

Title	In vivo imaging of engrafted neural stem cells : its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury
Sub Title	脊髄損傷に対する移植神経幹細胞のバイオイメーキング
Author	岡田, 誠司
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.2 (2006. 6) ,p.11-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060602-0011">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060602-0011</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# In vivo imaging of engrafted neural stem cells : its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury

(脊髄損傷に対する移植神経幹細胞のバイオイメージング)

岡田 誠司

## 内容の要旨

医療分野に於いて様々な疾患に対する細胞移植療法の有用性が研究されている。特に近年、これまで治療法の存在しなかった脳や脊髄といった中枢神経系の外傷に対し、新しい治療法として神経幹細胞移植が注目を浴びている。しかしながら、移植細胞の生存や体内移動などの経時的動態評価は組織切片に基づくもので、何個の細胞が正確に移植されたか、あるいは何%の細胞が生着しているかを動物を生かしたまま解明するのは困難であった。これらのことが解明されれば神経幹細胞の性質に関する基礎的研究を前進させるのみならず、より効果的な移植の方法やタイミングなど、将来の臨床応用へのプロトコル作成に有用であることは間違いない。そこで我々は蛍光の原理を利用したバイオイメージングシステムを利用して、マウスの損傷脊髄に移植した神経幹細胞の動態を観察することを目的とした。このイメージングシステムは発光酵素である firefly luciferase とその基質である luciferin の反応による微弱な発光を超高感度 CCD カメラにより検出するというもので、この反応が酵素と ATP 依存性であるため生きた細胞のみしか発光しない。そのため MRI などの他のイメージングシステムとことなり正確な移植細胞の生存率を求めることができる。我々はレトロウイルスの一種であるレンチウイルスを用いて、蛍光と発光を同時に呈するレポーター遺伝子を神経幹細胞に導入し、この細胞の性質を検討した。その結果、レポーター遺伝子を導入してもニューロンやグリアへの分化率は変化しないことや、in vitro ではわずか 100 個程度の細胞数で十分に検出できることを確認した。これらの細胞の発光強度は非常に強く、これまでは腫瘍細胞や感染巣等、移植後に発光が経時的に増加する系でしかこのイメージングシステムは適応されていなかったが、我々は損傷脊髄への移植のような移植後に細胞数が激減する系においても有用であることを初めて示した。損傷脊髄へ移植された細胞の 80% 近くは移植後数日で死滅してしまうが、残った細胞は移植部位に生着し長期にわたり比較的安定した発光を保つことが明らかになった。また、損傷直後と損傷後亜急性期で移植した場合では細胞の生存率は変化なかったものの、細胞の生着部位や分化の割合には差が見られた。とくに亜急性期に移植した場合には移植細胞の移動も動物を生かしたまま観察できた。優れたイメージングの手法は医学的研究を大きく発展させるが、我々の本論文での方法は理論上すべての細胞移植療法研究に適応できるものであり、今後の発展応用が期待される。

## 論文審査の要旨

これまで細胞移植の研究領域では移植細胞の生存や体内移動などの経時的動態評価は組織切片に基づくもので、それぞれの time point で動物を sacrifice するため膨大な個体数が必要であり、また個体間のばらつきもあるため解析は非常に労力を要するものであった。動物を生かしたまま同一個体で移植細胞の生存や動態を把握することができれば非常に強力な研究ツールと成り得る。我々はまず、Luciferase 遺伝子を有するトランスジェニックマウス由来の神経幹細胞とレンチウイルス・ベクターにより Luciferase 遺伝子を導入した神経幹細胞の発光強度を比較検討したが、前者に比べ後者では 5000 倍高い発光強度が

得られた。さらにこれらの細胞の発光強度が細胞数と相関することを in vitro, in vivo にて示した。レポーター遺伝子をウイルス導入した神経幹細胞を in vitro にて分化させても分化形態に影響を与えないことを確認した。16 匹のマウス脊髄内に、neurosphere 法により増殖した後に 50 万個に細胞数を調整した神経幹・前駆細胞を移植し、その直後に発光量を測ることで正確に移植が行われているかを確認した。その結果、同量の細胞数を移植したつもりでも発光量にある程度のばらつきが見られた ( $236,000-8,474,000$  photon/sec,  $4.60 \pm 0.45 \times 10^6$  photon/mouse/sec) が、標準誤差が 9.7% と実験精度には問題ないと判断した。急性期移植群と亜急性期移植群で移植後の発光強度を測定したが、両者とも移植後 4 日でそれぞれ 20.5%, 22.1% に減弱が見られ、移植後 6 週では 16.4%, 14.6% であった。両群の細胞生存率に有意差は見られなかったが、生着細胞のうち、急性期移植群ではニューロンやオリゴデンドロサイトへの分化率はそれぞれ 0.99%, 1.27% であったが、亜急性期移植群ではそれぞれ 8.33%, 11.8% であった。

審査では、移植細胞の発光強度は細胞の生存率の他にどのような因子によって影響されるのかとの質問がなされた。これに対して、移植部位の血流動態および移植部位から体表面までの距離が大きく発光強度に影響するとの回答がなされた。さらに、移植後に細胞が拡散する場所、たとえば循環器系に移植された場合これを長期に追跡することが可能かとの質問に対しては、移植後に増殖する造血幹細胞などの追跡であれば十分可能であるとの回答がなされた。損傷脊髄に移植された細胞の移動に関してどこまで正確にイメージングで反映できるのかとの指摘に対しては、ある程度以上の細胞数が移動しなければイメージングには反映されないため、細胞の正確な局在等に関しては MRI との併用による in vivo イメージングを行うことが望ましいと回答された。また、これまでの報告ではラット脊髄損傷においては急性期移植と亜急性期移植で細胞の生存率に差があるのに対し、本研究においてマウス脊髄損傷では差がなかった理由についても質問がなされたが、ラット等では損傷中心部に空洞が形成されるため移植細胞が生着しないがマウスでは結合組織癒着が形成されこれに移植細胞がトラップされるため急性期移植でも細胞の生着が見られたのだろうとの回答がなされた。さらに、急性期移植と亜急性期移植で細胞の分化形態に違いは見られたがこれが機能的回復にどのような影響を与えたのかとの質問に対しては、本研究では未検討であるが今後生着細胞のみを選択的に ablation する系をこのイメージングシステムと組み合わせることで明らかにしたいとの回答があった。さらに、亜急性期移植群では運動機能回復傾向が持続的に認められたため、より長期に運動機能評価を継続するべきであったとの指摘がなされた。

以上のように、本研究は今後検討されるべき点を残しているものの、非侵襲的かつ簡便に移植細胞の追跡が可能な本システムは、幅広い研究領域に応用でき再生医学研究に於いて強力なツールと成り得るという点で非常に有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 生理学 岡野 栄之  
内科学 鈴木 則宏 解剖学 仲嶋 一範  
外科学 河瀬 斌

学力監認担当者：  
審査委員長：鈴木 則宏

試問日：平成 18 年 1 月 19 日