

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591892

研究課題名（和文） iPS 細胞由来アストロサイトの選択的分化誘導と脊髄損傷急性期治療への応用

研究課題名（英文） Selective induction and transplantation of iPS cell-derived astrocytes into acute spinal cord injury

研究代表者 村田 淳

(ATSUSHI MURATA)

千葉大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20344997

研究成果の概要（和文）：マウス iPS 細胞より Neural Stem Sphere 法を用いて分化誘導した Astrocyte をラット脊髄損傷後 3 日と 7 日後に移植し、その効果を検討した。

脊髄損傷後 3 日、7 日目移植とも下肢運動機能に有意差はなく、Astrocyte 単独移植では効果が不十分であった。移植細胞は移植後 8 週の時点で生存していたが、GFAP の染色性が陰性となっていた。組織学的検討では、全ての項目で両群間に有意差はなかった。Astrocyte のアロディニアへの関与が示唆される一方、移植時期により違いがみられた。

研究成果の概要（英文）：We transplanted iPS cell-derived astrocytes into rat spinal cords three and seven days after spinal cord contusion injury. BBB locomotor recovery did not show statistically significant change in both transplantations. Although transplanted cells were survived eight weeks after transplantation, they did not show immunoreactivity for GFAP. There was no statistical significant histological finding. Although transplanted astrocytes has relation to induce allodynia, it depends on the timing of transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：iPS 細胞、脊髄損傷、Neural Stem Sphere 法(NSS 法)、アストロサイト、アロディニア、BBB スコア

1. 研究開始当初の背景

【背景】(1)2006 年に京都大学の山中らが報告した iPS 細胞は体細胞から作成することが可能であることと、受精卵の破壊など倫理的問題が絡まないことから、自家移植の際の有力な選択肢となり得る可能性がある。2007 年ヒト iPS 細胞の作成に成功した。

(2)Neural Stem Sphere (NSS) 法は ES 細胞コロニーから周囲に神経幹細胞を分化、遊走させる方法である (2003 年中山ら)。ES 細胞をアストロサイト抽出液中で浮遊培養させることにより神経細胞を分化誘導することも成功している。

(3)脊髄損傷において Astrocyte はグリア癬

痕を形成し軸索再生を阻害するといわれてきた。近年 Astrocyte が炎症の波及を防いでいる、再生軸索のガイダンスとなっている、といった脊髄損傷に対し保護的な役割に関する報告も増えてきている。

今回の研究では理化学研究所からマウス iPS 細胞を譲り受け、アストロ細胞抽出液を用いて浮遊培養を行い、神経系細胞に分化できるかどうか検討したいと考えた。

また、もしアストロサイトに分化可能であれば脊髄損傷ラットに細胞移植し運動機能が回復するかどうか検討したいと考えた。

2. 研究の目的

本実験の目的は、(1)マウス iPS 細胞より NSS 法を用いて神経幹細胞を分化させ、さらに Astrocyte を分化誘導すること (2)誘導し

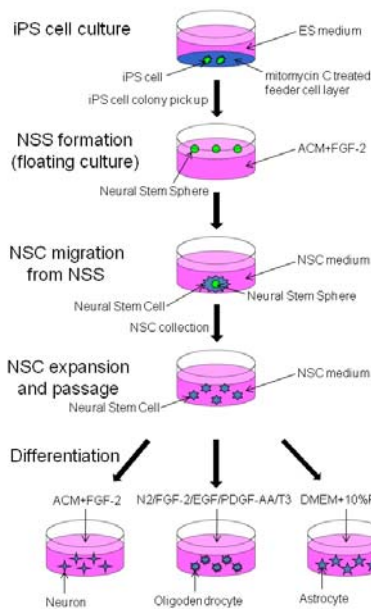


Figure 1

た Astrocyte をラット脊髄損傷モデルに移植し、その効果を検討することである。

Fig.1 NSS 法: アストロサイト上清の中で NSS を浮遊培養させると神経系細胞に分化

3. 研究の方法

(分化誘導実験) マウス iPS 細胞を Feeder 細胞上で培養、直径 300–500 μm のコロニーを pick up し、Astrocyte Conditioned Medium (ACM)+bFGF 存在下に 4 日間浮遊培養し NSS を作成した。NSS を接着培養へ移し周囲に遊走してくる神経幹細胞を回収し、継代・増殖させた。P3–P5 の神経幹細胞を DMEM+10%FBS 培地にて Astrocyte へ分化させた。RT-PCR にて分化過程における遺伝子発現の推移をみた。

