

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	YOU Hua (游 华)
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Vascular endothelial growth factor enhanced the angiogenesis response of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells in a rat model of radiation myelopathy</p> <p>血管内皮成長因子はヒト臍帯由来間葉細胞による放射線性脊髄炎ラットモデルの血管新生を増強する</p> <p>共 著 者 名</p> <p>Li Wei, Jing Zhang, Jia-Ning Wang</p> <p>Neurochemical Research 40巻 1892-1903、2015年掲載</p> <p>研 究 目 的</p> <p>脊髄は放射線反応での遅延反応を生じる代表的な器官であり、悪性腫瘍の放射線照射治療により、稀ではあるが重大な副作用をもたらすことがある。血管障害は放射線性脊髄炎での重要なステップであるので、血管新生は治療を考えるうえで重要である。血管内皮成長因子（VEGF）は脊髄血管新生での有力な治療薬候補で、内皮細胞や造血幹細胞の遊走にも作用している。</p> <p>しかし、VEGF投与は少量投与では効果がなく、過量投与では異常な血管新生が生じるという問題もある。そこで、他の治療法との併用が考えられ、間葉系間質細胞はその候補である。特に臍帯由来間質細胞は倫理的問題が少なく、効率的な収量が期待できる。我々は、ヒト臍帯由来間葉細胞（UC-MSCs）を複数回経静脈投与することにより、脊髄の内皮細胞と毛細血管さらに脊髄血流量が増加することを報告した。今回はこの報告を踏まえ、UC-MSCsとVEGFを併用投与した場合の相加的効果を検討することを研究目的とした。</p> <p>材 料 ・ 方 法</p> <p>動物実験はNIHおよび中国軍医学アカデミーの動物実験ガイドラインに従った。160-200gの雌Sprague-Dawley (SD)ラットをすべての実験に用いた。</p>			

UC-MSCsは倫理委員会の許可を得て、同意を得た妊婦の出産後に臍帯のWhartonのゼリーから採取した。UC-MSCsの多能性分化能はアルカリフォスファターゼ染色による骨芽細胞およびオイルレッドOによる脂肪細胞への分化により確認した。UC-MSCsはいったん凍結保存し、 5×10^3 細胞/cm²の密度で培養24時間後に30 ng/mlリコンビナントヒトVEGFを添加した。細胞は14日間培養し、免疫染色によりvon Willebrand 因子 (vWF)発現を検討した。

放射線照射

30匹のラットを5匹ずつ6群に分けた。(1) 正常無処置群、(2) 放射線照射無処置群 (NT群)、(3) 放射線照射後PBS投与群 (PBS群)、(4) 放射線照射後UC-MSCs単独単回投与群 (UC群)、(5) 放射線照射後VEGF添加培養UC-MSCs投与群 (iUC群)、(6) 放射線照射後VEGFとUC-MSCs併用投与群 (VEGF-UC群) とした。放射線照射はペントバルビタール麻酔後に⁶⁰Coにより30GyをC2-T2に相当する2cmの範囲で150cGy/minにて照射を行った。この照射20週後に脊髄白質の壊死とともに前肢の麻痺が生じる(1)。UC群ラットには尾静脈から 1×10^6 個のUC-MSCs細胞を4回(照射後90日、97日、104日、111日後)注入した。iUC群ラットには照射後VEGF添加培養したUC-MSCsを4回投与した。VEGF-UC群ラットにはUC-MSCsと200 ng リコンビナントヒトVEGFを同時に静脈内投与した。ラットは放射線照射後180日間生存させた。

放射線照射180日後に運動機能を測定した。0, 両側前肢の完全麻痺; 1, 片側の前肢麻痺もしくは両側前肢の不全麻痺; 2, 異常運動; 3, 軽い異常運動; 4, 正常とした。

脊髄血流量 (SCBF) 測定

SCBFはレーザードップラー法にて測定した。ラットを脊椎固定装置に固定し、レーザードップラーのプロブを脊髄に垂直にマイクロマニピュレーターで固定して血流量を測定した。放射線照射前を基準とした相対量を用いた。

