

機関番号：24601  
 研究種目：若手研究 B  
 研究期間：平成 21 年～22 年度  
 課題番号：21791375  
 研究課題名（和文）脊髄損傷に対する ES 細胞移植治療－脊髄間質細胞共移植の検討－  
 研究課題名（英文）Co-transplantation of ES Cells and Bone Marrow Stromal Cells for Spinal Cord Injury  
 研究代表者  
 松田 良介 (RYOSUKE MATSUDA)  
 奈良県立医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：60453164

## 研究成果の概要（和文）：

マウス脊髄損傷モデルにおいて、ES 細胞由来神経幹細胞と骨髄間質細胞の共移植を行い、運動機能評価の検討と免疫組織学的検討を行った。免疫組織学的検討により、ES 由来神経幹細胞は Nestin や MAP2 陽性細胞への分化を認めた。しかし、ES 細胞由来神経幹細胞と骨髄間質細胞の共移植では、他の群と比較して明らかな運動機能の改善は認めなかった。予想された運動機能改善効果がみられなかった原因は特定できていないが、今後細胞の移植方法や、移植細胞数などのさらなる検討が必要と思われた。

## 研究成果の概要（英文）：

We performed co-transplantation of neural stem cells derived from ES cells and bone marrow stromal cells for spinal cord injury in mice. We checked motor function after spinal cord injury weekly and histopathological examination using neuronal markers. Histopathological examination revealed that neural stem cells derived Es cells differentiated into Nestin positive cells and MAP2 positive cells. There is no significance for motor functional improvement between co-transplantation group and other control groups. The reason for ineffectiveness of this study is unclear. Further study will be required.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究代表者の専門分野：脳神経外科

科研費の分科・細目：若手 B

キーワード：脊髄損傷、骨髄間質細胞、ES 細胞、共培養、共移植

## 1. 研究開始当初の背景

現在、脊髄損傷に対する有効な治療手段は少なく、一旦損傷された神経機能の回復は困難である。そのため、古くから脊髄損傷モデルが構築され、さまざまな治療方法が検討されている。その神経機能を回復させる試みとし

て、脊髄損傷に対する細胞移植治療は、ES 細胞のみならず、骨髄間質細胞や、嗅神経細胞など多くの細胞で検討が行われている。これまでにわれわれは、マウスの圧挫傷による脊髄損傷モデルを作成し、その後 ES 細胞由来の神経幹細胞移植を行い、脊髄損傷後マウス

の運動機能予後を改善することを報告してきた。(Neuro Res, 2005)。

移植された ES 細胞は、脊髄損傷をうけた部位で Nestin、oligo2、MAP2 などの神経マーカーを発現し、特に下肢運動機能の改善に寄与していることが示されている。しかし、その運動機能改善は認められるものの、その回復は必要十分といえるものではなく、さらなる運動機能改善の上乗せが望まれる。

一方、骨髄間質細胞は、NGF(nerve growth factor), GDNF(glia derived neurotrophic factor), BDNF(brain derived neurotrophic factor)などの神経栄養因子を分泌することにより、その神経保護作用を発揮する。骨髄間質細胞は自己組織から移植細胞をうることが可能であるため、近年有望な移植細胞源としても注目されている。骨髄間質細胞は、脊髄損傷モデルに細胞移植治療を行うことにより、脊髄損傷後の下肢運動機能改善も報告されている。

今回われわれはそれぞれ単独で治療効果を有する ES 細胞と骨髄間質細胞を同時に移植することにより、マウス脊髄損傷モデルにおける下肢運動機能について、検討することとした。

## 2. 研究の目的

マウス脊髄損傷モデルにおける、ES 細胞由来神経幹細胞移植療法や、骨髄間質細胞の移植治療はそれぞれ、その運動機能改善効果が報告されている。ES 細胞由来神経幹細胞は、移植後の脊髄内で、Nestin、Oligo2、MAP2 などの神経系マーカーを発現し、移植された細胞は組織内で定着している。

一方、骨髄間質細胞は、NGF、GDNF、BDNF などの神経栄養因子を分泌することにより、脊髄損傷後の空洞形成を抑制し、運動機能回復を促進していることが報告されている。ES 細胞と骨髄間質細胞はそれぞれ脊髄損傷内での機能回復に対する作用機序が異なるため、両者を同時移植することにより脊髄損傷後の運動機能のさらなる改善をえることができるかどうか検討を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 移植細胞として、GFP で標識したマウス ES 細胞(mouse ES cell line G4-2 (129/SvJ mouse))を段階的分化誘導法で分化誘導し、神経幹細胞群を調整した (ES 移植細胞)。またマウス的大腿骨から骨髄間質細胞 (BMSC) を採取し、継代培養した。マウスは、C57BL/6 を用いた。骨髄間質細胞は、移植前に BrdU で標識した。

(2) マウスの脊髄損傷モデルの作成には、C57BL/6 マウスを用いて行った。ペントバルビタールの腹腔内投与後、第 9-10 胸椎の椎弓切除を行った。その後、INP-150 pneumatic impactor を用いて、脊髄に圧挫傷を加えた。

