

学位論文の要旨

※ 整理番号		ふりがな 氏名	わたなべ しゅうじ 渡邊 修司
学位論文題目	<p>Early Transplantation of Mesenchymal Stem Cells After Spinal Cord Injury Relieves Pain Hypersensitivity Through Suppression of Pain-Related Signaling Cascades and Reduced Inflammatory Cell Recruitment (脊髄損傷早期の骨髄間葉系幹細胞移植による疼痛関連シグナルおよび炎症細胞浸潤の抑制効果)</p>		
<p>【研究目的】脊髄損傷後慢性期に約 80%の患者に難治性疼痛がみられ、神経障害性疼痛として臨床問題となる。脊髄損傷後の神経障害性疼痛の発症メカニズムとして、脊髄内に存在するマイクログリアやアストロサイトなどのグリア細胞が関与しているとの報告があり、mitogen-activated protein kinase (MAP kinase)および cyclic AMP response element binding protein (CREB)などの細胞内伝達系の活性化を介して脊髄後角ニューロンへの疼痛刺激を助長することが一つの要因であると考えられている。また、脊髄損傷後の脳脊髄液関門 (blood-spinal cord barrier; BSCB)の破綻によって脊髄内に遊走するマクロファージが、グリア細胞と同様に働き疼痛発症に関与すると報告されている。</p> <p>一方で、骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cell; BMSC)移植により、神経障害性疼痛が軽減することが報告されている。BMSC 移植は、白血病治療の分野ですでに安全性が確認されており、培養方法も確立された治療法である。これまでに、BMSC 移植がグリア細胞の活性化を抑制し疼痛を改善させることが報告されているが、MAP kinase や BSCB などの微小環境の変化について未だ不明な点も多く存在する。本研究では、マウス脊髄損傷モデルを用いて、損傷後早期に BMSC 移植を行い、行動学的および免疫組織学的にその効果を検討することを目的とした。</p> <p>【方法】動物は C57BL/6N マウス (10-12 週齢 ; n=453)を用い、胸髄中等度圧挫損傷モデルを作成 (IH impactor 60Kdyn)した。移植に用いた BMSC は同種マウスの大腿骨、脛骨より採取し、DMEM 培地にて培養を行い、表面マーカー発現が CD90+, CD44+, CD29+, CD45-, CD11b-である細胞を使用した。損傷後 3 日に BMSC $2.0 \times 10^5 / 3\mu\text{l}$ を損傷部に投与し治療群とし、medium のみを投与した損傷群と比較検討した。また、末梢から浸潤するマクロファージはマイクログリアと同様の細胞マーカーを有し通常の免疫染色では区別不可能であるため、green fluorescent protein (GFP)発現陽性の骨髄細胞を移植したキメラマウスを作成し、骨髄由来細胞の動態解析を行った。キメラマウスは、C57BL/6N マウスに total 9.0Gy の放射線照射を行い、直後に GFP マウスの大腿骨、脛骨から採取した骨髄細胞 5.0×10^6 個を尾静脈より投与し作成した。</p> <p>疼痛の行動学的評価として von Frey 式圧刺激鎮痛効果測定装置と plantar 式熱刺激鎮痛効果測定装置 (Ugo Basile 社製) を用いて経時的に疼痛閾値を評価した。組織学的評価として、脊髄損傷後疼痛関連蛋白 (protein kinase C-γ; PKC-γ, pCREB)の損傷脊髄における発現変化、マイクログリア/マクロファージ (CD11b 陽性細胞)における MAP kinase (p-p38、phospho-extracellular signal-regulated kinase; pERK1/2)の発現変化、BSCB の機能評価として Albumin、platelet-derived growth factor receptor-α の脊髄内発現、chimeric マウスを用いてマクロファージ浸潤の変化をそれぞれ経時的に評価した。また、flow cytometry によりこれら蛋白の定量化を行った。炎症細胞活性化・遊走に関わる液性因子の評価は、損傷後脊髄を用いた immunoblotting による炎症性サイトカイン (tumor necrosis factor-α; TNF-α, interleukin-6; IL-6, matrix metalloproteinase 9)、マクロファージ遊走因子 (CCL2, CCL5, CXCL10)、マイクログリア刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)の定量化により行った。</p>			

【結果】行動学的評価において、圧刺激、熱刺激ともに治療群では損傷群と比較し損傷後2週以降で閾値の有意な上昇がみられた。免疫組織化学的に、脊髄損傷後疼痛関連蛋白 (PKC- γ 、pCREB)の発現は、損傷後2週において治療群では有意に低下していた。マイクログリア/マクローファージ (CD11b 陽性細胞)における MAP kinase (p-p38、p-ERK1/2)の発現は、損傷後2週において治療群で低下していた。BSCB機能は、損傷群ではいずれの時期においても透過性亢進がみられたが、治療群では損傷後1週において有意に抑制されていた。キメラマウスを用いた損傷脊髄内における骨髄由来 macrophage (CD11b 陽性、GFP 陽性)の動態は、損傷後14日に末梢由来細胞集積のピークがみられ、4週では細胞数は減少し、治療群ではマクローファージの集積は有意に縮小していた。脊髄由来活性化マイクログリア(CD11b 陽性、GFP 陰性)の細胞数に有意な変化を伴うことはなかった。flow cytometry を用いた定量化においても同様の結果が得られた。immunoblotting では、治療群では炎症性サイトカインおよびマクローファージ遊走因子発現は低下し、マイクログリア刺激因子発現は上昇していた。

【考察】脊髄損傷後には、急性期に MAP kinase の活性化などを通じて脊髄内でのグリア細胞の活性化が起こり炎症性サイトカイン(TNF α 、IL-6)の発現を増強し、二次ニューロンの感受性を亢進する。さらに、急性期における BSCB の破綻のため損傷後亜急性期において末梢からの炎症細胞の浸潤が促進され二次ニューロンの感受性亢進はさらに亢進される。そのため、難治性の疼痛が発症、持続すると考えられ、本実験でも同様の結果が得られた。本研究のように損傷後早期に BMSC 移植治療を行うことにより①痛覚過敏の抑制、②二次ニューロン内の疼痛関連蛋白の発現抑制、③脊髄由来マイクログリア活性と骨髄由来マクローファージ遊走の調整、④BSCB機能の維持といったメカニズムを介して、末梢からの炎症細胞の遊走を抑制し、脊髄損傷後疼痛の抑制効果をもたらした可能性が実験的に示唆された。

【結論】

マウス脊髄損傷モデルに対する損傷後早期の BMSC 移植は脊髄損傷後疼痛の改善に寄与した。そのメカニズムとして、マイクログリア/マクローファージ活性を変化させることで炎症性サイトカイン放出を抑制することや、さらには脳脊髄液関門の破綻抑制により炎症細胞浸潤を軽減させることが実験的に証明された。

- 備考 1 ※印の欄は、記入しないこと。
- 2 学位論文の要旨は、和文により研究の目的、方法、結果、考察、結論等の順に記載し、2,000字程度でタイプ等で印字すること。
- 3 図表は、挿入しないこと。