

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
趙明珠	主査 教授 鈴木 廣一 主査 教授 黒岩 敏彦 副査 教授 林 秀行 副査 教授 佐野 浩一 副査 教授 北浦 泰
主論文題名 Novel therapeutic strategy for stroke in rats by bone marrow stromal cells and <i>ex vivo</i> HGF gene transfer with HSV-1 vector (HSV-1 ベクターにより HGF 遺伝子を導入した骨髄間質系細胞を用いたラット脳梗塞モデルに対する新しい治療戦略)	
学位論文内容の要旨	
<p>(緒言)</p> <p>脳梗塞に対しては薬物治療以外に、遺伝子治療や細胞治療にも期待が持たれている。骨髄間質系細胞 (MSC) は骨髄細胞の約 1 割を占めるにすぎないが、骨髄造血微小環境を形成し支えている重要な細胞群である。MSC は造血機能の維持調節を行うため、種々の成長因子などを含め多種類のサイトカインを恒常的に分泌している。さらに MSC は自己複製能に富み、かつ神経細胞やアストログリアへの分化能も有する多能性幹細胞が含まれていることが近年明らかになってきた。一方肝細胞増殖因子 (HGF) は抗アポトーシス効果、神経保護効果など多岐にわたる生理活性が明らかにされており、虚血性脳疾患に対しても治療効果を有する可能性がある。我々は先行する研究において複製不能型単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1) ベクターが MSC に長期にわたり安定して目的遺伝子を高率に発現できることを確かめており、このベクターを用いて細胞治療の候補として期待される MSC に HGF 蛋白を強発現させて脳梗塞の治療に用いれば、これらの相乗効果により高い治療効果が得られるものと考えた。</p> <p>本研究ではラット中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルを作成し、上述の HSV-1 ベクターを用いて HGF 遺伝子を導入した MSC を脳内に移植することにより神経症状が改善するかどうかを、有効治療期間 (therapeutic time window) も含めて検討した。</p> <p>(対象および方法)</p> <p>1) MSC への HGF 遺伝子導入</p> <p>Wistar ラットの脛骨および腓骨より骨髄細胞を採取し、培養・継代を行う過程で浮遊系細胞を除去し、培養フラスコに付着性に生育する細胞を MSC として実験に供した。HGF 遺伝子発現用 HSV-1 ベクターは遺伝子組換え操作により作成し、HGF の cDNA にはベクター由来の HGF であることを免疫組織学的に区別できるよう KT3 epitope の cDNA をタグ遺伝子として挿入した。このベクターを MSC に <i>ex vivo</i> で感染後、培養上清並びに細胞抽出液中の HGF タンパク濃度を ELISA にて測定した。<i>in vivo</i> での治療実験に際しては 5~7 代継代した MSC を用い、重複感染度 5 で遺伝子を導入し、遺伝子導入後 24 時間目に移植実験に用いた。</p> <p>2) ラット MCAO モデルへの脳内移植治療実験</p> <p>脳虚血の作成は、Wistar ラットに糸付きシリコン塞栓子を右内頸動脈から挿入して右中大脳動脈起</p>	

始部を閉塞する方法で行った。塞栓子は2時間後に抜去し再灌流モデルとした。MCAOより2時間後(超急性期治療群)と24時間後(急性期治療群)に定位脳手術装置を使用して HGF-modified MSC(治療遺伝子導入群)、GFP-modified MSC(マーカー遺伝子導入群)、MSC(遺伝子非導入群)、PBS をそれぞれ患側線条体へ注入し、経時的に神経症状の評価を行った。また脳梗塞巣面積の検討のため虚血導入3日後、14日後に各群を6匹ずつ屠殺して脳を摘出し、2, 3, 5-triphenylterazolium (TTC)にて染色し、その梗塞面積を定量評価した。

3) *In vivo*における HGF 遺伝子発現の検討

脳内での HGF の発現は、ウイルスベクター由来のもの MSC およびラット脳組織由来のものとを区別するため、抗 HGF 抗体および抗 KT3 抗体を用いた免疫組織染色にて治療 2 日目および 14 日目において検討した。

4) 神経症状改善機序の解析

神経症状改善機序の解析として、TUNEL 染色により虚血境界領域におけるアポトーシスおよび神経保護効果の検討を治療 7 日目に行った。

5) 統計処理:

神経症状の改善度は ANOVA を用いて、また梗塞巣の減少は Student's *t*-test を用いて統計学的に検討し、いずれも $p < 0.05$ をもって統計学的に有意と判定した。

(結果)

1) *In vitro* における HGF の発現

細胞培養上清中、および細胞抽出液の HGF 濃度は重複感染度依存性の上昇する傾向を示した。重複感染度 5 での HGF 遺伝子導入 MSC の培養上清中 HGF 濃度は、非遺伝子導入 MSC のそれと比較し約 15 倍程度の高値を示した。