マウス脊髄圧挫傷モデルを 4 群にわけ、phosphate-buffered saline (PBS) を移植する PBS-Group、ES 由来神経幹細胞群を移植する NSC-Group、骨髄間質細胞群を移植する BMSC-Group、ES 由来神経幹細胞および骨髄間質細胞を同時移植する NSC/BMSC-Group とした。移植後の運動機能評価としてはマウス脊髄損傷後の Seki らのスコアリングを用いて、4 種の motor scoring, platform hanging, mesh walking, rope walking で検討した。移植前から移植後 1 週間ごとに評価した。

移植部位での免疫組織染色は、ES 細胞由来の細胞は GFP で標識し、骨髄間質細胞の由来の細胞は BrdU で標識した。ES 細胞は移植部位での、Nestin、MAP2、GFAP の発現を検討した。また、骨髄間質細胞に関しては、損傷部位での、NGF の発現を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 運動機能評価では、脊髄損傷前と、脊髄損傷後に、各種細胞移植を行い、毎週 1 回の運動機能評価を行った。各群とも、脊髄損傷後から経時的に運動機能の改善を認めたが、しかし NSC-Group、BMSC-Group、NSC/BMSC Group の 3 群間では運動機能に有意差を認めなかった。

(2) 継代培養した C57BL/6 マウスの BMSC は mRNA の PT-PCR にて、NGF, GDNF, BDNF などの神経栄養因子を分泌していた。組織学的検討では、HE 染色にて、NSC-Group、BMSC-Group、NSC/BMSC-Group ではそれぞれ脊髄損傷後の移植部位に腫瘍形成はみられなかった。

免疫組織染色にて NSC-Group、NSC/BMSC-Group において ES 細胞由来神経幹細胞は脊髄損傷部において Nestin, MAP2 を発現していた。また NSC/BMSC-Group において、BrdU 標識した骨髄間質細胞は移植部位に生着し移植 6 週後も nerve growth factor を産生していた。

(3) 今回の実験結果からは、期待された共移植群である NSC/BMSC-Group での運動機能改善効果はえられなかった。現時点では、ES 細胞由来神経幹細胞、骨髄間質細胞を共移植効果がえられなかった原因は不明である。その原因としては、投与方法の問題やそれぞれの移植細胞数の問題である可能性が考えられる。そのほかにも ES 細胞由来神経幹細胞と骨髄間質細胞との直接的作用が関与している可能性など、さまざまな原因が考えられ、さらなる検討が必要であると思われる。

脊髄損傷に対しては、いまだ満足できる運動機能改善がえられていないのが現状である。さらなる運動機能改善が期待できる移植治療法の開発が求められる。そのためには、脊髄損傷という特殊な環境で、損傷後の炎症を鎮静化促進や、移植細胞がいかに安定して生着し機能的な役割を果たすかなど、さまざまな観点からの検討が求められる。

## 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 4 件)

1)

Matsuda R, Yoshikawa M, Kimura H, O uji Y, Nakase H, Nishimura F, Nonaka J, Toriumi H, Yamada S, Nishiofuku M, Moriya K,

Ishizaka S, Nakamura M, Sakaki T  
Cotransplantation of mouse embryonic Stem cells and bone marrow stromal cells followingspinal cord injury suppresses Cell transplantation, 2009, 18:39-54  
査読有

2)

Toriumi H, Yoshikawa M, Matsuda R, Nishimura F, Yamada S, Hirabayashi H, Nakase H, Nonaka J, O uji Y, Ishizaka S, Sakaki T.

Treatment of Parkinson's disease model mice with allogeneic embryonic stem cells: necessity of immunosuppressive treatment for sustained improvement. Neurological Research, 2009, 31:220-227,  
査読有

3)

O uji Y, Yoshikawa M, Moriya K, Nishiofuku M, O uji-Sageshima N, Matsuda R, Nishimura F, Ishizaka S

Isolation and characterization of murine hepatocytes following collagenase infusion into left ventricle of heart. J Biosci Bioeng, 2010, 110:487-490  
査読有

4)

Nishiofuku M, Yoshikawa M, O uji Y, Saito K, Moriya K, Ishizaka S, Nishimura F, Matsuda R, Yamada S, Fukui H  
Modulated differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells by coculture with hepatic stellate cells. J Biosci Bioeng, 2011, 111:71-77  
査読有

[学会発表] (計 3 件)

1)

山田 修一 松田 良介 西村 文彦 朴 永

銖 中村 光利 中瀬 裕之 王寺 幸輝 吉川 正英 石坂 重明

Stress Induced Prematured Senescence in Glioblastoma Cell Line and Relationship with Carnitine

日本脳腫瘍学会 2010.11.28

軽井沢

2)

山田 修一 松田 良介 西村 文彦 朴 永銖 中村 光利 中瀬 裕之 王寺 幸輝 吉川 正英 石坂 重明

Stress Induced Prematured Senescence in Glioblastoma Cell Line and Relationship with Carnitine

日本分子脳神経外科学会 2010.8.28

仙台

3)

松田 良介 山田 修一 中瀬 裕之 王寺 幸輝 吉川 正英 石坂 重明

脊髄損傷に対するES細胞移植治療の問題点

日本分子脳神経外科学会 2009.9.20

岡山

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 良介 (RYOSUKE MATSUDA)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 60453164

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: