

## 内 容 要 旨 目 次

### 主 論 文

Cell encapsulation enhances antidepressant effect of the mesenchymal stem cells and counteracts depressive-like behavior of treatment-resistant depressed rats

(カプセル化は間葉系幹細胞の抗うつ作用を高め、難治性うつ病モデルラットに行動学的改善をもたらす)

金 恭平、安原隆雄、亀田雅博、富田陽介、馬越通有、桑原 研、金 一徹、木谷尚哉、守本 純、岡崎三保子、佐々木達也、田尻直輝、Cesario V. Borlongan、伊達 勲

Molecular Psychiatry (掲載予定)

平成 30 年 3 月 第 17 回日本再生医療学会総会に発表

## 主 論 文

### Cell encapsulation enhances antidepressant effect of the mesenchymal stem cells and counteracts depressive-like behavior of treatment-resistant depressed rats

(カプセル化は間葉系幹細胞の抗うつ作用を高め、難治性うつ病モデルラットに行動学的改善をもたらす)

#### 【緒言】

薬物療法の進歩にも関わらず、現行の治療に対して抵抗性を示すうつ病患者は多く存在する。そのため新たな治療法、とりわけ治療抵抗性の難治性うつ病患者に対する新たな治療法の開発が望まれる。

うつ病モデルラットへの間葉系幹細胞 (MSCs) 脳室内移植は、うつ病様行動の改善と海馬神経新生の増強をもたらす。しかし、難治性うつ病モデルラットへの治療効果は未だ不明である。また、カプセル化した MSCs の治療効果に関する報告は未だない。

本研究では、難治性うつ病モデルである Wistar Kyoto (WKY) ラットに対するカプセル化 MSCs の治療効果を検討した。

#### 【材料と方法】

##### MSCs の培養及びカプセル化

Wistar ラットの大腿骨から骨髄間質細胞を採取培養し、3-5 継代したものを MSCs として使用した。7mm 長の半透膜製中空糸に MSCs ( $3 \times 10^5$  cells/5 $\mu$ l) を充填し、両端を光硬化性樹脂で封鎖してカプセル化とした。移植は、全身麻酔下に右側脳室もしくは右線条体へと定位的に行った。

## 行動学試験

70匹のWKYラットを無作為に7グループへと振り分けた(コントロール群、非カプセル化MSCs側脳室移植群、カプセル化MSCs側脳室移植群(eMSCs-LV群)、空カプセル側脳室移植群、非カプセル化MSCs線条体移植群、カプセル化MSCs線条体移植群、空カプセル線条体移植群)。行動学試験として、オープンフィールド試験(OFT)を移植後13日目に、強制水泳試験(FST)を14日目(FST day1)と15日目(FST day2)に行った。OFTは新規環境下での移動距離を測定することで不安様行動を評価し、FSTは、脱出できない水槽内でのラットの無動時間を測定することでうつ病様行動を評価する。

## 蛍光免疫染色

行動学試験に用いたラットに対して、移植後13日目から12時間ごとに計5回5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU、50mg/kg)を腹腔内投与した。FST day2の後に屠殺して脳を摘出し、蛍光免疫染色に使用した。また、行動学試験の影響の有無を評価するために、行動学試験を行わないカプセル化MSCs側脳室移植群(eMSCs-LV w/o BT群)を新たに作成し、同様に蛍光免疫染色に使用した。蛍光免疫染色では、側脳室下帯(SVZ)及び海馬歯状回(DG)のBrdU陽性細胞数及びBrdU/Doublecortin(Dcx)陽性細胞数を評価した。

## Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)による神経栄養因子の評価

新しく40匹のWKYラットを5群に無作為に振り分け(コントロール群、非カプセル化MSCs側脳室移植群、eMSCs-LV群、非カプセル化MSCs線条体移植群、カプセル化MSCs線条体移植群)、海馬での神経栄養因子発現量を評価した。また、カプセル化MSCsからの神経栄養因子分泌量を、移植前と移植15日後にそれぞれ評価した。

ELISA では、vascular endothelial growth factor (VEGF), brain derived neurotrophic factor (BDNF), fibroblast growth factor-2 (FGF-2), ciliary neurotrophic factor (CNTF)を評価した。

#### Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

新たに 30 匹の WKY ラットを 5 群に振り分け(コントロール群、非カプセル化 MSCs 側脳室移植群、eMSCs-LV 群、非カプセル化 MSCs 線条体移植群、カプセル化 MSCs 線条体移植群)、海馬での VEGF、BDNF、FGF-2、CNTF の mRNA 発現を評価した。

#### Western immunoblotting

新たに 50 匹の WKY ラットを 5 群に振り分け(コントロール群、非カプセル化 MSCs 側脳室移植群、eMSCs-LV 群、非カプセル化 MSCs 線条体移植群、カプセル化 MSCs 線条体移植群)、海馬での VEGF receptor 2 (VEGFR2), phosphorylated VEGFR2 (pVEGFR2), tropomyosin receptor kinase B (TrkB), phosphorylated TrkB (pTrkB), fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1), phosphorylated FGFR 1 (pFGFR1), CNTF receptor alpha (CNTFR alpha), Signal Transducers and Activator of Transcription 3 (STAT3), and phosphorylated STAT3 (pSTAT3)の発現を評価した。

### **【結果】**

#### 脳室内へのカプセル化 MSCs 移植は行動試験に変化をもたらす

eMSCs-LV 群は、OFT での移動距離が有意に長く、FST day2 の無動時間が有意に短かった。

#### 脳室内へのカプセル化 MSCs 移植は SVZ 及び DG での BrdU 陽性細胞及び BrdU/Dex 陽性細胞の数を増加させた

eMSCs-LV 群と eMSCs-LV w/o BT 群は、SVZ 及び DG での BrdU 陽性細胞及び BrdU/Dcx 陽性細胞が有意に増加していた。また、eMSCs-LV 群と eMSCs-LV w/o BT 群の間では有意な差は見られず、行動試験は蛍光免疫染色の結果に影響を及ぼしていないことが示された。

### MSCs はカプセル内で生存し、カプセル化 MSCs は神経栄養因子を継続して分泌していた

移植 15 日後に摘出した eMSCs をヘマトキシリンエオジン染色し、内部に MSCs が存在していることを確認した。しかし、移植直前と比較するとその数は減少していた。移植前及び移植 15 日後のカプセル化 MSCs から VEGF、BDNF、FGF-2、CNTF が分泌されていた。しかし、移植 15 日後の分泌量は減少していた。

### 脳室内へのカプセル化 MSCs 移植は海馬での内因性 VEGF 及び CNTF の発現を上昇させた

eMSCs-LV 群は、VEGF と CNTF の海馬での蛋白発現量及び mRNA 発現量が有意に増加していた。

### 脳室内へのカプセル化 MSCs 移植は神経栄養因子の経路を活性化させ、その受容体の発現も上昇させた

eMSCs-LV 群では VEGFR2 と pVEGFR2 の蛋白発現量が有意に上昇していた。TrkB と FGFR1 の発現量に変化はなかったものの、pTrkB と pFGFR1 の蛋白発現量は有意に上昇していた。また、CNTFR alpha、STAT3、pSTAT3 の蛋白発現量も有意に増加していた。

## 【考察】

本研究は、カプセル化 MSCs の難治性うつ病モデルラットへの治療効果を初めて明らかにした。本研究では、うつ病モデルラットに対して抗うつ作用を示した量よりも多くの非カプセル化 MSCs を脳室内へと移植したが治療効果は見られなかった。しかし、カプセル化して MSCs を移植することで治療効果を得られた。すなわち、カプセル化は MSCs の治療効果を高め、その結果、難治性うつ病モデルラットに対して治療効果を示すことができたと考えられた。

本研究から、線条体よりも側脳室が適切な移植部位であることが示された。MSCs の治療効果は、それが分泌する神経栄養因子に依るところが大きい。側脳室に移植されたカプセル化 MSCs から分泌された神経栄養因子は、線条体へと移植された神経栄養因子よりも、容易に脳内の様々な部位へと行き届き、それにより高い治療効果をもたらした可能性がある。

カプセル化 MSCs は様々な神経栄養因子の pathway を活性化させ、受容体や下流産物の発現量を変化させた。これらの変化は、カプセル化 MSCs の治療効果のメカニズムに關与している可能性はある。

## 【結論】

カプセル化 MSCs を脳室内へと移植することで治療抵抗性うつ病モデルラットに対して抗うつ作用を示した。カプセル化 MSCs は難治性うつ病に対する新たな治療選択肢となる可能性がある。