



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Safe and efficient expansion of human bone marrow stromal cells in platelet lysate and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) for cell therapy [an abstract of entire text]
Author(s)	山内, 朋裕
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2110 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11238号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56237
Type	doctoral thesis
File Information	Tomohiro_Yamauchi_summary.pdf



学 位 論 文
(要約)

**Safe and efficient expansion of human
bone marrow stromal cells in platelet
lysate and granulocyte-colony
stimulating factor (G-CSF) for cell
therapy**

(血小板濃厚液と顆粒球コロニー刺激因子を用いた、
安全で効率的なヒト骨髄間質細胞の培養法)

2014 年 3 月

北 海 道 大 学

山 内 朋 裕

Tomohiro Yamauchi

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	3 頁
略語表	5 頁
第一章 実験方法	6 頁
実験結果	7 頁
小括	8 頁
第二章 実験方法	9 頁
実験結果	11 頁
小括	11 頁
考察	13 頁
総括および結論	15 頁
謝辞	16 頁
引用文献	17 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Tomohiro Yamauchi, Hisayasu Saito, Masaki Ito, Masahito Kawabori, Michiyuki Miyamoto, Hideo Shichinohe, Kiyohiro Houkin, and Satoshi Kuroda. Platelet lysate and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) serve safe and accelerated expansion of human bone marrow stromal cells for cell therapy: *Acta Neurobiologiae Experimentalis* (submitted)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 山内 朋裕, 黒田 敏, 伊東 雅基, 杉山 拓, 宮本 倫行, 齋藤 久泰, 七戸 秀夫, 寶金 清博

演題名 ; 脳梗塞をターゲットとした神経再生療法ーヒト血小板濃厚液と顆粒球コロニー刺激因子を用いた骨髄間質細胞の効率的な培養法ー

学会名 ; 第 37 回日本脳卒中学会総会, 2012 年 4 月 28 日, 福岡国際会議場

2. 山内 朋裕, 黒田 敏, 伊東 雅基, 杉山 拓, 宮本 倫行, 齋藤 久泰, 七戸 秀夫, 寶金 清博

演題名 ; 脳梗塞をターゲットとした神経再生療法ーヒト血小板濃厚液と顆粒球コロニー刺激因子を用いた骨髄間質細胞の効率的な培養法ー

学会名 ; 第 11 回日本再生医療学会総会, 2012 年 6 月 13 日, パシフィコ横浜

3. 山内 朋裕, 黒田 敏, 伊東 雅基, 杉山 拓, 宮本 倫行, 齋藤 久泰, 七戸 秀夫, 寶金 清博

演題名 ; 脳梗塞をターゲットとした神経再生療法ーヒト血小板濃厚液と顆粒球コロニー刺激因子を用いた骨髄間質細胞の効率的な培養法ー

学会名 ; 第 71 回日本脳神経外科学会学術総会, 2012 年 10 月 19 日, 大阪国際会議場

4. Tomohiro Yamauchi, Satoshi Kuroda, Masaki Ito, Taku Sugiyama, Michiyuki Miyamoto, Hisayasu Saito, Hideo Shichinohe, Kiyohiro Houkin

演題名 ; Accelerative Expansion of Human Bone Marrow Stromal Cell using Animal Serum Free Medium supplemented with Granulocyte-Colony Stimulating Factor

学会名 ; Joint Neurolosurgical Convention 2013 (The 7th Pan-Pacific Neurosurgery Congress), February 1, 2013, Hilton Waikoloa Village, Waikoloa, Hawaii

5. 山内 朋裕, 黒田 敏, 伊東 雅基 , 杉山 拓 , 宮本 倫行, 齋藤 久泰, 七戸 秀夫, 寶金 清博

演題名 ; 血小板濃厚液と顆粒球コロニー刺激因子を用いた骨髄間質細胞の培養法

学会名 ; 第 28 回日本脊椎外科学会, 2013 年 6 月 6 日, 名古屋国際会議場

6. Tomohiro Yamauchi, Hisayasu Saito, Masaki Ito, Masahito Kawabori, Michiyuki Miyamoto, Hideo Shichinohe, Kiyohiro Houkin, and Satoshi Kuroda.

