

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 二宮 格  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 914 号  
学位授与の日付 令和2年3月23日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博士論文名 末梢血単核球の、低酸素低糖刺激による脳組織保護的特性獲得機序の解明

論文審査委員 主査 教授 藤井 幸彦  
副査 教授 五十嵐 博中  
副査 准教授 清水 宏

### 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7.9%、第4位であると共に、要介護となる原因疾患の15.1%と最多であり、後遺症は社会復帰を困難とする。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やES細胞またはiPS細胞を用いた幹細胞療法が、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、骨髄穿刺は侵襲性があり、脳梗塞二次予防のため抗凝固剤を内服している患者にとっては出血のリスクも懸念される。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。さらにこの技術を応用し、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OGD刺激を加え、この細胞が脳梗塞治療効果を有することを報告した。しかしながら、OGD刺激によるPBMCの保護的性質の獲得及び、血液脳関門を超えて脳実質への移行性獲得は、その機序が不明な点が多い。そのため、申請者は、今回、OGDがPBMCに及ぼす影響について検討した。

#### 【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4500 mg/Lの培地を用いて37°Cで18時間培養した (Noromoxic-PBMC)。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酸素濃度1%未満で18時間培養した (OGD-PBMC)。

OGD刺激後の保護的極性の評価として、細胞溶解液を用いて、抗炎症作用をもつ転写因子PPAR $\gamma$ 、炎症性

PBMC で発現が増加する iNOS, さらに保護的 PBMC で発現が増加する CD206 についてウエスタンブロッティングによる半定量評価を行った. PBMC の極性に関して, CD206/iNOS の比についても検討を行った. 血管新生, 軸索進展を誘導する血管内皮増殖因子 (VEGF), 炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ), 抗炎症サイトカインであるトランスフォーミング増殖因子 (TGF- $\beta$ ) の分泌を, 培養培地のウエスタンブロッティングにて評価した.

さらに, 血液脳関門を超える脳実質移行性獲得の評価のため, 細胞接着因子である走化性タンパク質 MCP-1 についてウエスタンブロッティングによる定量を行った. さらに細胞接着因子である  $\beta$ 1-インテグリン VLA4 について, PBMC の細胞免疫染色を行った.

#### 【結果】

PPAR $\gamma$  は, OGD PBMC 群で発現が増加していた ( $p = 0.0012$ ). OGD-PBMC 群では Normoxic PBMC 群と比較して, CD206/iNOS 比が増加していた ( $p = 0.023$ ). VEGF のウエ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 ( $p = 0.029$ ). また OGD-PBMC 群では Normoxic PBMC 群と比較して, TGF- $\beta$  の分泌が増加していた ( $p = 0.044$ ). TNF- $\alpha$  の分泌には差を認めなかった ( $p = 0.19$ ).

Normoxic-PBMC 群と比較し, OGD-PBMC 群では VLA4 陽性 PBMC の発現が亢進していた ( $P \leq 0.0013$ ).

#### 【考察】

OGD 刺激は, 転写因子 PPAR $\gamma$  発現増加により, 細胞保護的な特性をもつ種々のサイトカイン, 成長因子の分泌を増加させる. また, PBMC における走化性因子 MCP-1 及び細胞接着因子 VLA-4 の発現増加を介して, 脳内への細胞移行を促進する可能性が示唆された. 既報で, OGD-PBMC の細胞療法で, 脳梗塞後の血管新生, 神経軸索進展を介して機能回復をもたらす可能性を報告している. OGD 刺激による PBMC 修飾は, 保護的極性を獲得する新しい治療法になるかもしれない.

#### 審査結果の要旨

【背景と目的】申請者らは, 簡便に取得できる末梢血単核球 (PBMC) に低酸素低糖刺激 (OGD) 刺激を加え, この細胞が脳梗塞治療効果を有することを報告した. 今回, OGD 刺激による PBMC の保護的性質の獲得及び, 血液脳関門を超えて脳実質への移行性獲得の機序を検討した.

【方法】末梢血から単核球を遠心分離し, 通常酸素通常糖濃度 (Normoxic-PBMC) と低酸素低糖濃度培地を用いて, 18 時間培養した (OGD-PBMC).

抗炎症作用をもつ転写因子 PPAR $\gamma$ , 血管新生, 軸索進展を誘導する血管内皮増殖因子 (VEGF), 抗炎症サイトカインであるトランスフォーミング増殖因子 (TGF- $\beta$ ) の分泌ウエスタンブロットで評価した.

さらに, 血液脳関門を超える脳実質移行性獲得の評価のため, 細胞接着因子である走化性タンパク質 MCP-1 についてウエスタンブロッティングによる定量を行った. さらに細胞接着因子である  $\beta$ 1-インテグリン VLA4 について, PBMC の細胞免疫染色を行った.

【結果】OGD PBMC 群で, PPAR $\gamma$  の発現が増加し, VEGF, TGF- $\beta$  の分泌が増加していた. Normoxic-PBMC 群と比較し, OGD-PBMC 群では VLA4 陽性 PBMC の発現が亢進していた.

【考察】OGD 刺激は, 転写因子 PPAR $\gamma$  発現増加により, 細胞保護的なサイトカイン, 成長因子の分泌を増加させ, また走化性因子 MCP-1 及び細胞接着因子 VLA-4 の発現増加を介して, 脳内への細胞移行を促進する可能性が示唆された.

これらを見出した点において学位論文としての価値を認める.