

機関番号：15401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791399

研究課題名 (和文) 神経・血管ニッチ構築による脊髄再生

研究課題名 (英文) Spinal cord regeneration promoted by the construction of neurovascular niche

研究代表者

亀井 直輔 (KAMEI NAOSUKE)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：70444685

研究成果の概要 (和文)：血管内皮前駆細胞移植は、脊髄損傷急性期に反応性アストロサイトの産生と脊髄の機能改善を促進し、さらにNotchの下流シグナルであるHes5の発現を増加させた。これらの反応はJagged1をノックアウトした血管内皮前駆細胞の移植では認められなかった。さらにJagged1+/+血管内皮前駆細胞はJagged1-/-血管内皮前駆細胞に比べ、血管新生の促進だけでなく、異常血管の安定化にも寄与していた。このように、血管内皮前駆細胞はNotchシグナルを介したグリア産生の促進や血管新生の調節によって損傷脊髄の修復を促進することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：The transplantation of Jagged1+/+ endothelial progenitor cells but not Jagged1-/- endothelial progenitor cells increased the number of reactive astrocytes during acute phase and improved functional recovery following spinal cord injury. Expression of the Notch effector Hes5 was upregulated in the injured spinal cord after Jagged1+/+ endothelial progenitor cell transplantation. In addition, Jagged1+/+ endothelial progenitor cells exhibited not only great pro-angiogenic effect but also morphologically abnormal vessel stabilization compared with Jagged1-/- endothelial progenitor cells in injured spinal cord. Thus, endothelial progenitor cells promoted the repair of injured spinal cord through the induction of Notch-dependent gliogenesis and vascular regulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：移植・再生医療・再生医学・神経科学

1. 研究開始当初の背景

(1) Neurovascular niche

中枢神経の神経幹細胞の維持・増殖にはNotchシグナルを介した血管内皮とのニッチが重要な役割を担っているなど、神経と血管

との間には、胎生期から成体に至るまで、密接な関係があると考えられる。そこで、中枢神経再生のためには神経・血管ニッチを構築することが重要な鍵になるのではないかと考えた。

(2) 血管内皮前駆細胞 (EPC)

骨髄や末梢血には血管内皮前駆細胞 (Endothelial Progenitor Cell: EPC) が存在し、虚血部位に集積して血管新生を促進したり、自ら血管内皮細胞に分化して血管を構築したりする。これまでも様々な虚血性疾患に対する EPC 移植治療の研究が行われており、中枢神経では脳梗塞モデルに対する EPC を含む細胞群の移植により、血管新生と神経再生が促進されたとの報告もある。そこで、EPC は神経・血管ニッチ構築のための有望な細胞ソースになり得ると考えた。

(3) 損傷脊髄の再生

損傷脊髄の再生に関する研究は世界中で盛んに行われており、現在のところ細胞移植による失われた神経細胞の補充や移植細胞由来の増殖因子による神経保護作用、抗体療法などによる軸索伸長阻害因子の抑制などが大きな柱となっている。一方、血管新生の促進による治療研究の報告も散見されるものの、その作用機序は損傷後の虚血改善と考えられており、神経・血管ニッチ構築を介したメカニズムは明らかにされていない。我々のグループではこれまでにヒト血液由来 CD133 陽性細胞移植で血管新生と脊髄機能修復が促進されることを確認している。これらの結果は CD133 陽性細胞が EPC を多く含む細胞群であることに関連していると考えられ、EPC による神経・血管ニッチの構築が脊髄再生に関与しているのではないかと推測し、本研究を着想するに至った。

(4) 反応性アストロサイト

脊髄では中心管の上皮細胞周囲に神経幹細胞が存在し、損傷時には反応性アストロサイトとして増殖する。この反応性アストロサイトは長い間脊髄再生を阻害すると考えられてきたが、最近になり損傷脊髄の修復に寄与する重要な役割を持つことがわかってきた。本研究では、EPC とともに反応性アストロサイトが神経・血管ニッチ構築の重要な鍵になると想定している。

