

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
三木 義仁	主査 教授 黒 岩 敏 彦
	副査 教授 大 槻 勝 紀
	副査 教授 朝 日 通 雄
	副査 教授 花 房 俊 昭
	副査 教授 米 田 博
<p>主論文題名</p> <p>Vascular endothelial growth factor gene-transferred bone marrow stromal cells engineered with a herpes simplex virus type 1 vector can improve neurological deficits and reduce infarction volume in rat brain ischemia</p> <p>(単純ヘルペスウイルスベクター1により血管内皮増殖因子(VEGF)の遺伝子を導入した骨髄間質細胞はラット脳梗塞巣の体積を減じ、神経症状を改善する)</p>	
学位論文内容の要旨	
<p>《緒言》</p> <p>近年、動物モデルにおける脳虚血病変に対する血管内皮増殖因子(VEGF)の持つ治療効果について、いくつかの報告がなされている。加えて、骨髄間質系細胞(BMSCs)が閉塞性脳血管障害において生じる神経脱落症状を改善する潜在能力を持つことも知られている。一方、ヘルペスウイルスは神経親和性が高く、大型の遺伝子組み換えが可能である性質を持つことで近年ウイルスベクターとしての利用が注目されている。そこで本研究では、複製不能型ヘルペスウイルスベクターを用いて VEGF 遺伝子を導入することで VEGF を強発現する骨髄間質系細胞を作製し、定位的に脳梗塞脳内に移植することで骨髄間質系細胞単独治療群と比較して、より治療効果が得られるかどうかを、ラット一過性中大脳動脈閉塞(MCAO)モデルを用いて検討した。</p> <p>《対象及び方法》</p> <p>1) BMSCs への VEGF 遺伝子導入 (<i>in vitro</i> study)</p> <p>8 週齢の Wistar rat 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生育する細胞を骨髄間質系細胞(BMSCs)として使用した。VEGF 遺伝子発現用 HSV-1 ベクターは遺伝子組み換え操作により作製し、このベクターを BMSCs に <i>ex vivo</i> で感染後、培養上清中の VEGF 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 BMSCs を用い重複感染度 5 で遺伝子を導入し、遺伝子導入後 24 時間後に脳内移植に用いた。</p> <p>2) ラット MCAO モデルへの脳内移植 (<i>in vivo</i> study)</p> <p>MCAO モデルは体重 250-280g の Wistar rat に糸つきシリコン塞栓子を内頸動脈から挿入して右中大脳動脈起始部を閉塞する方法を用いた。塞栓子は 2 時間後に抜去し再灌流モデルとした。MCAO より 24 時間後に定位脳手術装置を用いて PBS (sham 治療群)、BMSCs 単独(遺伝子非導入治療群)、VEGF-modified BMSCs (遺伝子導入治療群)をそれぞれ患側線条体へ移植し、28 日後まで各群 5 匹ずつ経時的に神経症状の評価を行った。脳梗塞巣体積の検討は虚血導入 14 日後に各群を 5 匹ずつ屠殺後脳を摘出し、2,3,5-triphenylterazolium (TTC) にて染色、その脳梗塞体積を定量評価した。また脳浮腫の検討のため虚血導入 2 日後、7 日後に各群 4 匹ずつ脳を摘出し、患側健側</p>	

に分離したあと脳乾燥法を用いて各大脳半球の水分含有量を定量評価した。さらに神経症状改善、脳梗塞体積減少の機序解析目的に免疫組織学的検討を虚血導入 7 日後、12 日後、14 日後に行った。

3) 統計処理

統計処理は分散分析を用い、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 VEGF の発現

細胞上清中の VEGF 濃度は重複感染度依存性に上昇する傾向を示した。

2) 脳梗塞発症後の神経症状改善度の変化の検討

治療開始 7 日後までは神経症状の改善度に各群に統計学的な有意差は認めなかったが、14 日後以降は 21 日後、28 日後共に 3 治療群間の改善度に統計学的な有意差を認め、PBS 治療群より BMSCs 単独治療群、BMSCs 単独治療群より VEGF-modified BMSCs 治療群に有意な治療効果を認めた。

3) 脳梗塞体積の検討

治療開始 14 日後での脳梗塞体積の検討でも、3 群間に統計学的に有意な差を認め、PBS 治療群より BMSCs 単独治療群、BMSCs 単独治療群より VEGF-modified BMSCs 治療群に有意な脳梗塞体積減少を認めた。

