

博士論文（要約）

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）

YOU Hua (游 华)

(Li Wei, Jing Zhang, Jia-Ning Wang)

## 学位論文の要約

氏名 YOU Hua (游 华)

学位論文題目

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

共著者名

Li Wei, Jing Zhang, Jia-Ning Wang

Neurochemical Research 40 巻 1892-1903、2015 年掲載

研究目的

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。

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。

材料 ・ 方法

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。

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、 $5 \times 10^3$  細胞/cm<sup>2</sup> 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 <sup>60</sup>Co 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  $1 \times 10^6$  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 $\mu$ 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 (IL-1)、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、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  $\nu$ WF 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 $\pm$ 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  $\nu$ WF 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。脊髄前角の神経細胞の細胞数には VEGF-UC 群 ( $15.5 \pm 0.8$ /スライド)、iUC 群 ( $15.4 \pm 0.7$ /スライド) と UC 群 ( $15.6 \pm 0.6$ /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  $43.8 \pm 2.5$ /mm<sup>2</sup>、灰白質  $132.4 \pm 5.3$ /mm<sup>2</sup>、毛細血管密度: 白質  $83.3 \pm 5.1$ /mm<sup>2</sup>、灰白質  $279.1 \pm 6.5$ /mm<sup>2</sup>)、(UC 群の内皮細胞数: 白質  $34.7 \pm 2.8$ /mm<sup>2</sup>、灰白質  $115.9 \pm 6.2$ /mm<sup>2</sup>、毛細血管密度: 白質  $69.9 \pm 4.6$ /mm<sup>2</sup>、灰白質  $255.2 \pm 7.2$ /mm<sup>2</sup>)。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 日後の脊髄内の血流量の変化は VEGF-UC 群 ( $92.5 \pm 4.4\%$ ) と iUC 群 ( $92.3 \pm 4.4\%$ ) が UC 群 ( $79.0 \pm 4.3$ ) より、有意に高かった。

脊髄内の 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 ( $92.3 \pm 4.4\%$ ) および UC 群共に、陽性細胞は認められなかった。

血清 IL1  $\square$  TNF  $\square$  脊髄 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.