

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2007 年 3 月 15 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 鄭 偉 

指導責任者名： 宝金 清博 職名： 教授

所属機関名： 札幌医科大学 脳神経外科
〒060-8543

所在地： 札幌市中央区南1条西16丁目

電話： 011-611-2111 内線： 3351

1. 助成金額： 600000 円

2. 研究テーマ

心肺蘇生後の脳損傷に対する骨髄幹細胞移植の検討

3. 成果の概要（100字程度）

ラット心肺蘇生モデルを作成、蘇生後脳症に対し、ヒト骨髄間葉系幹細胞を経静脈的に移植します。脳海馬CA1領域にアポトーシス細胞の減少、脳代謝Lactate蓄積減輕及びラット運動機能の回復を認められました。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ 有（学会名・演題）

(2) 発表した論文 無 ・ 有（雑誌名・題名）

心肺蘇生後の脳損傷に対する骨髄幹細胞移植の検討

研究者氏名	鄭 偉
中国所属機関	中国医科大学脳神経外科
日本研究機関	札幌医科大学脳神経外科
指導責任者	教授 宝金 清博
共同研究者	本望 修

要 旨

心肺停止は臨床的に全脳虚血を引き起こす要因の一つである、かつ、非常に高い死亡率を招く。たとえ速やかに蘇生されたにしても、わずか何分間の血流停止は脳虚血敏感部位の神経細胞も変性、壊死、不可逆な神経症状残った。骨髄幹細胞は神経細胞へ誘導分化、再生医療に有用であることが明らかにしてきた。当実験はラット全脳虚血モデルに対し、心肺蘇生後3時間経静脈的に骨髄幹細胞を移植する。心肺蘇生5時間後ラット海馬領域に狙ってMR Spectraを撮られた、術後3日目脳組織を採って、TUNEL染色を行った。Treadmill Stress Testは心肺蘇生前日、術後1日、3日、7日を行った。骨髄幹細胞移植群ラット海馬領域のApoptosis細胞計数はコントロール群より少なくなった、MR SpectraにてLactateも減少した。ラットの運動機能の改善も認められた。

Key Words 心肺蘇生, 骨髄幹細胞, 移植, 神経再生

緒 言:

ラット脳虚血モデルに人骨髄幹細胞を移植し、ラットの梗塞面積の減少及び予後改善することが認められた。適当の条件で、骨髄幹細胞は神経細胞と神経膠質細胞に分化される。当実験はラット心肺蘇生モデルに対し、経静脈的に骨髄細胞を移植し、治療効果を検討する。

対象と方法:

1 骨髄細胞の精製と純化

健康成人ボランティアから人骨髄をインフォームドコンセント後に後腸骨稜より採取。骨髄単核細胞を分離した。150cm²の培養皿に置き、一晚インキュベートした。遊離細胞を洗浄後、接着細胞をMSCBMで培養した。MCGS、4mM L-グルタミンを含み、5%二酸化炭素、37度環境にて浸潤させた。集合後採取したものは、プライマリーMSCとして凍結保存または遺伝子解析に使用した。

2 全脳虚血モデルの作成

LuRH(1)の方法に従って、ラット心肺蘇生モデルを全脳虚血モデルとして採用する。300グラム、雄、Wistarラットを用い、5%イソフル誘導してから1.5%イソフルで全身麻酔、左大腿静脈にルートを確認、肛門温、血圧、心電図など生命をモニタする。筋弛緩剤を注入して、気管挿管、人口換気を与えられる。右総頸静脈から0.5M KCL 0.3mlを右心房に注入、心臓停止させる。7分後0.062mg Adrenalineと25mg NaHCO₃を加え、ラット体内に注入。同時に人工換気を再開、IAC-CPRを行う。自発呼吸が確認してから気管挿管を抜去、cageに戻される。

3 骨髄幹細胞移植

35匹ラットは3組に分けられる。グループ1（正常コントロール群、5匹）は何も処置されない、グループ2（実験コントロール群、15匹）は心肺蘇生3時間後Medium (MSCBM) 1ml 静注し、グループ3（実験群、15匹）は心肺蘇生3時間後 1×10^7 hMSCsを1ml Mediumに加え静注する。

4 画像的評価

7T動物用のMR装置を用い、MR Spectraを撮る。

ラットはケタミン(50mg/kg)とスキルベン(6mg/kg)にて腹腔麻酔され、動物用ホルダに載せ、磁場に入る。頭はImaging Coilの中心部と合わせる。最初はT2強調画像を撮り、海馬の位置を定め、海馬を含め($2 \times 6 \times 3 \text{mm}^3$)のVolume of Interest範囲でMR Spectraを撮る。撮影条件はTR=3000MS, TE=20MS, TM=30MSである。全てのラットは心肺蘇生5時間後MRSを撮る。LactateとCreatineの比の相対値を記録する。

