳内での移植 MSC の FGF-2 産生を観察した。統計処理には one-way ANOVA を使用し、平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。P 値 0.05 以下を有意とした。

## 【結果】

### 1) FGF-2/HSV-1 による MSC への遺伝子導入効率の検討

MSC 単独培養上清中にも FGF-2 はわずかながらに測定された。一方、FGF-2 遺伝子導入を行った MSC 培養上清中には MOI 依存性に高濃度の FGF-2 が測定された。

### 2) 脳梗塞発症後の神経症状の改善度の変化の検討

脳梗塞発症 7 日後以降では、nonmodified MSC 群で PBS 群に比して有意に神経症状改善効果を認めた。さらに 14 日後以降においては、FGF-2 modified MSC 群で nonmodified MSC 群に比して有意に神経症状改善効果を認めた。

### 3) 脳梗塞巣の体積への影響の検討

脳梗塞発症 3 日後においては、各群で明らかな梗塞巣の体積に差を認めなかった。対して、脳梗塞発症 14 日後では、FGF-2-modified MSC 群で他群と比して有意に脳梗塞巣の縮小を認めた。

### 4) 脳実質中における FGF-2 定量

脳梗塞発症 3 日後においては、FGF-2-modified MSC 投与群で脳梗塞同側脳実質中 FGF-2 濃度は他群と比して有意に高濃度であった。脳梗塞発症 7 日後においても同様に、FGF-2-modified MSC 群で有意に高濃度であった。また有意差は認めなかったものの、FGF-2-modified MSC 群では脳梗塞発症 3 日後と比して脳梗塞発症 7 日後脳実質内で FGF-2 濃度は増加傾向にあった。一方、PBS 群では脳梗塞発症 3 日後に比して 7 日後で有意に低下していた。

### 5) 移植 MSC に対する FGF-2 免疫組織染色

PBS 投与群では Hoechst 陽性細胞は認めなかった。Non-modified MSC 投与群、FGF-2-modified MSC 投与群では、Hoechst 陽性細胞および FGF-2 陽性細胞が観察された。それぞれの群において FGF-2、Hoechst 共陽性細胞を count し、Hoechst 陽性細胞におけるその割合を算出したところ、FGF-2-modified MSC 群で 39.79 $\pm$ 7.32%、nonmodified MSC 群で 3.12 $\pm$ 0.76%と有意差を認めた。

## 【考察】

近年になって MSC による脳梗塞巣の縮小効果、脳梗塞後の神経症状改善効果に関する報告が散見される。MSC は多分化能を有し、間質系細胞のみならず neuron や glia への分化も見られ、中枢神経系疾患への応用が期待されている。しかし、MSC の閉塞性脳血管障害モデルにおける治療効果は、MSC が分泌する FGF-2 を含む様々なサイトカインによるところが大きいことが最近の研究によって示されつつある。脳虚血病巣変内での MSC が分泌する FGF-2 の経時的変化に注目すると、虚血発症後より徐々に低下することが報告されている。よって今回の治療戦略で脳虚血病変に対して、nonmodified MSC に比してより強力な治療効果が得られたのは MSC の元来有する様々なサイトカイン分泌能に加え、HSV-1 vector により導入された FGF-2 遺伝子が長期にわたり発現し、MSC へ FGF-2 分泌能を持続的に獲得せしめたことによるものと考ええる。FGF-2 の neuroprotective な mechanism に関しては、これまでに angiogenesis、neurogenesis の観点や anti-apoptosis 作用等の観点からいくつかの報告がある

が意見の一致を見ない。本研究においても、その効果機序に関しては結論を見ないが、少なくとも脳内における FGF-2 protein 量の上昇が脳梗塞後の神経症状の改善、梗塞巣の縮小に参与していることは間違いないと考えられる。今回用いた HSV-1 vector は複製不能型で、感染後は生体内で増殖能を有さないことから安全な virus vector である。さらに、今回の治療戦略においては、*ex vivo* であらかじめ MSC へ HSV-1 vector にて FGF-2 遺伝子を導入したのちに、FGF-2-modified MSC として recipient へ移植を行っている。よって recipient は直接 virus vector に暴露されることがなく、非常に安全な治療方法であると考ええる。本研究で用いた治療戦略は、今後の脳梗塞治療を考える上で一助なると思われる。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	池田 直廉
論文審査担当者		主 査 教授 黒 岩 敏 彦 副 査 教授 佐 野 浩 一 副 査 教授 北 浦 泰 副 査 教授 芝 山 雄 老 副 査 教授 玉 井 浩	
主論文題名 Bone Marrow Stromal Cells That Enhanced Fibroblast Growth Factor-2 Secretion by Herpes Simplex Virus Vector Improve Neurological Outcome After Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats. (ラット一過性局所脳虚血モデルに対する 1 型単純ヘルペスウイルスベクターにて FGF-2 遺伝子を導入した骨髄間質系細胞による治療効果の検討)			
論文審査結果の要旨			
<p>骨髄間質系細胞 (MSC) は、近年閉塞性脳血管障害への治療ツールとしても注目を集めている。MSC の脳虚血病変への治療効果は、特に MSC が分泌する様々なサイトカインが寄与するとされる。申請者は MSC を用いた更なる治療効果獲得を目指して、神経細胞と血管内皮細胞に対する trophic factor である塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) 遺伝子導入 MSC を脳梗塞に対する治療手段として応用することに着目した。種々の virus vector を用いても遺伝子導入が困難とされる MSC に対して、高効率の遺伝子導入が可能な独自の複製不能型 HSV-1 vector (HSV-1/1764/-4/pR19/ssIL2-FGF-2) を用いることで、FGF-2 遺伝子を MSC へ高効率に導入することに成功している。この FGF-2 遺伝子導入 MSC を中大脳動脈閉塞モデルラットへ投与することにより、通常の MSC (遺伝子未導入 MSC) 投与に比してより強力な神経症状改善効果、脳梗塞巣の縮小効果が得られた。治療群脳実質内の FGF-2 濃度は FGF-2 遺伝子導入 MSC 投与群で他群に比して有意に高値を示し、かつ移植 MSC は虚血脳内で FGF-2 を強発現していた。これらより、申請者らの治療戦略で脳虚血病変に対して通常の MSC に比してより強力な治療効果が得られたのは、MSC の元来有する様々なサイトカイン分泌能に加え、HSV-1 vector により導入された FGF-2 遺伝子が長期にわたり発現し、MSC へ FGF-2 分泌能を持続的に獲得せしめたことによるものと考えられる。</p> <p>また、本研究の治療戦略においては、<i>ex vivo</i> であらかじめ MSC へ HSV-1 vector にて FGF-2 遺伝子を導入したのちに FGF-2-modified MSC として recipient へ移植を行っており、virus vector のみを用いた治療方法と比し安全な治療方法であると考えられる。</p> <p>よって、HSV-1 vector にて FGF-2 遺伝子を導入した MSC 脳内移植は脳梗塞に対する有望な治療戦略の一つと成り得ると考えらる。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 9 条に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>主論文公表誌 Stroke. 36: 2725-2730, 2005</p>			