(5) Jagged1 conditional knockout mouse

Notch シグナルの欠如は胎生時に致死性であるため、これまで成体でのノックアウトマウスを使った解析は不可能であった。本研究では Cre-loxP システムによる Jagged1 (Notch ligand) の conditional knockout mouse を用いて、成体マウスにおける Jagged1/Notch シグナルを介した神経・血管ニッチ構築の解析を可能にする。

2. 研究の目的

本研究では血管内皮前駆細胞 (EPC) を用いた神経・血管ニッチ構築による脊髄再生治療の確立と Jagged1 conditional knockout mouse による Notch シグナルを介した脊髄再生メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脊髄由来神経幹細胞と血管内皮前駆細胞の樹立

神経幹細胞 (NSC) : 成体マウスより脊髄を採取し、Dissociation Solution で incubate して細胞を分離し、比重遠心法でミエリン片を除去した後に bFGF・EGF 添加培地で培養して形成された細胞塊 (Neurosphere) を NSC として使用する。

血管内皮前駆細胞 (EPC) : 成体マウスの全身骨より骨髄を採取し、比重遠心法で単核球のみを単離した後、専用培地で 1 週間培養して EPC を樹立する。

(2) 脊髄由来神経幹細胞と血管内皮前駆細胞の共存培養

insert culture system を用いて NSC と EPC を共存培養する。

EPC(-) 群 : NSC の培養のみ

Jag1^{+/+} EPC 群 : wild type mouse 由来 EPC との共存培養

Jag1^{-/-} EPC 群 : Jagged1 conditional knockout mouse 由来の EPC と共存培養

神経幹細胞維持培地と分化培地の両方で共存培養し、免疫細胞化学染色で NSC の増殖・分化について評価する。

(3) マウス脊髄損傷モデル : 成体マウスの第 7 椎弓切除を行い、胸髄圧挫損傷モデルを作製する。

細胞移植 : 脊髄損傷作製直後に 1×10^6 個の EPC を尾静脈より移植

PBS 群 : PBS のみを注入

Jag1^{+/+} EPC 群 : wild type mouse 由来 EPC 1×10^6 個を移植

Jag1^{-/-} EPC 群 : Jagged1 conditional knockout mouse 由来 EPC 1×10^6 個を移植

(4) マウス脊髄損傷モデルの脊髄機能評価

運動機能評価 : ビデオ撮影を併用して術者以外の第 3 者により BBB locomotor rating scale を用いて後肢の運動機能を経時的に評価する。

電気生理学的評価 : 術前および術後 6 週に Viking Quest (Nicolet) を用いて麻酔下に頭蓋電気刺激を行って後肢より複合筋誘発電位を計測し、波形の振幅を評価する。

(5) マウス脊髄損傷モデルの組織学的評価

細胞移植後 3, 14, 42 日に脊髄を採取し、組織学的評価を行う。

評価方法

免疫組織学的評価 : 血管新生 (CD31)

反応性アストロサイト (GFAP, Nestin)

Notch シグナル (Cleaved Notch1)

軸索伸長 (Tyrosine Hydroxylase, Serotonin)

移植細胞の集積・分化 (DiI で標識した EPC を移植, CD31)

mRNA 発現評価 : 損傷後 3 日の脊髄組織における Notch シグナルに関連した遺伝子発現を

real time PCR で評価する。

(6) Notch ligand を過剰発現させた線維芽細胞移植

EPC 移植後の変化が Notch シグナルを介したものが確認するために、Jagged1 を過剰発現させた線維芽細胞 (3T3) を脊髄損傷部へ移植し、上記と同様の組織学的評価を行う。また、関与する Notch シグナルが Jagged1 特異的なものかどうか調べるため、Delta-like 1 (Dl1) を過剰発現させた線維芽細胞も移植する。

移植細胞: empty vector-3T3 (コントロール), Jagged1-3T3, Dl11-3T3

4. 研究成果

(1) 神経幹細胞-血管内皮前駆細胞共存培養

神経幹細胞と血管内皮前駆細胞との共存培養では Jag1+/+EPC との共存培養において、 β III Tubulin 陽性の神経が増殖し、この反応は Jag1-/EPC との共存培養においては認めなかった (図 1)。このことから EPC における Jagged1 の発現は EPC による神経産生の促進に関係していると考えられた。