5 TUNEL

骨髄幹細胞移植3日後、ラットは4%Paraformaldehydeで灌流固定後、20 μm の凍結切片を作る。組織切片は37°CにてTdT bufferに30分Incubation後、TdT、biotin-16-dUTP、dATPを含め混合物を37°Cにて1時間Incubation。PBS洗浄後Avidin-biotinylated enzyme complexと反応され、Apoptosis細胞はDABで茶色に着色され、Methylgreenにて対比染色する。Apoptosis細胞数は光学顕微鏡で計数される。

6 Treadmill Stress Test

ラットは一日20分、週二回で角度0及び20m/minの条件でTreadmillで鍛えされる。ラットを電気刺激と放してモーターベルトの上に置き、ベルトの動きの逆方向に走らせる。電気ショックを避けるためにラットは逃げなければならぬ。電動Treadmillで走る最高スピードを記録する。

結果:

MR Spectra 画像分析

実験群とコントロール群ともに心肺蘇生5時間後、海馬領域のMRS画像を撮る。正常コントロール群はCholine、CreatineとNAA三つのピークしか見られない(Fig1a)。心肺蘇生後のラット(実験コントロール群)は上記三つのピークのほか、1.33ppmにLactateのピークが認められた(Fig1b)。骨髄幹細胞移植群もLactateのピークが認められたけれども、高さはコントロール群より低い(Fig1c)。Choline、Creatine、NAA Fig及びLactate各成分の絶対値が測りにくいので、Lac/Cr Ratioは指標として測られる。Fig2は心肺蘇生コントロール群と骨髄幹細胞移植実験群のLac/Cr Ratioで、骨髄幹細胞移植群はコントロール群より著明に下がる。

Apoptosis 細胞計数

心肺蘇生3日後、脳虚血しやすい海馬CA1領域にTargetし、Apoptosis細胞数を測る。正常ラット海馬CA1領域でApoptosis細胞が見られない(Fig3a)、心肺蘇生後のラット(実験コントロール群)海馬CA1領域で殆どApoptosis細胞が占められた(Fig3b)。骨髄幹細胞移植後のラット海馬CA1領域でApoptosis細胞が見られるけれども、実験コントロール群より著明に減少した(Fig3c)。

行動学的評価

心肺蘇生前日、術後1日、3日と7日、4回Treadmill testを施行した。術前各群差別が認められなく、術後1日、3日、7日とも骨髄幹細胞移植群は実験コントロール群より、ラットの走りスピードが上達になった(Fig4)。

考察:

当実験はラット心肺蘇生モデルに対し、人骨髄幹細胞を経静脈的に移植し、著明な治療効果が認められた。

骨髄幹細胞移植の治療機序はいくつかの仮説がある。一つは骨髄幹細胞の神経保護作用。BDNF、GDNF、NGF、

EGF など神経栄養因子は脳虚血範囲の拡大を抑制する報告がある(2,3)。これらの因子は、Antiapoptotic activity、Antiinflammatory activity、Antiglutamate excitotoxicityなどのメカニズムによって、脳虚血部位の機能保存、神経組織修復作用が認められた(4)。骨髄幹細胞はILs、MCSF、Flt-3などを分泌する(5,6)。神経膠質細胞はこれらの因子の刺激によって、BDNF、NGFなどの栄養因子を分泌され、中枢神経系細胞の成長、分化を促す(7,8)。骨髄幹細胞はVEGF、bFGFなどの血管成長因子を分泌する、これらの因子は虚血部位の血管内皮細胞損傷を防ぐ(9)。骨髄幹細胞は細胞免疫反応を抑制し、脳虚血後二次損傷を防ぐ報告も見られる(10,11)。

移植した人骨髄幹細胞は、内源性脳修復機序を促進する可能性もある。GAP-43、Cyclin D1など細胞増殖、分化、形成の標識物は脳虚血部位に発見された(12)。また、Subventricular Zoneの神経幹細胞は骨髄幹細胞移植に従って増加された。

