

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	畠山 公大
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 854 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	保護的末梢血単核球移植による脳梗塞に対する機能回復促進療法
論文審査委員	主査 教授 五十嵐 博中 副査 教授 柿田 明美 副査 教授 小野寺 理

博士論文の要旨

【背景と目的】

脳血管障害は国内の死亡原因の第3位であり、全死亡の8.2%を占める。また、65歳以上の要介護となる原因疾患の17.2%と最多であり、救命できたとしても重度の後遺症が生じる。現在、脳梗塞後遺症の機能回復療法として確立されたものは、リハビリテーションのみであり、さらなる機能回復療法の開発が望まれている。

これまで骨髄由来の細胞を用いた細胞移植療法が、脳梗塞後遺症の機能回復に有効であることが報告されている。しかし、脳梗塞の再発予防治療として、抗血小板療法や抗凝固療法が実施される患者に対し、骨髄穿刺を実施して細胞を回収することは、安全面での懸念が生じる。また、ES細胞を用いた幹細胞療法は、倫理面での問題、iPS細胞を用いた細胞療法は癌化の懸念もあり、細胞療法が一般に普及するためには、安全かつ簡便で、自己由来の細胞療法が望ましい。

申請者らは、これまでミクログリアに軽度の脳梗塞類似の刺激、すなわち低酸素低糖刺激(OGD)を加えることにより、ミクログリアを保護的な極性に変える技術を開発した。また、OGDミクログリアを、脳梗塞7日後に後遺症を有するラットに、動脈投与することで機能予後を著明に回復させることを示した。しかしながら、ミクログリアは成体から分離することが困難である。そこで、同技術のさらなる臨床応用を目指して、ミクログリアに類似した性質を持ち、簡便に取得できる末梢血単核球(PBMC)に着目した。OGD刺激を加えたPBMCが、ミクログリア同様、脳梗塞治療効果を有するかを検討した。

【方法】

体重290~320gの雄性SDラットを使用した。イソフルラン吸入で麻酔を維持し、開胸下に心腔穿刺を行い、末梢血を採取した。Ficoll-Paque PREMIUMを用いて、PBMCを遠心分離した。

通常培養条件では、分離したPBMCをグルコース濃度4500mg/Lの培地を用いて37°Cで19時間培養した。OGD条件では、PBMCとグルコース濃度1000mg/Lの培地を低酸素チャンバー内に静置した。95%窒素、5%二酸化炭素の混合ガスを1時間充填した後、密封し37°Cで18時間培養した。

OGD刺激後の保護的極性の評価として、血管新生、軸索進展を誘導する血管内皮増殖因子VEGFのウエスタンブロッティングを、培養培地を用いて行った。

次に一過性局所脳梗塞モデルラットを作成した。GFP マウス由来の PBMC を 18 時間 OGD 刺激 (OGD-PBMC), あるいは 18 時間の通常培養 (Normoxic-PBMC) を行ったのち, 脳梗塞 7 日後のラットに投与し, 投与細胞が脳内に移行するか確認した。

さらに, 脳梗塞 7 日後のラットに, ラット由来の OGD-PBMC, あるいは Normoxic-PBMC を投与した。細胞投与 21 日後の大脳切片の標本で VEGF の免疫染色を行った。また, 血管内皮細胞のマーカーである CD31, 神経軸索のマーカーである SMI31 についても同様に免疫染色を行い, 血管新生, 軸索伸展の定量的評価を行った。さらに, 運動感覚機能を反映するコーナーテストを用いて, 細胞投与後のラットの神経学的機能評価を行った。

【結果】

VEGF のウェスタンブロッティングでは, OGD-PBMC では VEGF の分泌が認められたのに対し, Normoxic-PBMC では認められなかった。

GFP マウス由来の OGD-PBMC を投与したラットでは, 脳梗塞 10 日後に, 虚血中心とペナンブラの境界に GFP 陽性細胞が認められたのに対し, Normoxic-PBMC 投与群では認められなかった。