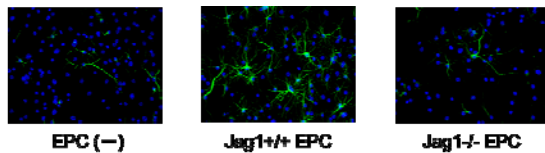


図 1 : Jag1+/+EPC との共存培養で、 β III Tubulin 陽性細胞の数が増殖し、この反応は Jag1-/EPC との共存培養では認めなかった。

(2) 脊髄機能改善

Jagged1+/+EPC の移植では損傷後の脊髄機能回復が促進されたが、Jagged1-/EPC の移植では明らかな回復促進効果が認められなかった。

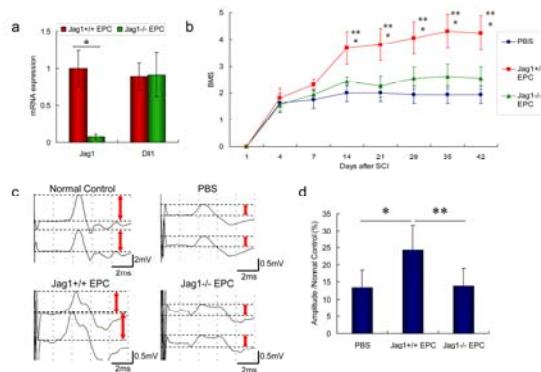


図 2 : a. Jagged1-/EPC では Notch リガンドの中で Jagged1 の発現のみが抑制されていた。 b. Jag1+/+ EPC 群では PBS 群に比べ、損傷後の後肢運動機能の回復が有意に改善していたが、Jag1-/EPC 群では PBS 群との有意差を認めなかった。 c, d. 損傷 6 週後の

頭蓋電気刺激-運動誘発電位測定における誘発電位波形の振幅は、Jag1+/+ EPC 群で他の群に比べて有意に大きかった。

(3) 組織学的評価

経静脈的に移植した EPC は脊髄損傷部周囲に集積しており、集積の程度では Jagged1+/+EPC と Jagged1-/EPC との間に差はなかった (図 3)。

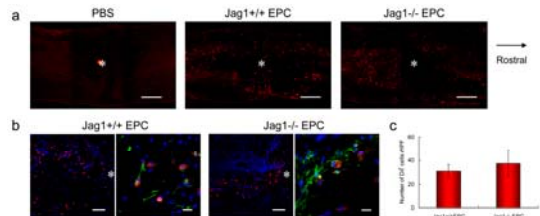


図 3 : a. DiI でラベルした Jagged1+/+EPC および Jagged1-/EPC のいずれも脊髄損傷部周辺へ集積していた。 b. 移植した EPC は CD31 陽性の血管周囲に存在していた。 c. 集積した移植細胞の数では Jag1+/+EPC 群と Jag1-/EPC 群との間に有意差はなかった。赤 : DiI (移植した EPC) 緑 : CD31 (血管内皮マーカー)

損傷 3 日後の脊髄損傷部において Jag1+/+EPC 群では反応性アストロサイトの増殖を認め、Hes5 や Cleaved Notch の発現増加から Notch シグナルの活性化が示された。これらの反応は Jag1-/EPC 群では認められず、反応性アストロサイトの産生増加における EPC 由来の Notch シグナルの関与が示唆された (図 4)