4) 脳浮腫の検討

治療開始 2 日後、7 日後の脳含有水分量定量による脳浮腫の検討においては、いずれも 3 群間に統計学的な有意差は認めなかった。

5) 神経症状改善、脳梗塞体積減少機序の検討

治療開始 14 日後に行った免疫組織学的検討において、BMSCs 単独治療群より VEGF 遺伝子導入治療群において VEGF タンパクの強い発現を認めた。治療開始 7 日後には脳梗塞境界領域において VEGF 遺伝子導入治療群において、VEGF 遺伝子導入治療群で遺伝子非導入治療群より顕著に TUNEL 陽性細胞の減少および 12 日後には微小血管形成の増加を認めた。

《考察》

BMSCs 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おり、また自家移植も可能であることから幹細胞移植における倫理的問題も解決されると考えられている。さらに閉塞性脳血管障害モデルにおける BMSCs の細胞治療効果は BMSCs が分泌する種々のサイトカイン、成長因子による神経保護効果に因るところが大きい事が近年の研究によって示されつつある。本研究では BMSCs を用いた細胞治療に血管新生効果および神経保護効果を有し、反面脳浮腫を悪化させる働きを持つ VEGF の効果を付加し、治療の好機を適切に選択することで脳浮腫を悪化させることなく神経症状の改善および脳梗塞巣の縮小を促進させることに成功した。その機序としては、脳梗塞境界領域における微小血管新生増加による脳血流改善、VEGF の持つ抗アポトーシス効果が寄与していると考えられた。

今日、日本国内でも骨髄幹細胞を用いた自家移植による脳梗塞治療の臨床治験が開始されたが、今後治療効果の更なる改善において本研究の手法が有用となる可能性が示された。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	三木 義仁
論文審査担当者		主 査 教授 黒 岩 敏 彦	
		副 査 教授 大 槻 勝 紀	
		副 査 教授 朝 日 通 雄	
		副 査 教授 花 房 俊 昭	
		副 査 教授 米 田 博	
主論文題名			
<p>Vascular endothelial growth factor gene-transferred bone marrow stromal cells engineered with a herpes simplex virus type 1 vector can improve neurological deficits and reduce infarction volume in rat brain ischemia (単純ヘルペスウイルスベクター1により血管内皮増殖因子(VEGF)の遺伝子を導入した骨髄間質細胞はラット脳梗塞巣の体積を減じ、神経症状を改善する)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>現代の高齢化社会に伴い、脳卒中が我々に与える脅威は増加の一途を辿っている。またかつては脳梗塞における神経再生、神経症状の改善は困難とされてきたが、近年の知見において閉塞性脳血管障害における骨髄間質系細胞の有用性が示されつつある。さらに様々な栄養因子、とりわけ血管内皮増殖因子(VEGF)が血管新生効果のみならず神経保護効果を有することも知られつつある。</p> <p>そこで申請者は、本研究において一過性脳虚血ラットを疾患モデルとして同種同系の骨髄間質系細胞(BMSCs)を用い、BMSCs 単独治療群(遺伝子非導入治療群)および複製不能型ヘルペスウイルスベクターを用いて VEGF 遺伝子を導入した VEGF-modified BMSCs 治療群(遺伝子導入治療群)の 2 群における治療効果を定位的脳内移植を治療方法として比較検討している。検討内容としては神経症状の改善度、脳梗塞体積、脳浮腫、および免疫組織学的検討を行っている。</p> <p>その結果、神経症状の改善度に関しては治療開始 7 日後までは 2 群間に有意差を認めなかったものの、14 日後以降は 21 日後、28 日後共に遺伝子導入治療群において有意に神経症状改善効果を認めた。また治療開始 14 日後での脳梗塞体積の検討でも、遺伝子導入治療群に有意な脳梗塞体積減少を認めた。その際、2 日後、7 日後の脳浮腫の検討においては両群に明らかな差は認めなかった。さらに免疫組織学的検討において遺伝子導入治療群において VEGF タンパクの強い発現を認め、TUNEL 陽性細胞の減少および微小血管形成の増加を認めたことより、VEGF の持つ血管新生効果や抗アポトーシス効果で示される神経保護効果が神経症状の改善に寄与していると考えられた。また治療の好機を適切に選択することで VEGF の持つ脳浮腫増強作用に影響されず治療効果を得ることが可能であることも示唆された。</p> <p>今日、日本国内でも骨髄幹細胞を用いた自家移植による脳梗塞治療の臨床治験が開始されているが、今後治療効果の更なる改善において本研究の手法が有用となる可能性が示唆されている。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 11 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>			
(主論文公表誌)			
Neurosurgery 61(3): 586-595, 2007			