演題名 ; Platelet lysate and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) serve safe and accelerated expansion of human bone marrow stromal cells for cell therapy

学会名 ; International Stroke Conference 2014, February 13, 2014, San Diego Convention Center, San Diego, California

緒言

さまざまな幹細胞を利用した細胞移植療法は、脳梗塞に対する新たな治療法として現実のものとなりつつある。この背景には、幹細胞に関する知見が急速に増加することと平行して、脳梗塞による後遺症は日常生活に重大な支障を及ぼしており、失われた神経機能をなんとか回復させようとする気運が国内外で高まってきたためと考えられる。なかでも、間葉系幹細胞の一種である骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cells; BMSC) は、本来、中胚葉由来の細胞ではあるものの、骨・軟骨・脂肪などの中胚葉系細胞ばかりでなく、胚葉を超えて神経細胞へも分化しうるということが 1998 年に報告されてから注目を集めるようになった細胞と言える^{1,2}。

これには、他の幹細胞と比べて BMSC の利点が、自己骨髄から採取可能であり、ドナー細胞の移植にあたって倫理的・免疫学的な障壁が少ないこと。また、移植片の腫瘍形成の危険性が、現時点での ES 細胞や induced pluripotent stem cell (iPS 細胞) に比べて少ない点にある。このため、臨床応用を考慮した場合に、他の幹細胞と比べて安全性と実現可能性の高いドナー細胞であると考えられる¹⁻⁴。

これまで動物実験 (主に齧歯類の脳梗塞モデル) において、移植された BMSC は、ホスト脳内に生着し病変部に向かって遊走することや、移植後に脳内で活発に増殖すること、神経細胞やグリア細胞の表現型を獲得しうること、損傷組織の保護や修復効果をもつ数多くの液性因子を分泌することなどが明らかにされている。すなわち、移植された BMSC はさまざまなメカニズムを介して、障害された神経機能の改善を促進し得る^{3,4}。このような基礎研究の成果から、すでに国内外で小規模ながら臨床試験が開始され、実際の脳梗塞の患者に対して、自己 BMSC を移植し、その成果を報告している⁵⁻⁷。

しかしながら、本治療法を厳格な臨床試験を経て患者へ応用するためには、未だいくつかの課題が残されている。すなわち最適な移植時期・移植細胞数・移植経路や、移植による治療効果をいつどのように判定すべきかなど不明な点が多いのが現状である。(ヒト) BMSC を安全かつ効率的に培養するための手法を確立することも、脳梗塞治療への臨床応用に向けて残された重要な課題のひとつである。まず第 1 に、ドナー細胞の厳正な品質管理を行わなければならない。細胞培養の際の添加物の観点から BMSC の培養は、ほとんどの全ての基礎研究や、いくつかの臨床試験でさえも、ウシ胎仔血清 (Fetal calf serum ; FCS) を含んだ培養液で培養されている^{5,6,8-10}。FCS などの動物由来物質を使用した細胞培養は、プリオン感染や人畜共通感染症、アレルギー反応などのリスクがあるため、安全性の観点から、FCS を利用した BMSC の培養法をそのまま臨床

応用することは受け入れ難い¹¹。

こうした問題意識から、われわれはヒト血小板濃厚液（human platelet lysate ; PL）を、従来の FCS に対する代替物として注目してきた。PL を用いて培養したヒト BMSC（hBMSC）は、培養効率・細胞表面抗原・培養液上清中の栄養因子・神経系細胞分化において、FCS を用いたものと同等以上の結果を得ている¹²⁻¹⁴。また、ラット脳梗塞モデルに移植後の細胞生着や遊走・神経系細胞への分化・ホストの運動機能回復においても、FCS を用いて培養した場合と同等の結果であることを報告してきた¹⁴。

このなかで今後の解決すべき課題の 1 つとして、脳梗塞後の適切な時期（therapeutic time window）に、ドナー細胞の移植治療を行うことは重要な問題である¹⁵。ヒトの脳梗塞における BMSC 移植治療の therapeutic time window は明らかにされていないが、動物実験での運動機能改善に関する報告の多くは、虚血 24 時間～7 日後の投与である¹⁵。しかし、過去の臨床試験において自己 BMSC 移植を行った際にも、最低 4-6 週間の細胞培養の期間を要している^{5,6}。また、脳梗塞患者の多くは高齢者であるため、BMSC を含めた幹細胞は加齢による影響を受けて、自己複製能や分化能が低下する懸念がある¹⁶。このため、自己 BMSC の性質を変えずに細胞増殖（培養効率）を促進する手法が望まれる。

そこで我々は細胞増殖因子であり、血液病などに対して実際にヒトへの臨床応用が行われている、顆粒球コロニー刺激因子（granulocyte-colony stimulating factor ; G-CSF）に着目した^{16,17}。

これまでにヒト BMSC に対して G-CSF を添加した細胞培養を行い、細胞増殖を促進する試みは報告されていない。

本研究では、臨床応用が可能な安全でより効率的なヒト BMSC の培養法を確立する目的で、PL および G-CSF（PL/G-CSF）を用いた培養法が、BMSC の増殖を促進することが可能であるか検証する。次にラット脳梗塞モデルへの移植治療効果と、この新たな培養法においても BMSC の細胞特性が維持させているかを検証するために組織学的検討を行った。