参考文献：

1. Lu HR: Cerebroprotective effects of flunarizine in an experimental rat model of cardiac arrest, *Am J Emerg Med.* 8 (1990) 1-6.
2. Schabitz W.R. Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17 (1997) 500-506
3. Ay I, Intravenous basic fibroblast growth factor (bFGF) decreases DNA fragmentation and prevents downregulation of Bcl-2 expression in the ischemic brain following middle cerebral artery occlusion in rats, *Mol. Brain Res.* 87 (2001) 71-80.
4. Hirouchi M, Current state on development of neuroprotective agents for cerebral ischemia, *Nippon Yakurigaku Zasshi* 120 (2002) 107- 113.
5. Majumdar M.K, Phenotypic and functional comparison of cultures of marrowderived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells, *J. Cell. Physiol.* 176 (1998) 57-66.
6. Eaves C.J, Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures: II. Analysis of positive and negative regulators produced by stromal cells within the adherent layer, *Blood* 78 (1991) 110- 117.
7. Li Y, Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery, *Neurology* 59 (2002) 514-523.
8. Hamano K, Angiogenesis induced by the implantation of self-bone marrow cells: a new material for therapeutic angiogenesis, *Cell Transplant* 9 (2000) 439- 443.
9. Bernstein D.C, Suppression of human cytotoxic T lymphocyte responses by adherent peripheral blood leukocytes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 532 (1988) 207- 213.
10. Vassilopoulos G, Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion, *Nature* 422 (2003) 901-904.
11. Wang X, Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes, *Nature* 422 (2003) 897- 901.
12. Li Y, Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated protein 2, growth-associated protein 43, and cyclin D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats, *Stroke* 29 (1998) 1972-1980.

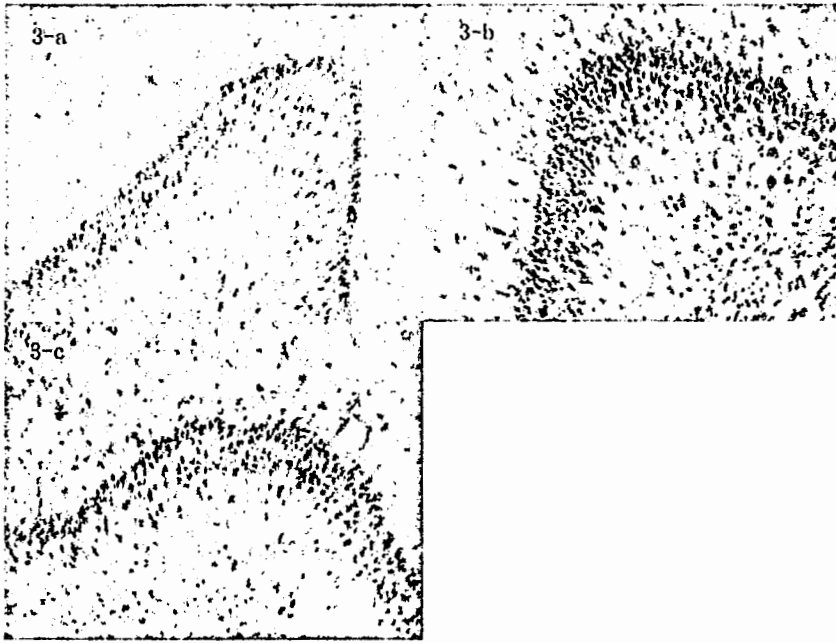


Fig3 Apoptosis 細胞計数。3-a は正常ラット海馬 CA1 領域の画像、3-b は心肺蘇生3日後海馬 CA1 領域の画像、3-c は骨髄幹細胞移植3日後海馬 CA1 領域の画像。