試料採取と組織染色

SCBFを測定した後に、心臓から血液を採取し、血清を分離した。C2-T2の脊髄を採取して、一部を浸漬固定し、残りの部分を凍結保存した。固定した脊髄からパラフィン切片を作成した。切片の一部にはニッスル染色し、径20 μ m以上の脊髄前角細胞をカウントした。別の切片はvWFおよびヒト抗核抗体にて免疫染色を行った。

ELISA

ELISAにて以下の分子を測定した。血清中のインターロイキン-1 β (IL-1 β) と tumor necrosis factor- α (TNF- α)、脊髄のbrain-derived neurotrophic factor (BDNF) および glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF)。

内皮細胞と毛細血管定量

核があるvWF陽性内皮細胞数を脊髄の断面積で除したものを内皮細胞密度とし、毛細血管断面の数を脊髄の断面積で除したものを毛細血管密度とした。

統計処理

すべての定量データは平均±SEMで表す。群間の差はone-way ANOVAにより解析し、タイムポイントにおける差はleast significant difference (LSD)にて解析した。p<0.05を有意な差とした。

成 績

UC-MSCsは紡錘形となり、アルカリフォスファターゼ染色とOil Red O染色により骨芽細胞と脂肪細胞に分化することを確認した。また、VEGF存在下の培養により、内皮細胞マーカーのvWFの免疫染色性が見られ、内皮細胞への分化能が認められた。

放射線照射を行ったラット6群の照射180日後の行動評価の結果はNT群とPBS群に比べ、UC群、iUC群およびVEGF-UC群では麻痺からの回復が認められたが、UC群、iUC群およびVEGF-UC群間での有意な差は認められなかった。

病理組織学的検討では、UC-MSCsを注入した3群でのラットの細胞損傷はPBS群より軽減していた。さらに、VEGF-UC群では細胞質の濃染、著名な増大やニッスル小体の不鮮明像などは見られず、iUC群とUC群より良好な病理像が観察された。脊髓前角の神経細胞の細胞数にはVEGF-UC群(15.5 ± 0.8/スライド)、iUC群(15.4 ± 0.7/スライド)とUC群(15.6 ± 0.6/スライド)の間には有意な差はなかった。

内皮細胞数と毛細血管密度はVEGF-UC群とiUC群がUC群より、有意に大きかった。(VEGF-UC群の内皮細胞数: 白質43.8 ± 2.5/mm²、灰白質132.4 ± 5.3/mm²、毛細血管密度: 白質 83.3 ± 5.1/mm²、灰白質279.1 ± 6.5/mm²)、(UC群の内皮細胞数: 白質34.7 ± 2.8/mm²、灰白質115.9 ± 6.2/mm²、毛細血管密度: 白質 69.9 ± 4.6/mm²、灰白質255.2 ± 7.2/mm²)。VEGF-UC群とiUC群間には有意な差はなかった。照射前と照射180日後の脊髓内の血流量の変化はVEGF-UC群(92.5 ± 4.4%)とiUC群(92.3 ± 4.4%)がUC群(79.0 ± 4.3%)より、有意に高かった。

脊髓内のUC-MSCsの生着をヒト抗核抗体MAB1281で検討したところ、VEGF-UC群、iUC群(92.3 ± 4.4%)およびUC群共に、陽性細胞は認められなかった。

血清IL1β、TNFα、脊髓BDNFとGDNFの値はUC群、iUC群およびVEGF-UC群間での有意な差は認められなかった。

考 案

この研究の目的は放射線性脊髄障害後のUC-MSCs移植とVEGF添加による有効性の検討であった。今回の結果は脊髄内の血流量に関しては、VEGFがUC-MSCs単独移植に比べ陽性効果があることを示した。