(移植実験) 8 週齢の雌性 SD ラット (N=30) の第 9–10 胸椎レベルに、IH Impactor を用いて脊髄損傷を作成した。脊髄損傷 3 日後に、10 万個/ $5\mu\text{l}$ の iPS 細胞由来 Astrocyte を Hamilton syringe を用いて髄注したものを Astrocyte 移植群 (N=20)、DMEM を髄注したものを DMEM 群 (N=10) とした。免疫抑制剤として両群にサイクロスポリンを移植後 2 週間は注射、その後は飲料水に混入した。Astrocyte を移植する寸前に PKH26Red 処理を行い移植細胞のマーカールとした。

下肢運動機能評価として、毎週 BBB score を、損傷 8 週時に Inclined plane test、運動量解析を SCANET- MV40 にて行った。脊髄損傷に伴うアロディニアの評価として、損傷 8 週時に Thermal hyperalgesia test と、Mechanical allodynia test を行った。この際、脊髄損傷を起こしていないラット (N=5: ノーマル群) も加えて検討した。組織学的検討として残存髄鞘量 (Luxol fast blue 染色)、Astrocyte 量 (GFAP 陽性面積)、疼痛ペプチド量 (CGRP 陽性面積) を計測した。

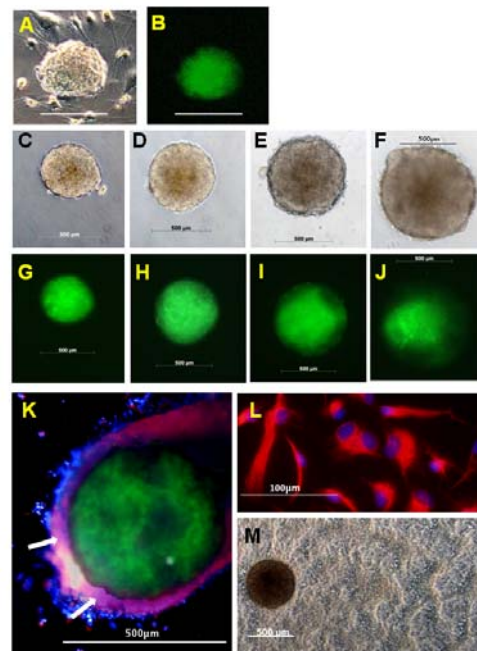


Figure 2

Fig. 2 A, B, iPS 細胞。C–J, 浮遊培養。K, Neural stem Sphere。L, NSS 周囲の GFAP 陽性細胞。M, NSS の光学顕微鏡写真。

4. 研究成果

(分化誘導実験) NSS 周囲に遊走した神経幹細胞は、Nestin 陽性であり、未分化性を保ったまま継代・凍結保存が可能であった。神経幹細胞は 10%FBS 存在下において GFAP 陽性の Astrocyte に選択的に分化した。ACM+bFGF

存在下においては Tuj-1 陽性の Neuron へ、T3 存在下には O4、GalC 陽性の Oligodendrocyte に分化可能であった。RT-PCR では GFAP 遺伝子は Astrocyte へ分化していくにつれ発現が強くなった。

(移植実験) BBB score は、終始両群間に有意差はなく、その他の運動機能評価にても両群間に有意差はなかった。Thermal hyperalgesia test では、Astrocyte 移植群はノーマル群に比し有意に熱刺激に過敏であった。Mechanical allodynia test では、Astrocyte 移植群は、ノーマル群、DMEM 群に比して有意に痛み刺激に敏感であった。移植細胞は移植後 8 週の時点で生存していたが、GFAP の染色性が陰性となっていた。組織学的検討では、全ての項目で両群間に有意差なかった。

NSS 法は手順が簡便であり、今回 iPS 細胞から Neuron、Oligodendrocyte、Astrocyte の分化誘導に成功した。また神経幹細胞の継代・凍結保存が可能であった。今後 iPS 細胞からの神経系細胞分化法として臨床応用が期待される。