2) 脳梗塞発症後の神経症状の改善度の変化の検討

治療 7 日後では超急性期群、急性期治療群とも HGF 遺伝子導入群は PBS 治療群より神経症状は改善し、治療 14 日目でも有意差を認めた。また、治療 14 日目では急性期遺伝子導入群の症状の改善度は超急性期 MSC 単独治療群を上回った。

3) 脳梗塞体積への影響の検討

超急性期治療群では治療 3 日目において、HGF 遺伝子導入群は PBS 対照群よりも有意に梗塞巣が減少し、治療 14 日目では超急性期、急性期治療群双方で HGF 遺伝子導入群は MSC 単独治療群よりも有意に梗塞巣を減少させた。

4) *In vivo* における HGF 遺伝子の発現

免疫組織学的検討において、治療 2 日目のみならず、治療 14 日目でも HGF 遺伝子治療群では一側半球全体にびまん性に HGF の強い発現を認め、その発現は他の 2 群より明らかに多かった。さらにその発現は移植細胞内のみならず細胞間隙にも認められ、この HGF 蛋白は KT3 epitope の免疫染色によりウイルスベクターにより導入された遺伝子由来の蛋白であることを確認した。

5) 神経症状改善機序の解析

治療 7 日目の梗塞境界領域における宿主脳組織の TUNEL 陽性細胞は HGF 遺伝子導入群で有意に減少していた。また、この領域における残存神経細胞は HGF 遺伝子導入群で有意に増加していた。

(考察)

MSC は多分化能を有する幹細胞を含み、間葉系細胞のみならず神経細胞やグリア細胞へも分化することから中枢神経系疾患治療への応用が期待されている。しかし、閉塞性脳血管障害モデルにおける MSC の細胞治療効果は MSC が分泌する様々のサイトカインに因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。本研究では細胞治療に HGF の遺伝子治療の効果を上乗せすることで、脳梗塞の症状の改善および梗塞巣の縮小を促進し、治療有効期間を延長させることにも成功した。本治療で虚血脳と正常脳の境界領域ではアポトーシスに陥る宿主由来の細胞が減少し、残存神経細胞が増加しているため、HGF および MSC が神経保護効果を有すると考えられる。しかし、移植 4 週間後に、HGF 遺伝

子導入群の MSC の一部が GFAP 陽性細胞へ分化していることが確認されたものの、神経細胞への分化は確認できなかった。さらに神経症状の改善は細胞移植後早期に起こっており、移植 MSC の中枢神経系細胞への分化が認められないことより血液脳関門の安定化による浮腫の軽減、血管新生等の要因も考えられる。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	趙明珠
論文審査担当者		主査 教授 鈴木 廣一 主査 教授 黒岩 敏彦 副査 教授 林 秀行 副査 教授 佐野 浩一 副査 教授 北浦 泰	
主論文題名 Novel therapeutic strategy for stroke in rats by bone marrow stromal cells and <i>ex vivo</i> HGF gene transfer with HSV-1 vector (HSV-1 ベクターにより HGF 遺伝子を導入した骨髄間質系細胞を用いたラット脳梗塞モデルに対する新しい治療戦略)			
論文審査結果の要旨			
<p>骨髄間質系細胞(MSC)は閉塞性脳血管障害への治療ツールとして注目を集めている。MSC の脳虚血病変への治療効果には、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ている。申請者は MSC を用いた更なる治療効果の増強を目指して、神経細胞と血管内皮細胞に対する栄養因子である肝細胞増殖因子(HGF)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。種々のウィルスベクターを用いても遺伝子導入が困難とされる MSC に対して、複製不能型 HSV-1 vector (HSV-1/ 1764/-4/pR19/HGF)を用い、HGF 遺伝子を MSC へ高効率に導入している。この HGF 遺伝子導入 MSC を中大脳動脈閉塞モデルラットへ移植することにより、遺伝子未導入 MSC 移植に比較して著明な神経症状改善効果、脳梗塞巣縮小効果が得られた。脳実質内の HGF 発現は HGF 遺伝子導入 MSC 移植群で対照群に比較して有意に増強し、かつ移植 MSC は虚血脳内で HGF を強く発現していた。これらより、申請者は治療戦略で脳虚血病変に対して通常の MSC に比較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 ベクターにより導入された HGF 遺伝子が長期にわたり発現し、MSC へ HGF 分泌能を持続的に発現せしめたことによるものと考えている。</p> <p>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 ベクターにより HGF 遺伝子を導入したのちに HGF-modified MSC として recipient へ移植しており、ウィルスベクターのみを用いた治療方法と比較して安全な治療方法であると申請者は考えている。</p> <p>よって、HSV-1 vector にて HGF 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であると考えられ、今後臨床応用に向けた研究が必要であると思われた。</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 Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism 2006 (in press)</p>			