そのため、第一章では PL/G-CSF を用いた、hBMSC の増殖能（培養効率）を in vitro で検討した。第二章では、PL および PL/G-CSF を用いて培養した hBMSC のラット脳梗塞モデルへの移植と、移植後の運動機能評価および組織学的検討を行った。

本研究によって、PL/G-CSF を用いた培養法が、ヒト BMSC の増殖を安全に促進して、脳梗塞発症から細胞移植治療までの期間を短縮できる有用な方法であると考えここに報告する。

略語表

AS : autologous serum
αMEM : alpha minimum essential medium
bFGF : basic fibroblast growth factor
BMSC : bone marrow stromal cell
CCAs : common carotid arteries
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium
ES cell : embryonic stem cell
IGF-1 : insulin like growth factor -1
iPS cell : induced pluripotent stem cell
FCS : fetal calf serum
G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor
GFAP : glial fibrillary acidic protein
MCA : middle cerebral artery
NeuN : neuronal nuclear antigen
PBS : phosphate buffered saline
PDGF : platelet derived growth factor
PL : platelet lysate
ROI : region of interest
SD rat : Sprague-Dawley rat
TGF-β : transforming growth factor - β
TTC : 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride

第一章 ヒト BMSC の培養効率の検討

本章では、ヒト BMSC を従来の FCS を用いた培養液と、FCS の代替物として PL を用いる培養液、さらに PL 培養液に G-CSF を添加した培養液 (PL/G-CSF) でヒト BMSC を培養して、細胞形態や細胞増殖能に差がみられるかを明らかにする。

【実験方法】

1) ヒト BMSC の培養

以下の hBMSC を用いた基礎実験については、北海道大学動物実験に関する規定に従い実施した。本実験では hBMSC を LONZA 社 (Lonza Walkersville Inc.) から購入して行った。ドナー細胞の背景を **Table 1** に示す。

Age	Gender	Race
25	M	Hispanic
22	M	Black
25	F	Black

Table 1 The human BMSC samples used in this study.

臨床応用を考慮して、培養フラスコはコラーゲンコーティングなどを施していない、プラスチック製フラスコ (75cm²) (EasyFlask 159910 ; Nunc) を使用した。後述する培養液条件において、フラスコに培養液を 10ml 加えて、1,500 cells/cm² の条件で細胞播種して、37℃、5%CO₂ の環境下で培養開始した。フラスコ底面に接着している細胞が 90% confluent に達したところで継代を行い、これを hBMSC の P1 と定義した。細胞継代は 90-80% confluent 状態のところで、0.05% Trypsin-EDTA (Gibco)、37℃、5%CO₂、5 分間の条件で培養して、フラスコ底面から浮遊させて回収した。その際に、すみやかに顕微鏡下で細胞数をカウントしたのち、再度、1,500 cells/cm² の条件で細胞播種を行い、継代培養した。P4 で回収した hBMSC-PL、hBMSC-PL/G-CSF を、第二章のラット脳梗塞モデルへの移植細胞として使用した。

2) 培養液

本実験では、3 種類の培養液を用いてヒト BMSC を培養した。FCS 培養液は、Dulbecco's modified Eagle medium/ low glucose (DMEM/LG, D6046;

Sigma-Aldrich)、1% penicillin/ streptomycin (P/S; Sigma-Aldrich)および、10% FCS (Fetal Bovine Serum Qualified; Gibco)から成る。PL 培養液は、alpha minimum essential medium (α -MEM, M0894; Sigma-Aldrich)、1%PS、2 IU/ml heparin (Mochida Pharmaceutical Co.)および、5% PL から成る。PL/G-CSF 培養液は、過去のマウスおよびラット BMSC に対する培養実験の結果から、PL に 0.1 μ M G-CSF を添加すると最も効率よく細胞増殖を促進させた結果から、同じ濃度 (0.1 μ M) の G-CSF を PL 培養液に添加したものを使用した^{16,17}。

3) ヒト BMSC の増殖能 (培養効率) の評価

細胞増殖能の評価は、P2 から P4 まで継代培養した期間とした。細胞継代する際に、顕微鏡下に計算盤で細胞数をカウントした¹⁰。細胞増殖能の指標として、doubling time (days) を使用した。

計算式 : doubling time = $(t_2 - t_1) \times \ln(n_2) / \ln(n_2/n_1)$

$t_2 - t_1$ = 細胞培養期間 (days)

n_1 : 細胞播種時の細胞数、 n_2 : 細胞継代時の細胞数

4) 統計学的解析

データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。3 群間の差の検定には one-factor ANOVA (Bonferroni's) 検定を行い、 $p < 0.05$ の場合に統計学的に有意と判定した。