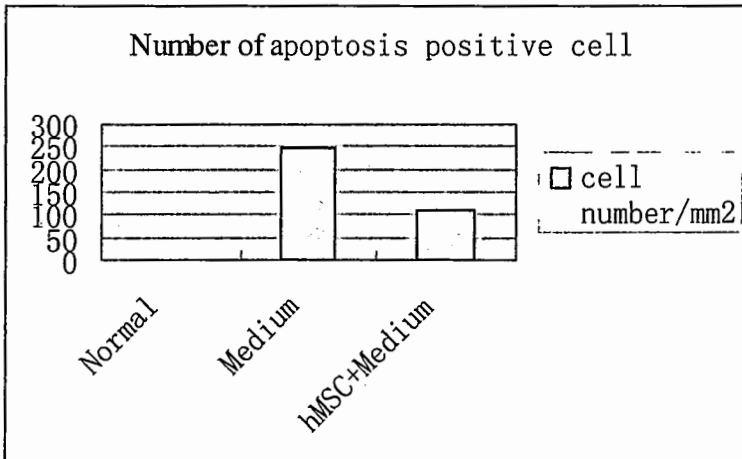


Fig4 正常ラット、心肺蘇生コントロール群と骨髄幹細胞移植実験群 Apoptosis 陽性細胞計数の結果

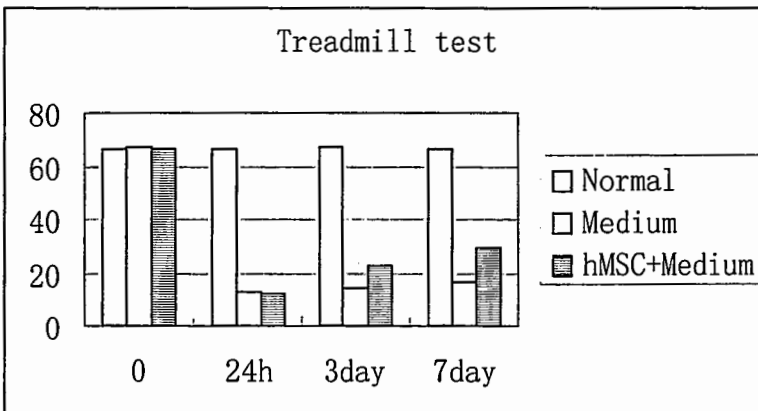


Fig5 正常ラット、心肺蘇生コントロール群と骨髄幹細胞移植実験群 Treadmill test の結果

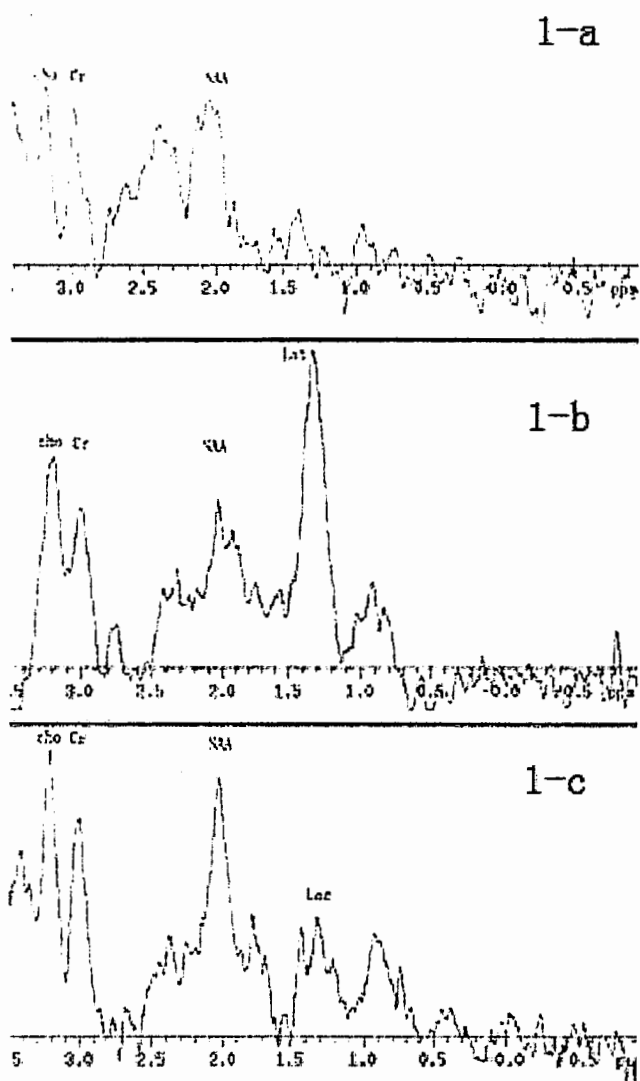


Fig1 海馬倍領域のMRS。1-aは正常ラットの画像、1-bは心肺蘇生5時間後の画像、1-cは骨髄幹細胞移植後の画像。

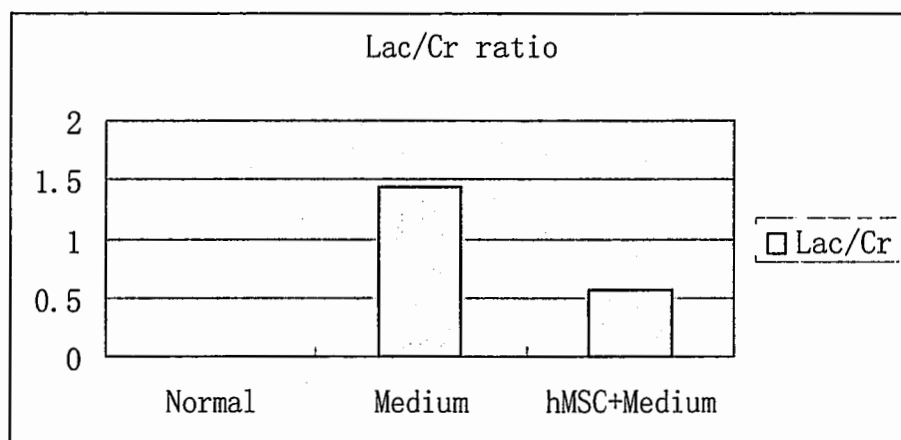


Fig2 正常ラット、心肺蘇生コントロール群と骨髄幹細胞移植実験群のLac/Cr Ratio。