移植実験においては下肢運動機能の改善はなく、Astrocyte 単独移植では効果が不十分であることが考えられた。アロディニアの発生機序は、現在のところ不明な点が多いが、MAP kinase を介した Astrocyte を含むグリア細胞の活性化の関与が考えられており、脊髄損傷への細胞移植治療においてアロディニ

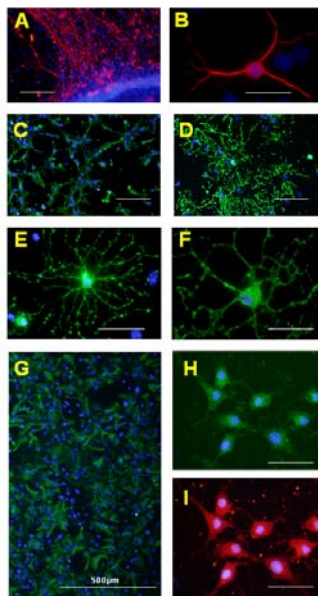


Figure 3

アの発生は大きな問題である。
Fig. 3 神経系細胞への分化誘導 A, B,

Neuron への分化。C, D, Oligodendrocyte への分化。E, F, G-I, Astrocyte への分化

Fig. 4 iPS 細胞、神経幹細胞、誘導されたアストロサイトでの RT-PCR

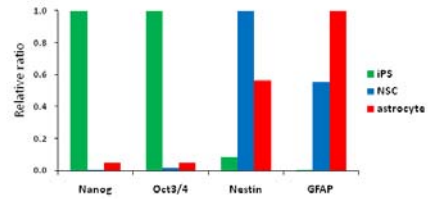


Fig. 5 iPS 由来アストロサイト移植後の BBB スコア A, 3 日後移植においても B, 7 日目移植においてもコントロールと有意な差が得られなかった。7 日目移植ではむしろ改善

Figure 4

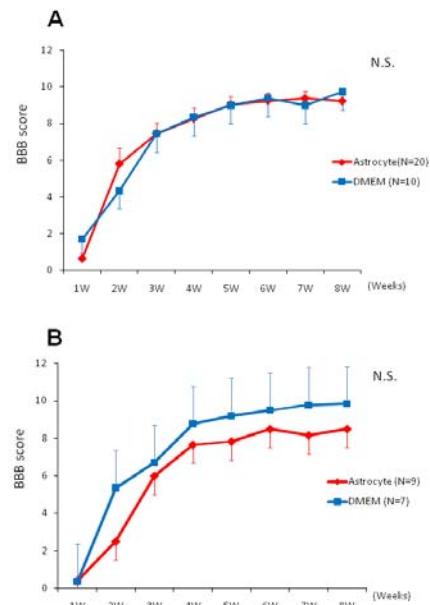


Figure 5

が停滞した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Hayashi K, Hashimoto M, Koda M, Naito AT, Murata A, Okawa A, Takahashi K, Yamazaki M. Increase of sensitivity to mechanical stimulus after transplantation of murine induced pluripotent stem cell-derived astrocytes in a rat spinal cord injury model.
J Neurosurg Spine. 2011 Dec;15(6):582-93.

[学会発表] (計3件)

- ①林浩一、山崎正志、大河昭彦、村田淳、ラット脊髄損傷に対するマウス人工多能性幹(iPS)細胞由来 Astrocyte 移植効果 日本整形外科基礎学術集会 2010/10/15 京都
- ②林浩一、山崎正志、大河昭彦、村田淳、ラット脊髄損傷に対するマウス人工多能性幹(iPS)細胞由来 Astrocyte 移植効果 日本再生医療学会 2010/3/19 広島
- ③林浩一、山崎正志、大河昭彦、村田淳、ラット脊髄損傷に対するマウス人工多能性幹(iPS)細胞由来 Astrocyte 移植効果 日本整形外科基礎学術集会 2009/11/5 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 淳 (ATSUSHI MURATA)

千葉大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：20344997

(2) 研究分担者

大河 昭彦 (AKIHIKO OKAWA)

千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30312945

山崎 正志 (MASASHI YAMAZAKI)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：50281712