【結果】

ヒト BMSC (3 名、22-25 歳) を、3 種類の培養液(FCS、PL、PL/G-CSF)で培養を行った。P2 から P4 までの継代培養期間について、hBMSC の累積細胞数および、細胞増殖能は Doubling Time を算出して比較した。

その結果、細胞形態はいずれの培養液で培養した hBMSC も紡錘状の細長い細胞形態を示していた。細胞培養にて獲得できた累積細胞数 (cumulative cell number) は P4 継代時において、hBMSC-PL は、2/3 名で hBMSC-FCS より有意に多かった。さらに hBMSC-PL/G-CSF は 3/3 名で hBMSC-FCS および、hBMSC-PL より有意に多かった。

doubling time (DT) は、P3 および P4 での培養期間と細胞数から算出した。hBMSC-PL は 2/3 名で hBMSC-FCS と同等 (有意差なし)、1/3 名で細胞増殖が促進された。さらに hBMSC-PL/G-CSF は、3/3 名のいずれの hBMSC-FCS および、2/3 名の hBMSC-PL より細胞増殖の促進を示した。以上より、doubling

time から評価した hBMSC 増殖能は、hBMSC-PL/G-CSF において有意に細胞増殖が促進され、hBMSC-PL と FCS は同等の結果であった。

【小括】

本研究において、3 種類（FCS、PL、PL/G-CSF）の培養液条件での比較をした結果、いずれの hBMSC も紡錘状の細胞形態であり、プラスチック接着性など BMSC としての性質を保持していた。PL が FCS の代替物となりうる同等の hBMSC の増殖能を示し、PL/G-CSF によって有意に増殖能が促進された。

第二章 無血清培養したヒト BMSC (-PL, -PL/G-CSF)

のラット脳梗塞モデルへの定位的直接移植と

移植治療効果および病理組織学的検討

本研究では、hBMSC-PL と hBMSC-PL/G-CSF を、ラット脳梗塞（永久中大脳動脈閉塞）モデルに定位的直接移植を行い、その治療効果を vehicle 群と比較する。また、移植細胞が宿主脳内でどのような変化をとげているか組織学的に検討を行った。

【実験方法】

1) ラット脳梗塞(永久中大脳動脈閉塞)モデルの作成

以下の全ての動物実験は、北海道大学動物実験に関する規定に従い実施した。ラット中大脳動脈永久閉塞モデル^{18,19}を改良して、皮膚や頭蓋骨欠損を軽減し、脳皮質に局限した脳梗塞病変を作成した (n=27)^{12,20}。8 週齢の SD ラット (雄) を購入 (CLEA Japan, Inc.)。頸部腹側に正中切開を行い、両側の総頸動脈 (CCAs) を露出・確保した。続いて、右眼および右耳の間に垂直に 1.5cm の皮膚切開を行い、手術用顕微鏡下に側頭筋を側頭骨から剥離翻転し、5×5mm の側頭開頭を行った。硬膜を損傷しないようにしながら骨弁を外し、右中大脳動脈 (MCA) を硬膜上から、10-0 nylon 糸で結紮し、顕微鏡下で MCA 血流が途絶したことを確認する。続いて、両側の CCA を surgical microclip を用いて 1 時間遮断した。最後に骨弁を骨窓に戻して、側頭筋と頭部の皮膚を 6-0 nylon 糸で縫合閉創する。1 時間の両側 CCA 遮断を解除した後、surgical microclip をはずして頸部の皮膚も同様に縫合閉創して手術終了とした。麻酔覚醒後に Bederson grade 3 であったものを、本実験での使用するラットとした¹⁸。

2) ヒト BMSC の線条体への定位的直接移植

第 1 章の実験で培養した、hBMSC-PL と hBMSC-PL/G-CSF を、MCA 閉塞モデル作成後 7 日目に、同側（右側）の線条体に定位的に移植を行った（各群 n=9）。前述と同様の方法で全身麻酔を行い、頭頂部正中に皮膚切開をおき、bregma から右側へ 3mm に dental drill を用いて burr hole を作成する。Hamilton シリンジを硬膜から脳内へ 6mm 挿入し、PBS で調整した細胞懸濁液 10μl (5×10⁵cells) を、automatic microinjection pump を用いて 5 分かけて注入（移植）した。移植後 5 分間の静置をしてから、髄液漏や移植細胞の漏出を

