

幹細胞生存率が脳血管障害回復に与える影響の検討

川堀真人

北海道大学病院 脳神経外科・神経細胞治療研究部門

【研究の背景】

長らく脳や脊髄の障害に対する有効な治療法は存在せず、一旦障害を受けた場合、その回復は非常に難しかった。そのような中、幹細胞の発見・開発によって障害の軽減ないしは回復が動物実験レベルにおいて証明され、結果、国内でも複数の臨床研究が進み、大きな期待が集まっている。臨床研究の多くでは使用される幹細胞は凍結した状態で保管・輸送され、施設にて解凍され使用されるプロトコールが頻用されている。しかしながら解凍後の細胞生存率は60-90%とバラツキを認める事、さらに一部の細胞では解凍直後は染色法上生存していると判定されるがその後生着しない細胞(アポトーシスが誘導されている細胞)も存在している事が判明した。しかし幹細胞の生存率が、その後の治療効果にどのような影響を及ぼしているのかについての研究は存在していない。

【目 的】

細胞生存率(≒生着可能率)の違いが、中枢神経損傷(脳梗塞モデル)の回復にどの程度関与しているのか(100%生存が良いのか、むしろある程度の死細胞の混入が適切な炎症および再生機能促進を惹起するのか)を明らかにすることを目的とする。

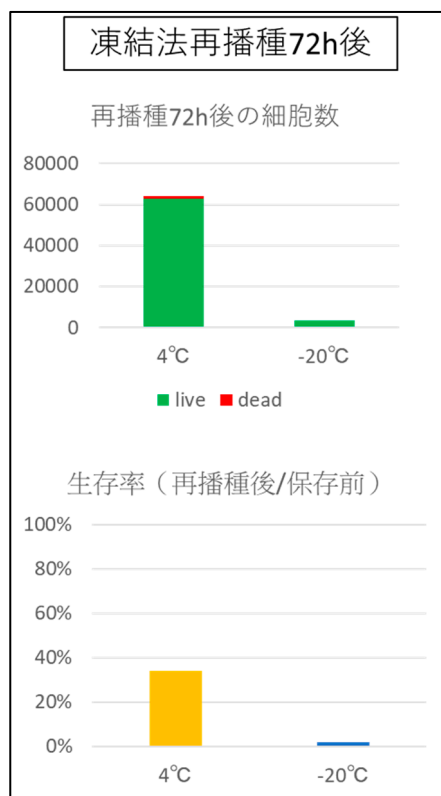
【方 法】

使用細胞: GFP ラット(8-10 週齢)の骨髄液を播種・培養することで間葉系幹細胞(Mesenchymal stromal cell; MSC)を取得する。¹⁾

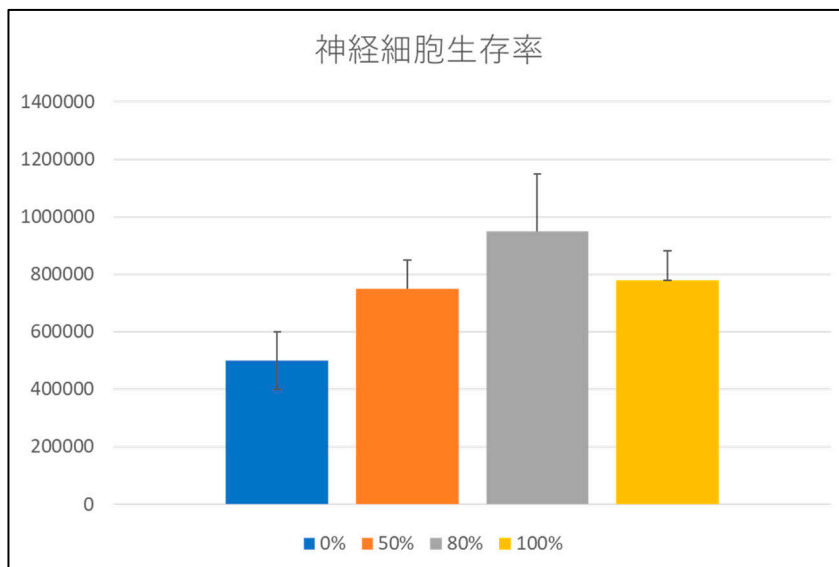
生存率調整法: 通常の凍結保護剤入りの凍結解凍による細胞生存率の調整が最善の方法であるが、凍結解凍後の生存率は一定しないため、放射線照射もしくは凍結保存液無しの凍結法を用いて、任意の細胞生存率を作る。放射線照射は大学で所有している実験用放射線照射装置を用いて、他の細胞で実績のある64Gyの1回照射を行い、24時間後に生存率を蛍光測定法(Logos Biosystems)で計測する。一方、本方法で十分な細胞損傷を与えられない場合においては、凍結保護薬無しの生理食塩水に希釈した状態で幹細胞を凍結させることで、損傷細胞を作り出す。生存率と機能回復の相関(In-vitro): Trans-well を用いて、下段に神経細胞(富士フィルム)を播種し、低酸素チャンバーによる虚血負荷を加える。その後上段に0%、50%、100%の生存率の幹細胞を投与し、下段の神経細胞の生存率を測定する。また培養液中の栄養因子分泌(HGF, BDNF)の定量評価(ELISA)も行う。²⁾

【結 果】

細胞生存率の調整: 64Gy の一回照射を行ったが、照射後の細胞は control に比較し72 時間後・120 時間後においても細胞増殖を認めないものの、照射前に比較し50%程度の細胞数が生存する事が確認された。条件を様々に変更したが、変化は認められなかった。これを用いても0%から100%の細胞を準備する事が出来ない事から、使用する



細胞として不適切と考えられた。そこで生理食塩水に入れた状態で凍結させることで解凍直後には細胞としての形態を保ち、その後死亡する細胞を作成したところ、左図の様にほぼ 0%の生存率の細胞を作成する事が可能になった。以後は本細胞を用いて実験を行った。本細胞を用いて神経細胞に対する回復の程度を確認したところ、100%では無く 80%の生存率の細胞投与が最も機能回復に適している事が確認された。



【考 察】

今回の実験においては当初想定していた 100%生存細胞では無く、80%生存 20%死亡細胞の組み合わせの方が良い結果が得られた。細胞が破綻する事で分泌される内容物が一定量存在する事が組織障害の軽減につながる可能性が示唆された。これは単純な神経細胞単独のモデルにおいて得られたデータであり、実際の脳内には炎症細胞を含む種々の細胞が存在しており、それらの相互作用がどのようになるかについては in-vivo のデータが必須となると考えられる。ただ今回の検討期間においては in-vivo の実験まで着手する事は出来なかった。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

最適な細胞生存率は今後の細胞製剤の品質規格に重要なデータを提供すると考えられ、そのためにも早急に動物モデルにおける生存率の機能回復に関する検討が必要であるが、今回の発見はそのための重要な予備的データを提供する事が出来たと考えられる。

【参考・引用文献】

1. Kawabori M, Kuroda S, Sugiyama T, Ito M, Shichinohe H, Houkin K, et al. Intracerebral, but not intravenous, transplantation of bone marrow stromal cells enhances functional recovery in rat cerebral infarct: An optical imaging study. *Neuropathology*. 2012;32:217-226
2. Wang Z, Higashikawa K, Yasui H, Kuge Y, Ohno Y, Kihara A, et al. Fty720 protects against ischemia-reperfusion injury by preventing the redistribution of tight junction proteins and decreases inflammation in the subacute phase in an experimental stroke model. *Transl Stroke Res*. 2020;11:1103-1116