

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Electrical Stimulation Enhances Migratory Ability of Transplanted Bone Marrow Stromal Cells in a Rodent Ischemic Stroke Model

(電気刺激は移植骨髄間質細胞の遊走能を増強する：脳梗塞モデルラットを用いた検討)

守本 純、安原隆雄、亀田雅博、馬越通有、金 一徹、桑原 研、金 恭平、
岡崎三保子、竹内勇人、佐々木達也、豊嶋敦彦、田尻直輝、上利 崇、
Cesario V. Borlongan、伊達 勲

Cellular Physiology and Biochemistry (掲載予定)

平成 28 年 11 月 Society for Neuroscience 46th Annual Meeting 2016 に発表

平成 29 年 3 月 第 42 回日本脳卒中学会学術集会に発表

主 論 文

Electrical Stimulation Enhances Migratory Ability of Transplanted Bone Marrow Stromal Cells in a Rodent Ischemic Stroke Model

(電気刺激は移植骨髄間質細胞の遊走能を増強する：脳梗塞モデルラットを用いた検討)

【緒言】

骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cell: BMSC) 移植は脳梗塞に対する新たな治療法として、近年注目されている。移植のタイミング、移植のルートについて基礎、臨床において様々な検討がなされているが、移植された細胞を適切な部位に誘導する方法は確立されていない。一方電気刺激はパーキンソン病や脳卒中に対して重要な治療戦略の一つとなっており、*in vitro* では様々な細胞が電気刺激により遊走を示すことが報告されており、*in vivo* においても内在性の細胞遊走が惹起されることが報告されている。今回我々は脳梗塞モデルラットに対して脳内 BMSC 移植を行った上で、持続硬膜外電気刺激を行い、移植細胞の遊走能について検討した。

【材料と方法】

BMSC の培養

雄性 Wistar ラットの大腿骨より採取し、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) にて培養した骨髄間質細胞を使用した。移植当日にナノクリスタル (Qtracker® 625 Cell Labeling Kit) を用いて蛍光標識し、濃度を 2.5×10^5 cells/ 4 μ l PBS として、移植用細胞とした。

脳梗塞モデルラットの作成

Day 0 に雄性 Wistar ラットを用いて、全身麻酔下に右総頸動脈と外頸動脈を露出し、結紮。総頸動脈よりシリコンコーティングしたナイロンスレッドを右中大脳動脈まで挿入し、閉塞。90 分後にスレッドを抜去することにより再灌流し、中大脳動脈一過性虚血モデルとした。

細胞移植

中大脳動脈一過性虚血モデルを作成した24時間後(day 1)に行動学的評価を行い、modified neurological severity score (mNSS)で7-12点の個体を選び、定位的に健側である左側の脳梁を標的として、24ゲージのハミルトンシリンジを用いて細胞液を4 μ l移植した。

刺激電極および刺激装置留置

細胞移植後に脳梗塞組織上に開頭を行い、径3mmの皿電極を硬膜上に留置し、固定した。次いで背部皮膚を切開し、刺激装置本体を留置し、皮下を通した電極のリード線と接続。ADコンバータと解析ソフトウェアを用いて刺激波形を確認した後に電極を歯科用樹脂で覆い、皮膚を縫合し、システムを完全に体内に埋め込んだ。

持続電気刺激

システム埋め込み後、直ちに刺激を開始した。刺激条件は単極刺激で強度100 μ A、周波数100Hz、持続時間100 μ 秒にて14日間連続で刺激を行った。コントロール群は同様のシステムを留置し、刺激を行わない群とした。

行動学的評価

Day 0、day 1、day 4、day 8、day 15において体重測定と合わせてmNSSの計測とcylinder testを行った。

mNSSは脳梗塞による運動・感覚障害を評価するスコアリングであり、点数が高いほど症状が悪く、低いほど改善を示す。

Cylinder testは円柱状の亚克力容器内での、ラットの両前肢の壁面に触れた回数を3分間計測した。前肢壁面接触の左右差は(右前肢の接触回数—左前肢の接触回数/総接触回数)という計算式を用いて評価した。

脳梗塞範囲の評価

Day 15で屠殺した後に灌流固定した脳を凍結し、クリオスタットで細胞移植部位前後360 μ mの範囲を30 μ mの厚さに薄切した。Nissl染色により脳梗塞範囲を計測した。

細胞遊走の評価

DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)にて核を染色した後に、蛍光顕微鏡を用いてナノクリスタルと DAPI でラベルされる移植細胞の遊走距離と遊走範囲を測定した。