防止するために、burr hole は骨膜で覆い、皮膚は 6-0 nylon で縫合した。

3) 運動機能の評価

運動機能は半定量的評価手法として、Rota-Rod treadmill (Muromachi, Japan) を行った²¹。テストは加速度モード (4 to 40 rpm for 3 minutes) での条件下で行い、実験で使用した全てのラットは、脳梗塞作成前の 3 日間に練習期間を設けた。脳梗塞を作成してから、術翌日 (day1)、BMSC 移植日 (day7) として、その後、1 週間毎に移植後 7 週目 (day56) まで連続的に観察を行った。測定値は、ラットが回転している Rota-Rod から落下するまでの時間を 1 回の測定値をして、計 6 回の測定を行った。最大値と最小値を除いた、計 4 回の測定値の平均値を、その週の 1 匹の測定値とした。

4) 組織学的検討

移植した hBMSC を組織学的に検証するために、移植後 7 週間目の運動機能評価が終了した時点で、順次にラットを安楽死させて大腦を摘出した (それぞれ n=9)。固定した大腦を 2 mm 厚の coronal slice としてパラフィン包埋を行った。パラフィン包埋する前に、脳梗塞面積の評価を行う目的で、スキャナーによる画像取り込みを行った。4 μ m 厚の薄切り切片を作成して以後の組織学的検討に用いた。

移植された hBMSC-PL と -PL/G-CSF がラット梗塞脳内に生着した後の表現型を確認するために、抗ヒト細胞核特異的抗体とラット神経系細胞特異的マーカーを用いた蛍光二重免疫染色を実施した²²。

脳梗塞辺縁部に遊走した生着細胞の数を半定量的に計測するために、それぞれの切片の脳梗塞辺縁部の中で無作為に 5 領域ずつ関心領域 (region of interest ; ROI, 280 $\times$ 370 μ m) を設定し単位面積当たりの MAB1281 陽性細胞数を計数した。また、脳梗塞巣辺縁部に遊走して生着した BMSC の神経系細胞への分化能を調べるために、同じ ROI 中における MAB1281 陽性細胞数に対する MAB1281 かつ NeuN 二重陽性細胞数または、MAB1281 かつ GFAP 二重陽性細胞数を割合として算出した²³。

5) 統計学的解析

全ての数量データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。hBMSC-PL を移植した群と hBMSC-PL/G-CSF を移植した群、全脳梗塞病変の同側大腦半球に占める割合、生着した細胞数および MAB1281 かつ NeuN または GFAP の二重陽性細胞の割合は対応のない 2 群間の t 検定で比較し、 $p<0.05$ の場合統計学的に有意と判断した。

【実験結果】

1) ラット脳梗塞モデルの作成

前述の手法にて作成した SD ラット脳梗塞モデルに対して、脳梗塞作成 24 時間後に TTC 染色を行った。全例で Bederson grade3 であることを確認して、本実験に対して安定した脳梗塞モデルが作成できていることを確認した¹⁸⁾。

2) 移植治療後の脳梗塞面積の評価

hBMSC-PL 群、hBMSC-PL/G-CSF 群および vehicle 群に対して、移植後 7 週目 (day56) まで運動機能評価を行った後に sacrifice した、灌流固定後のラット脳検体に対して、同側半球に占める脳梗塞面積の割合を、スキャナー画像 (GT-7000U, Epson, Japan) から半定量的に評価した。結果は 3 群間の脳梗塞面積の割合に有意差は認めなかった。

3) 運動機能の回復

Rota-Rod テストによる運動機能評価は、細胞移植群 (hBMSC-PL 群および hBMSC-PL/G-CSF 群) が、vehicle 群に対して有意な改善を示した (各群 n=9)。

また、hBMSC-PL/G-CSF 群は、移植後 3 週目から、vehicle 群に対して有意な改善を認め、hBMSC-PL 群は移植後 4 週目からの改善であった。

移植 7 週後での hBMSC-PL/G-CSF 群と -PL 群の運動機能は同等であった

4) 組織学的検討

ヒト細胞核特異的モノクローナル抗体 (MAB1281) と神経系細胞マーカー (NeuN または GFAP) との蛍光二重免疫染色により、hBMSC-PL/G-CSF 群と -PL 群で脳梗塞辺縁部に遊走して生着した MAB1281 陽性細胞数に有意な差は見られなかった (それぞれ $2.6 \pm 0.8 \times 10^2 / \text{mm}^2$ 、 $2.1 \pm 0.6 \times 10^2 / \text{mm}^2$)。さらに脳梗塞辺縁部に生着した MAB1281 陽性細胞の NeuN との二重陽性率 (それぞれ $48.4 \pm 20.5\%$ 、 $45.2 \pm 23.4\%$) および、GFAP との二重陽性率 (それぞれ $26.1 \pm 16.9\%$ 、 $24.3 \pm 14.4\%$) とともに 2 群間での総計学的な有意差を認めなかった。