また免疫染色では, Normoxic-PBMC 投与群に比し, OGD-PBMC 投与群では虚血中心部辺縁で, VEGF の発現が亢進していた ($p < 0.001$)。また, Normoxic-PBMC 投与群に比し, OGD-PBMC 投与群では虚血中心部辺縁・ペナンブラにおける血管新生, およびペナンブラにおける軸索進展が亢進していた (各 $p < 0.001$)。

コーナーテストでは, 細胞投与 21 日後に, OGD-PBMC 投与群は PBS 群に比し, 機能回復が認められた ($p = 0.02$)。一方, Normoxic-PBMC 群と PBS 投与群の間に運動・感覚機能障害に有意差はなかった ($p = 0.77$)

【考察】

18 時間の OGD 刺激は, PBMC を保護的な極性に変え, OGD-PBMC 投与は, 血管新生, 神経軸索進展を介して, 脳梗塞後の機能回復を促進する可能性が示唆された。

審査結果の要旨

申請者は脳梗塞の新規機能回復治療法としての末梢血単核球 (PBMC) 移植に際して、低酸素低糖刺激 (OGD) を加えることにより, PBMC を保護的な極性に変える技術を開発することを目的として今回の研究を行った。

体重 290~320g の雄性 SD ラットを使用した。イソフルラン吸入で麻酔を維持し, 開胸下に心腔穿刺を行い, 末梢血を採取した。Ficoll-Paque PREMIUM を用いて, PBMC を遠心分離した。通常培養条件に加え, OGD 条件では, PBMC とグルコース濃度 1000 mg/L の培地を低酸素チャンバー内に静置した。95%窒素, 5%二酸化炭素の混合ガスを 1 時間充填した後, 密封し 37°C で 18 時間培養し, OGD 刺激後の保護的な極性の評価として, 血管新生, 軸索進展を誘導する血管内皮増殖因子 VEGF のウェスタンブロッティングを, 培養培地を用いて行った。

更に一過性局所脳梗塞モデルラットに対する効果を検証するため, GFP マウス由来の PBMC を 18 時間 OGD 刺激 (OGD-PBMC), あるいは 18 時間の通常培養 (Normoxic-PBMC) を行ったのち, 脳梗塞 7 日後のラットに投与し, 投与細胞が脳内に移行するか確認した。細胞投与 21 日後の大脳切片の標本で VEGF の免疫染色を行った。また, 血管内皮細胞のマーカーである CD31, 神経軸索のマ-

カーである SMI31 についても同様に免疫染色を行い、血管新生、軸索伸展の定量的評価を行った。さらに、運動感覚機能を反映するコーナーテストを用いて、細胞投与後のラットの神経学的機能評価を行った。

EGF のウェスタンブロッティングでは、OGD-PBMC では VEGF の分泌が認められたのに対し、Normoxic-PBMC では認められなかった。

GFP マウス由来の OGD-PBMC を投与したラットでは、脳梗塞 10 日後に、虚血中心とペナンプラの境界に GFP 陽性細胞が認められた。免疫染色では、Normoxic-PBMC 投与群に比し、OGD-PBMC 投与群では虚血中心部辺縁で、VEGF の発現が亢進し、OGD-PBMC 投与群では虚血中心部辺縁・ペナンプラにおける血管新生、およびペナンプラにおける軸索進展が亢進していた。コーナーテストでは、細胞投与 21 日後に、OGD-PBMC 投与群は PBS 群に比し、機能回復が認められた。

上記より、18 時間の OGD 刺激は、PBMC を保護的な極性に変え、OGD-PBMC 投与は、血管新生、神経軸索進展を介して、脳梗塞後の機能回復を促進する可能性が示唆された。本研究は脳梗塞の新規機能回復治療法の可能性を開くものであり、今後の臨床診断へ寄与すること大である。このため博士課程論文として妥当であると判断した。