今回の実験では脊髄の神経細胞損傷は生じたが、脱髄は観察されなかった。放射線照射90日、97、104、111日後にUC-MSCsを投与し、前肢麻痺の改善を観察した。VEGF投与もしくは細胞前処理により麻痺のさらなる軽減は観察できなかったが、VEGF投与により、良好な病理学組織像が得られた。今回の我々の研究では、移植したUC-MSCsの生着は確認できなかった。このことは、移植したUC-MSCsからのサイトカインなどのパラクラインによる作用はあったが、生着数は少なかったものと考えられる。以前我々が報告した様に、間葉系間質細胞には炎症誘発性サイトカインを減少させ、抗炎症性サイトカインを増加させる効果がある。今回も同様の結果を得たが、VEGFによる相加効果は認められなかった。

今回は、UC-MSCsによる血管新生効果が認められ、VEGFにより増強された。これは、VEGFにより骨髄由来の内皮細胞前駆細胞の遊走を増加させ、分化誘導をしたものと考えられる。

細胞の投与方法や投与時期を含め、今後のさらなる研究が必要である。

結 論

放射線照射後にヒト臍帯由来間葉細胞を移植すると放射線性脊髄炎が軽減した。VEGFは移植の効果の一部を増強した。

引用文献




1. Rezvani et al. Modification of radiation myelopathy by the transplantation of neural stem cells in the rat. Radiat Res 156:408-412, 2001.

参考論文

1. Wei L, Zhang J, Xiao XB, Mai HX, Zheng K, Sun WL, Wang L, Liang F, Yang ZL, Liu Y, Wang YQ, Li ZF, Wang JN, Zhang WJ, You H. Multiple injections of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells through the tail vein improve microcirculation and the microenvironment in a rat model of radiation myelopathy. J Transl Med 12, 246, 2014

2. Zhang J, Wei L, Sun WL, Wang L, Zhang WJ, You H. Radiation-induced endothelial cell loss and reduction of the relative magnitude of the blood flow in the rat spinal cord. Brain Res 583, 193-200, 2014.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	游 华
<p>審査委員長 <u>渡部 剛</u> </p> <p>審査委員 <u>高草本 薫</u> </p> <p>審査委員 <u>西川 浩司</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Vascular endothelial growth factor enhanced the angiogenesis response of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells in a rat model of radiation myelopathy. (血管内皮成長因子はヒト臍帯由来間葉間質細胞のラット放射線脊髄炎の血管新生反応を増強する)</p>			
<p>元来再生能力が低い中枢神経組織の損傷部位の治療法の確立は、失われた神経機能の回復を図る臨床的な観点からも、喫緊の課題である。本論文提出者は、放射線の事前照射で脊髄炎を誘発したラットの尾静脈よりヒト臍帯から単離した間葉系細胞 (UC-MSCs) を注入し、ラット個体の神経学的な行動スコアの推移、脊髄の組織学的解析、レーザードップラー法による脊髄の血流量測定、脊髄組織や血清中の炎症関連サイトカインの濃度測定などを指標として、このUC-MSCs の注入が脊髄の傷害部位の修復に寄与するかどうかを検討した。</p> <p>その結果、まず、UC-MSCs 注入で放射線誘発脊髄炎により生じたラット前肢の麻痺が有意に改善することが確認された。この所見は、UC-MSCs 注入が脊髄損傷部位の治療過程に有効に働くことを示唆している。さらに、このUC-MSCs をあらかじめ VEGF で前処理してから注入したり、UC-MSCs と一緒に VEGF を投与したりすることで、UC-MSCs と VEGF の相加的な効果の有無を検討したところ、これらの処置により、障害された脊髄組織における血管内皮細胞および毛細血管の密度が有意に上昇し、血流量も有意に増加した。これらの知見は、機能分子 VEGF が臍帯由来の間葉系細胞と相加的に脊髄の障害部位の局所血液循環を改善し組織修復効果を増強することを示唆するもので、中枢神経系の損傷や様々な疾患の治療成績の向上につながる重要な成果であると思われる。</p> <p>本研究で用いられた方法の妥当性は、適切な対照実験によって検証されており、論文の記述および図版の質・構成も得られた知見を説明するのに十分なものである。また、本論文の内容および関連領域に関して、論文提出者に試問を行ったところ、適切な応答が得られ十分な学力を有することが示された。</p> <p>以上の結果に基づき、審査委員会は本論文を学位論文として適切なものであると判定した。</p>			