【小括】

本研究では、hBMSC-PL 群と hBMSC-PL/G-CSF 群を、ラット脳梗塞モデルに定位的細胞移植を行い、vehicle 群に対して有意に運動機能が改善することが示された。組織学的検討において、移植された hBMSC-PL 群および -PL/G-CSF 群ともに、hBMSC は脳梗塞辺縁部に遊走、生着して、神経系細胞マーカー (NeuN, GFAP) を発現していることを示した。G-CSF を添加した PL/G-CSF

培養による hBMSC においても、生物学的特性を損なうことなく治療効果を示すことが確認できた。

考察

本研究でのテーマは、BMSC 移植による脳梗塞再生療法の臨床応用に向けた、“安全で効率的なヒト BMSC 培養法の検討”である。そのために、ヒト BMSC を human platelet lysate (PL) と granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) を用いた培養法が、脳梗塞に対する細胞移植療法に応用することが可能であるかを検証した。以下に掲げる項目別に本研究の結果を考察する。

1) Platelet Lysate – An Alternative to Fetal Calf Serum

諸言で述べたように、これまでの多くの動物実験や臨床実験において、細胞移植に用いる BMSC を体外で増殖させるために、FCS が用いられてきた^{5,6,8-10}。しかしながら移植に用いる細胞の培養に FCS を用いることは、前述の理由により様々な懸念が残る。このような背景から培養に要する時間や材料を可能な限り削減し、good manufacturing practice (GMP) 基準に則った、動物血清を用いない hBMSC 培養法を確立しようとする研究が増えてきた^{24,25}。FCS のかわりに自家血清 (Autologous serum ; AS) を用いようという試みがあり、10% AS 含有の培養液で hBMSC が従来の方法と同等に培養可能であった報告もある。しかしながら、AS を用いることの弊害として実際にヒト移植するのに必要な hBMSC の量を考慮すると、おそらく $1.5 \times 10^2 \sim 10^3$ ml の全血の採取が必要であるとの試算があり、患者にさらなる負担を強いることになる^{26,27}。また、AS に含まれる hBMSC の培養に必要な成長因子の量が患者によるばらつきが指摘されている²⁸。他家血清を用いれば、増殖停止や細胞死が起こる²⁹。その中で血清を用いない方法として、PL が BMSC を培養するための有効な FCS の代替物として大きな注目を集めている^{24,25,30}。PL と FCS は同等の培養効率であり、細胞形態や BMSC の発現マーカーも同様であることを示されている¹²⁻¹⁴。また PL と FCS の条件下培養された hBMSC が、それぞれ脳梗塞モデルに移植され、同等に運動機能が改善することも報告されている^{12,14}。そのため、本研究においては、FCS で培養した hBMSC での移植治療効果については検討していない。しかし、本研究においても PL と FCS の培養効率は同等の結果であり、今後の細胞移植治療を行うための BMSC の培養法として、安全性の観点から PL の有用性が確認できた点に意義があると考えられた。

2) G-CSF – An Effective Promoter for hBMSC Expansion

G-CSF は分子量が約 20-kDa の糖蛋白質であり、特異的 G-CSF レセプターに作用して、顆粒球系（特に好中球および好中球前駆細胞）への分化・増殖を促進する造血因子の一種である³¹。BMSC はこの G-CSF レセプターを細胞表面

に発現している。さらにマウスやラット BMSC において、培養液に 0.1 μ M G-CSF を添加することで細胞増殖能や栄養因子の産生が促進されることが報告されている^{16,32}。また前述の PL は PDGF のみならず、TGF- β 、bFGF および IGF-1 などの細胞増殖（栄養）因子を含んでいる^{30,33}。このため、実際にヒトへの臨床応用が確立されている G-CSF を、新たに PL 培養液に加える添加因子として選択することは合理的であると考えた。また培養液に G-CSF を添加した際の FACS 解析において、細胞周期の S 期（DNA 複製）のマウス BMSC が有意に増加していることが確認された³²。また高齢ラットの BMSC を、G-CSF 添加培養液（FCS）で培養すると培養効率と、移植後の神経機能の改善が促進された¹⁶。これらの動物実験の結果から、BMSC の増殖促進に対する G-CSF の有効性が示唆されている。本研究で新たにヒト BMSC に対しても、PL 培養液に G-CSF を添加することで細胞増殖を促進することが明らかとなり、その細胞特性は維持されていた。

しかし本研究の結果にはいくつかの制約がある。第一に、PL にも AS と同様に栄養因子の量にはばらつきがあるため、細胞培養に用いる PL の適正化と評価方法の確立が必要である。第二に実際のヒト BMSC に対する、培養液に添加する G-CSF の最適量の評価がなされていないので、濃度毒性の評価を含めた検討を要する。最後に高齢者のヒト BMSC に対して、本培養法による効果についてはまだ不明である。臨床応用に向けて、細胞学的検討は今後も継続して必要であると考ええる。

