

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：34207

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09499

研究課題名(和文) 骨髄由来細胞が分泌する神経再生因子の解析—脊髄損傷の治療に向けて—

研究課題名(英文) Neuronal regeneration factors secreted from bone marrow-derived cells for spinal cord injury treatments.

研究代表者

中野 法彦 (NAKANO, NORIHIKO)

びわこリハビリテーション専門職大学・リハビリテーション学部・教授

研究者番号：40322721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：現在、脊髄損傷に対する効果的な治療法がないため、細胞移植による治療法の開発が期待されている。我々は、体性幹細胞の骨髄間質細胞や骨髄単核球細胞に注目し、脊髄損傷モデル動物に培養上清の投与あるいは細胞移植を行ったところ、形態学および行動学的に脊髄損傷の回復が認められた。そして、その分子メカニズムを明らかにするために、骨髄間質細胞と骨髄単核球細胞の分泌する神経再生因子の解析を行ったところ、いくつかの候補因子が見つかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国において、脊髄損傷患者は約10万人に上り、医学的な問題に加えて医療費や介護費など財政的・社会的な問題も抱えている。現在、人工多能性幹(iPS)細胞や体性幹細胞などの細胞移植が注目されて盛んに研究が進められているが、脊髄再生に対する分子メカニズムの解析はあまり進んでいない。本研究により神経再生に関わる分子群の一部が明らかになり、脊髄損傷に対して有効性と安全性の高い、細胞移植を必要としない、新たな治療法の開発の礎になると考えられる。

研究成果の概要(英文)： There are no effective treatments for spinal cord injury (SCI), and then the development of a new therapy by cell transplantation is expected. We focused on bone marrow stromal cells (BMSCs) and bone marrow mononuclear cells (BMMNCs) that are somatic stem cells. When conditioned media from BMSCs or BMMNCs were administered or transplantations of these cells were performed on spinal cord injury model animals, the morphological and behavioral recoveries of SCI was observed. Then, we analyzed the neuronal regeneration factors secreted by BMSCs and BMMNCs in order to clarify the molecular mechanisms, and found several candidate factors.

研究分野：神経再生

キーワード：脊髄損傷 骨髄間質細胞

## 1. 研究開始当初の背景

我が国において、脊髄損傷患者は現在約 10 万人に上り、毎年約 5,000 人が新たに受傷している。脊髄損傷は交通事故、転落事故、スポーツ事故などにより比較的若い年代が受傷するため、医療費や介護費など財政的・社会的な問題も抱えている。生命予後は改善されてきているものの、脊髄損傷に対して有効な治療法は乏しく、症状の改善や患者の QOL の向上をもたらす治療法が長年望まれてきた。

これまで中枢神経系は一旦損傷を受けると再生しないと考えられていたが、近年、成人においても神経再生が起こることがわかってきた。現在、中枢神経を再生させる方法として、人工多能性幹 (iPS) 細胞、神経幹細胞、骨髄間質細胞、歯髄幹細胞、嗅神経鞘細胞などの移植が注目されている。その中でも骨髄間質細胞や骨髄単核球細胞の移植は自己細胞を使うために拒絶反応がなく手技的にも容易であることが臨床応用において利点である。

われわれは、脊髄挫滅損傷ラットに骨髄間質細胞を移植し、形態学および行動学的に著明に回復することを報告してきた。そして、骨髄間質細胞の髄液注入療法を臨床応用するべく、関西医科大学において 5 例の患者に自家移植の臨床試験を行い、骨髄間質細胞移植が安全かつ有効であることを確かめてきた。さらに、細胞調製がより簡便である骨髄単核球細胞を用いた移植も有効であることを報告し、現在、骨髄単核球細胞の自家移植による臨床試験が大阪・北野病院およびベトナム・ダナン病院において進行中である。

一方、骨髄間質細胞や骨髄単核球細胞の細胞生物学的あるいは分子生物学的な解析は進んでおらず、脊髄再生に関する分子メカニズムは明らかになっていない。移植された細胞は脊髄内で最初は生着するが、2~3 週間後には消失することから、移植細胞は宿主に組み込まれて効果が発揮するのではなく、細胞から分泌された液性因子によって回復がもたらされると考えられる。骨髄間質細胞が分泌する因子に関する報告はあるが、それらだけでは脊髄再生のすべてを説明することができない。そのため、骨髄間質細胞および骨髄単核球細胞が分泌する因子の脊髄再生に対する作用についての解析の必要性が高まっている。

## 2. 研究の目的

骨髄間質細胞および骨髄単核球細胞の細胞移植あるいは培養上清投与が脊髄損傷の回復に有効である機序を解明するために、骨髄間質細胞および骨髄単核球細胞が分泌する因子を解析して、損傷脊髄の再生に有効な分子群を明らかにする。そして、それらの分子特性や作用機序を解析し、脊髄再生に対して中心的な役割を果たす因子とその分子機序を解明する。これらにより、脊髄損傷への細胞移植あるいは有効因子投与による治療法を開発し、中枢神経に対する再生医療の道を切り拓くことを目的とする。

## 3. 研究の方法

4 週齢 Sprague-Dawley (SD) ラットの大腿骨および脛骨の骨髄液から骨髄間質細胞および骨髄単核球細胞を採取した。採取したラット骨髄間質細胞および市販されているヒト骨髄間質細胞を継代培養し、無血清培養上清を回収した。

脊髄損傷モデルラットを圧挫損傷により作成し、骨髄間質細胞および骨髄単核球細胞の細胞移植あるいは培養上清投与を行った。そして、4 週間に渡って行動学的評価 (BBB スコア)

および損傷脊髄の免疫組織学的解析を行った。

次に、神経細胞の突起伸長能を指標にして、骨髄間質細胞の培養上清から、液体クロマトグラフィーを組み合わせて、神経再生因子の分離精製を行い、得られた精製標品は質量分析計を用いて同定を行った。そして、得られた因子について生物学的特性を解析した。また、骨髄間質細胞と骨髄単核球細胞の分泌する神経再生因子の相違について解析するために、DNA マイクロアレイ法を用いて有効因子の発現量を解析し脊髄再生に対して中心的な役割を果たす因子の検討を行った。

#### 4．研究成果

脊髄損傷モデル動物に骨髄間質細胞あるいは骨髄単核球細胞の移植を行ったところ、形態学および行動学的に脊髄損傷の回復が認められた。そして、移植した細胞自身が神経系細胞に分化したのではなく、移植した細胞が分泌する液性因子が効果を発揮したことを確かめるために、骨髄間質細胞の培養上清を側脳室経路で2週間持続投与した。その結果、培養上清投与群では投与開始1週間後から行動学的評価において顕著な回復が見られ、損傷部の免疫組織化学的解析により再生軸索が多数伸長していた。このことより、骨髄間質細胞は液性因子を分泌して脊髄損傷の再生を促進していると考えられた。

そこで、神経再生に関わる因子およびその分子的機序を明らかにするために、骨髄間質細胞および骨髄単核球細胞が分泌する因子の解析を行った。まず、骨髄間質細胞が分泌する液性因子の神経細胞に対する効果を見るために、ラットおよびヒト由来骨髄間質細胞の無血清培養上清を新生仔ラット海馬由来神経細胞に添加したところ、神経細胞の生存維持能および突起伸長能の亢進がみられた。次に、骨髄間質細胞の培養上清をヘパリンアフィニティー、イオン交換、ゲルろ過、逆相などの液体クロマトグラフィーを組み合わせて、神経突起伸長能を指標に神経再生因子の分離精製を行った。一連のカラムワークによって得られた精製標品は質量分析計を用いて同定を行った。その結果、インスリン様増殖因子-1 (IGF-1)、トランスフォーミング増殖因子-1 (TGF- $\beta$ 1) や肝細胞増殖因子 (HGF) などが、骨髄間質細胞から分泌され、神経再生にはたらいっていることが明らかになった。しかし、それらの因子だけでは脊髄再生の全てを説明できないため、さらなる分離精製を進めている。これらの解析を通して、骨髄間質細胞は複数の神経再生因子を分泌し、それらの因子が協調して損傷した脊髄の再生に関わっていると考えられる。さらに、骨髄間質細胞と骨髄単核球細胞の分泌する神経再生因子の相違についてDNAマイクロアレイ法にて解析を行った。その結果、多くの因子で発現が異なり、データを詳細に分析し、いくつかの候補因子が見つかった。

これらの解析により、骨髄間質細胞および骨髄単核球細胞は細胞移植を行わなくてもその分泌因子を投与することで脊髄損傷の神経再生および行動回復を促進することが示唆された。そして、これらの細胞が分泌する神経再生因子をいくつか同定し、さらに候補因子も見ついている。したがって、本研究により神経再生の分子メカニズムの一部が明らかになり、これは脊髄損傷に対して有効性と安全性の高い新たな治療法の開発の礎になると考えている。

本研究で得られた神経再生に関する研究成果は、論文発表・学会発表に向けての準備を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakano Norihiko, Kanekiyo Kenji, Yamada Yoshihiro, Tamachi Masahiro, Suzuki Yoshihisa, Fukushima Masatoshi, Saito Fukuki, Abe Seiya, Tsukagoshi Chihiro, Miyamoto Chimi, Ide Chizuka	4. 巻 1707
2. 論文標題 Structures of filum terminale and characteristics of ependymal cells of its central canal in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 208～215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2018.11.038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanekiyo Kenji, Wakabayashi Tamami, Nakano Norihiko, Yamada Yoshihiro, Tamachi Masahiro, Suzuki Yoshihisa, Fukushima Masatoshi, Saito Fukuki, Abe Seiya, Tsukagoshi Chihiro, Miyamoto Chimi, Ide Chizuka	4. 巻 35
2. 論文標題 Effects of Intrathecal Injection of the Conditioned Medium from Bone Marrow Stromal Cells on Spinal Cord Injury in Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 521～532
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/neu.2017.5201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中野法彦, 兼清健志, 國井沙織, 森本康一, 尾前薫, 井出千束
2. 発表標題 細胞低接着性コラーゲンを足場とした神経細胞の培養
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野法彦, 兼清健志, 國井沙織, 森本康一, 尾前薫, 井出千束
2. 発表標題 細胞低接着性コラーゲンを足場とした神経細胞の突起伸長の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 兼清健志, 中野法彦, 塚越千尋, 宮本陳敏, 安部征哉, 井出千束
2. 発表標題 脊髄損傷治療へ向けた終系の中心管上衣細胞の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kunii S, Nakano N, Kanekiyo K, Omae K, Ide C, Morimoto K.
2. 発表標題 Low adhesive scaffold collagen prepared from Type I collagen promotes neuronal survival and neurite outgrowth.
3. 学会等名 ASCB   EMB0 2019 meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野法彦, 兼清健志, 國井沙織, 尾前薫, 森本康一, 井出千束
2. 発表標題 細胞低接着性コラーゲンを足場とした脊髄損傷に対する神経再生の解析
3. 学会等名 第19回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野法彦, 兼清健志, 國井沙織, 森本康一, 尾前薫, 井出千束
2. 発表標題 細胞低接着性コラーゲンを足場とした神経細胞の挙動解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 兼清健志, 中野法彦, 安部征哉, 塚越千尋, 宮本陳敏, 井出千束
2. 発表標題 脊髄損傷ラットに対する骨髄間質細胞培養上清の投与効果
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 兼清健志, 中野法彦, 安部征哉, 塚越千尋, 宮本陳敏, 井出千束
2. 発表標題 Effects of conditioned medium from bone marrow stromal cells on rat spinal cord injury.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野法彦, 兼清健志, 國井沙織, 森本康一, 尾前薫, 井出千束
2. 発表標題 細胞低接着性コラーゲンを足場とした神経系細胞
3. 学会等名 第59回組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國井沙織, 兼清健志, 中野法彦, 加藤暢宏, 尾前薫, 井出千束, 森本康一
2. 発表標題 細胞低接着性コラーゲンによる神経細胞の活性化と組織再生機能の検証
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野法彦, 兼清健志, 國井沙織, 森本康一, 尾前薫, 井出千束
2. 発表標題 細胞低接着性コラーゲンを足場とした神経細胞の突起伸長
3. 学会等名 第16回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井出 千束  (Chizuka Ide)  (70010080)	びわこリハビリテーション専門職大学・リハビリテーション学部・教授   (34207)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	鈴木 義久  (Suzuki Yoshihisa)  (30243025)	公益財団法人田附興風会・医学研究所・研究員   (74314)	
連携研究者	兼清 健志  (Kanekiyo Kenji)  (20525399)	びわこリハビリテーション専門職大学・リハビリテーション学部・准教授   (34207)	
連携研究者	和田 幸恵  (Wada Yukie)  (70457969)	関西医科大学・医学部・講師   (34417)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------