遊走距離は刺激側に向かい最も遊走したナノクリスタルと DAPI がともに陽性の細胞と、細胞移植部位との距離を計測し評価した。

遊走範囲は細胞移植部位の前方 360 μ m と後方 360 μ m の切片を用いて、最も遊走した細胞を線で結び、得られた多角形の面積を Image J を用いて計測し、前方・後方の値を平均して評価した。

免疫蛍光染色

細胞移植部位の免疫蛍光染色では 1 次抗体として抗 CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type4)抗体、2 次抗体として Alexa Fluor 488 抗体を使用した。

Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)

脳梗塞モデルラットに刺激装置を埋め込み、1 週間と 2 週間連続で電気刺激を行った後に脳組織を取り出し、両側皮質と線条体部の組織をタンパク抽出液中で超音波破碎し、遠心分離を用いてタンパクを抽出し、SDF-1 α (stromal cell-derived factor 1 alpha) ELISA assay kit を使用して、プロトコールに則り測定した。

【結果】

脳梗塞モデルラットに対する持続電気刺激は行動学的な改善をきたす

体重変化は両群間で有意差を認めなかったが、電気刺激群では mNSS、Cylinder test のいずれも、コントロール群と比較して有意な改善を認めていた。

脳梗塞モデルラットに対する持続電気刺激は脳梗塞範囲を縮小する

電気刺激群ではコントロール群と比較して、有意に脳梗塞範囲が縮小していた。

電気刺激は移植された細胞の遊走能を増強する

電気刺激群では移植した細胞の梗塞側に向かう遊走距離、移植部位からの拡散範囲のいずれも有意に増大しており、電気刺激による遊走能の増強が確認された。

電気刺激は脳梗塞側 SDF-1 α の発現を高める

1 週間の電気刺激群では梗塞側かつ刺激側である右皮質、線条体の SDF-1 α 濃度が対側と比較して有意に上昇していた。一方で非刺激群では有意差を認めず、2 週間群でも刺激・非刺激群ともに有意差を認めなかった。

1 週間群と 2 週間群の比較では、刺激群の線条体のみで、1 週間群の SDF-1 α 濃度が 2 週間群と比較して有意に高かった。

【考察】

我々は脳梗塞モデルラットに対する硬膜外持続電気刺激が移植した細胞の遊走を増強することを示した。細胞の *electrotaxis* については *in vitro* の実験において幾つか報告があり、神経幹細胞や間葉系幹細胞においてもその遊走が示されている。また *in vivo* の実験においても脳室下帯で新生された細胞が硬膜外電気刺激によって刺激部位に向かい遊走することが報告されている。ラット脳内に移植された細胞も電気刺激にて遊走することが報告されているが、脳内の組織構造に阻まれその遊走距離は限定的とされている。このことから、今回の結果には電気性走以外にも遊走を増強させる因子が存在すると考えられた。

ここで SDF-1 α /CXCR4 経路に着目すると、脳梗塞モデルラットにおいて局所で産生された SDF-1 α が BMSC の表面に発現した CXCR4 とともに移植した BMSC の遊走に重要な役割を果たすことが報告されている。さらに BMSC は CXCR4 を発現することが知られており、今回移植した細胞も電気刺激の有無にかかわらず CXCR4 の発現が認められた。CXCR4 陽性細胞が SDF-1 α の濃度勾配に従って遊走することが *in vivo*、*in vitro* でも示されており、今回の実験では電気刺激にて高められた SDF-1 α の濃度勾配が移植した BMSC の遊走に重要な役割を果たした可能性が示唆された。

SDF-1 α の発現時期については、脳梗塞において虚血発症後数日でピークとなり、その後 14 日目まで発現が増加すると報告されている。我々の研究でも刺激群の線条

体において、1週間刺激群では2週間刺激群と比較して有意に SDF-1 α 濃度が上昇しており、電気刺激は虚血脳組織における SDF-1 α 発現のピークを高めることが示唆された。

電気刺激は皮質の細胞を保護し、機能回復を促進することや、リハビリテーションとの組み合わせで内因性の神経新生を促進することが報告されている。今回我々の用いた刺激システムは2週間の連続刺激と刺激中にラットが自由に動くことを可能としており、行動学的な改善を促進した可能性がある。

【結論】

脳梗塞モデルラットに対し、脳内骨髄間質細胞移植を行った上で、電気刺激を行った。電気刺激は *electrotaxis* に加え、SDF-1 α の濃度勾配を増強し、*chemotaxis* によっても遊走能を増強する可能性が示された。移植細胞を目的とする部位に遊走させることができれば、より大きな治療効果が得られる可能性がある。