総括および結論

1) ヒト BMSC は、ウシ胎仔血清を用いずにヒト血小板濃厚液を使用した培養液で培養可能である。さらに、ヒト血小板濃厚液と顆粒球コロニー刺激因子を用いた培養法は、ヒト BMSC の増殖を有意に促進させた。ヒト血小板濃厚液と顆粒球コロニー刺激因子を用いた培養法は安全かつ有効であり、脳梗塞発症からヒト BMSC 移植治療までの期間を短縮できる可能性を示している。

2) ヒト血小板濃厚液と顆粒球コロニー刺激因子を用いた培養法で培養したヒト BMSC は、培養中の細胞形態や、梗塞脳に定位的移植治療を行った場合にも、ホスト脳内での生着能・脳梗塞辺縁部への遊走能・神経細胞やグリア細胞の表現型の獲得能および、運動機能回復の治療効果など、その細胞特性を維持していることが判明した。新たな脳梗塞治療への臨床応用にむけた有用な方法であると考えられた。

これまでにヒト BMSC に対して、培養液に顆粒球コロニー刺激因子を添加して細胞培養を行い、その細胞増殖が促進すること示した報告はない。ヒト血小板濃厚液と併用することで、安全で効率的に実施可能である本培養法は、中枢神経再生（特に虚血性脳卒中）に対する、BMSC 移植治療の臨床応用にむけて意義が高いと考えられる。

本研究の結果は、虚血性脳卒中に対する細胞移植療法の臨床応用に向けて重要な知見と考えられるが、いくつかの制約がある。第一に、血小板濃厚液に含まれる栄養因子の量にはばらつきがあるため、血小板濃厚液の適正化と評価方法の確立が必要である。第二に、本研究ではヒト BMSC に対する、培養液に添加する顆粒球コロニー刺激因子の最適量の評価がなされていないので、今後の検討を要する。第三に、高齢者のヒト BMSC に対して、本培養法による効果についてはまだ不明である。本治療法を科学的に検証された治療法として実際の患者に導入するためには、本研究における制約を踏まえてさらなる研究の積み重ねが必要である。

謝辞

稿を終えるにあたり、はじめに本研究のためにヒト血小板溶解物を提供してくださいました武田紫先生、西尾充文先生（現、NTT 東日本 札幌病院）に感謝いたします。また、本研究の機会を与えてくださいました北海道大学 岩崎喜信名誉教授、北海道大学大学院医学研究科脳神経外科学分野 寶金清博教授に謝意を表します。併せて本研究全般にわたり、直接ご指導・ご鞭撻を賜りました富山大学医学薬学研究部脳神経外科 黒田敏教授に深く感謝致します。最後に、本研究にご協力いただきました実験助手の四戸由美子さん、研究の遂行や学位論文の製本にあたり様々な点でご助言をいただきました北海道大学大学院医学研究科脳神経外科教室員および秘書の皆様に厚く御礼を申し上げます。

引用文献

- 1 Azizi, S. A., Stokes, D., Augelli, B. J., DiGirolamo, C. & Prockop, D. J. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 3908-3913 (1998).
- 2 Kopen, G. C., Prockop, D. J. & Phinney, D. G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 10711-10716 (1999).
- 3 Abe, K. *et al.* Stem cell therapy for cerebral ischemia: from basic science to clinical applications. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **32**, 1317-1331, doi:10.1038/jcbfm.2011.187 (2012).
- 4 Kuroda, S. Bone marrow stromal cell transplantation for ischemic stroke -- its multi-functional feature. *Acta neurobiologiae experimentalis* **73**, 57-65 (2013).
- 5 Bang, O. Y., Lee, J. S., Lee, P. H. & Lee, G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Annals of neurology* **57**, 874-882, doi:10.1002/ana.20501 (2005).
- 6 Lee, J. S. *et al.* A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells* **28**, 1099-1106, doi:10.1002/stem.430 (2010).
- 7 Honmou, O. *et al.* Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain : a journal of neurology* **134**, 1790-1807, doi:10.1093/brain/awr063 (2011).
- 8 Mazzini, L. *et al.* Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. *Experimental neurology* **223**, 229-237, doi:10.1016/j.expneurol.2009.08.007 (2010).
- 9 Pal, R. *et al.* Ex vivo-expanded autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in human spinal cord injury/paraplegia: a pilot clinical study. *Cytotherapy* **11**, 897-911, doi:10.3109/14653240903253857 (2009).
- 10 Zhang, Z. X., Guan, L. X., Zhang, K., Zhang, Q. & Dai, L. J. A combined procedure to deliver autologous mesenchymal stromal cells to patients with traumatic brain injury. *Cytotherapy* **10**, 134-139, doi:10.1080/14653240701883061 (2008).

- 11 Selvaggi, T. A., Walker, R. E. & Fleisher, T. A. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood* **89**, 776-779 (1997).
- 12 Ito, M. *et al.* Validity of bone marrow stromal cell expansion by animal serum-free medium for cell transplantation therapy of cerebral infarct in rats—a serial MRI study. *Translational Stroke Research* **2**, 294-306 (2011).
- 13 Shichinohe, H. *et al.* Biological Features of Human Bone Marrow Stromal Cells (hBMSC) Cultured with Animal Protein-Free Medium—Safety and Efficacy of Clinical Use for Neurotransplantation. *Translational Stroke Research* **2**, 307-315, doi:10.1007/s12975-011-0088-y (2011).
- 14 Sugiyama, T. *et al.* Therapeutic impact of human bone marrow stromal cells expanded by animal serum-free medium for cerebral infarct in rats. *Neurosurgery* **68**, 1733-1742; discussion 1742, doi:10.1227/NEU.0b013e31820edd63 (2011).
- 15 Kawabori, M. *et al.* Timing and cell dose determine therapeutic effects of bone marrow stromal cell transplantation in rat model of cerebral infarct. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*, doi:10.1111/j.1440-1789.2012.01335.x (2012).
- 16 Chiba, Y. *et al.* Impact of ageing on biological features of bone marrow stromal cells (BMSC) in cell transplantation therapy for CNS disorders: functional enhancement by granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* **32**, 139-148, doi:10.1111/j.1440-1789.2011.01255.x (2012).
- 17 Hokari, M. *et al.* Bone marrow stromal cells protect and repair damaged neurons through multiple mechanisms. *Journal of neuroscience research* **86**, 1024-1035, doi:10.1002/jnr.21572 (2008).
- 18 Bederson, J. B. *et al.* Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **17**, 472-476 (1986).
- 19 Chen, S. T., Hsu, C. Y., Hogan, E. L., Maricq, H. & Balentine, J. D. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **17**, 738-743 (1986).
- 20 Sugiyama, T. *et al.* Near-infrared fluorescence labeling allows noninvasive tracking of bone marrow stromal cells transplanted into rat infarct brain. *Neurosurgery* **68**, 1036-1047; discussion 1047, doi:10.1227/NEU.0b013e318208f891 (2011).
- 21 Sayeed, I., Wali, B. & Stein, D. G. Progesterone inhibits ischemic brain injury in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion. *Restorative neurology and*

- neuroscience* **25**, 151-159 (2007).
- 22 Li, Y. *et al.* Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* **59**, 514-523 (2002).
 - 23 Sugiyama, T. *et al.* Therapeutic Impact of Human Bone Marrow Stromal Cells (hBMSC) Expanded by Animal Serum-free Medium for Cerebral Infarct in Rats. *Neurosurgery* (2011).
 - 24 Lange, C. *et al.* Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *Journal of cellular physiology* **213**, 18-26, doi:10.1002/jcp.21081 (2007).
 - 25 Schallmoser, K. *et al.* Platelet-derived growth factors for GMP-compliant propagation of mesenchymal stromal cells. *Bio-medical materials and engineering* **19**, 271-276, doi:10.3233/BME-2009-0591 (2009).
 - 26 Chachques, J. C. *et al.* Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty. *International journal of cardiology* **95 Suppl 1**, S29-33 (2004).
 - 27 Stute, N. *et al.* Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Experimental hematology* **32**, 1212-1225, doi:10.1016/j.exphem.2004.09.003 (2004).
 - 28 Meuleman, N. *et al.* Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. *European journal of haematology* **76**, 309-316, doi:10.1111/j.1600-0609.2005.00611.x (2006).
 - 29 Shahdadfar, A., Fronsdaal, K., Haug, T., Reinholt, F. P. & Brinchmann, J. E. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* **23**, 1357-1366, doi:10.1634/stemcells.2005-0094 (2005).
 - 30 Doucet, C. *et al.* Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *Journal of cellular physiology* **205**, 228-236, doi:10.1002/jcp.20391 (2005).
 - 31 Welte, K. *et al.* Purification to apparent homogeneity and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Haematology and blood transfusion* **29**, 398-401 (1985).
 - 32 Hokari, M., Kuroda, S., Chiba, Y., Maruichi, K. & Iwasaki, Y. Synergistic effects of granulocyte-colony stimulating factor on bone marrow stromal cell transplantation for mice cerebral infarct. *Cytokine* **46**, 260-266, doi:10.1016/j.cyto.2009.02.008 (2009).
 - 33 van den Dolder, J., Mooren, R., Vloon, A. P., Stoeltinga, P. J. & Jansen, J. A.

Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue engineering* **12**, 3067-3073, doi:10.1089/ten.2006.12.3067 (2006).