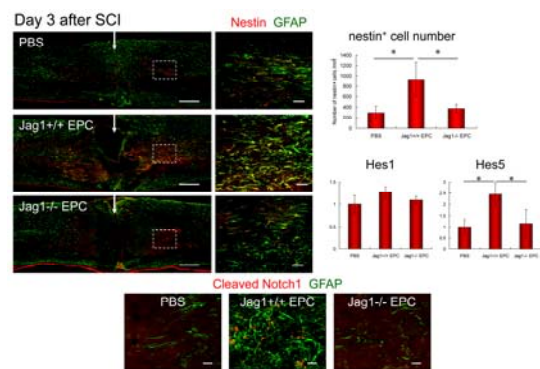


図 4 : 移植 3 日後では Jag1+/+EPC 群にて nestin 陽性、GFAP 陽性の反応性アストロサイトが増殖し、これらのアストロサイトには Notch シグナルの活性化を示す Cleaved Notch1 の発現を認めた。また、Notch の下流シグナルである Hes5 の発現増加も認めた。

損傷 3 日後では Jag1-/EPC 群に比べて Jag1+/+EPC 群で有意に血管新生が促進されていた (図 5)。一方損傷 14 日後では、PBS

群や Jag1^{-/-}EPC 群で見られる経の大きな異常血管形成が Jag1^{+/+}EPC 群では抑制されていた (図 6)。これらのことから、EPC における Jagged1 の存在は EPC 由来の血管新生促進のみならず、血管の安定化にも寄与していることが推測された。

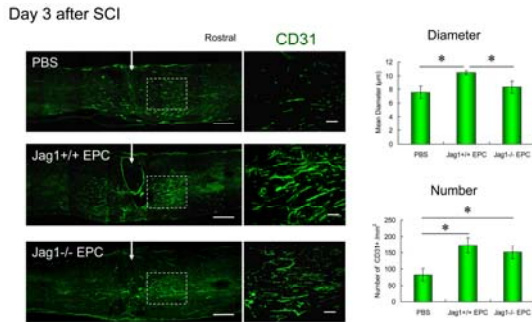


図 5 : 損傷 3 日後において、Jag1^{+/+}EPC 群では他群に比べて、血管新生が促進されていた。緑 : CD31

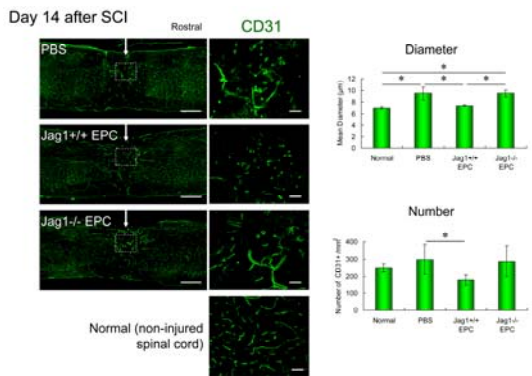


図 6 : 損傷 14 日後において、PBS 群と Jag1^{-/-}EPC 群では、正常組織に比べて経の大きな異常血管を認めるが、Jag1^{+/+}EPC 群ではこれらの異常血管が少なかった。緑 : CD31

損傷 42 日後での TH および 5HT の免疫染色において、Jag1^{+/+}EPC 群では損傷部および損傷部尾側での軸索伸長が促進されており、Jag1^{-/-}EPC 群では軸索伸長促進をほとんど認めなかった (図 7)。

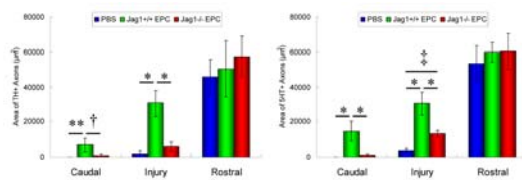


図 7 : 損傷 42 日後の免疫染色における TH および 5HT 陽性軸索の面積を測定した。Jag1^{+/+}EPC では損傷部および損傷部の尾側における軸索を他の群よりも多く認めた。

(4) Notch ligand 過剰発現—線維芽細胞移植 Jagged1 を強制発現させた線維芽細胞を脊髄損傷部へ移植すると、反応性アストロサイトの増加を認めたが、Notch の他のリガンドである Dll1 を発現させた線維芽細胞の移植では、この反応を認めなかった (図 8)。これらのことから、反応性アストロサイトの産生増加には Jagged1 特異的な Notch シグナルが関与していることが示唆された。

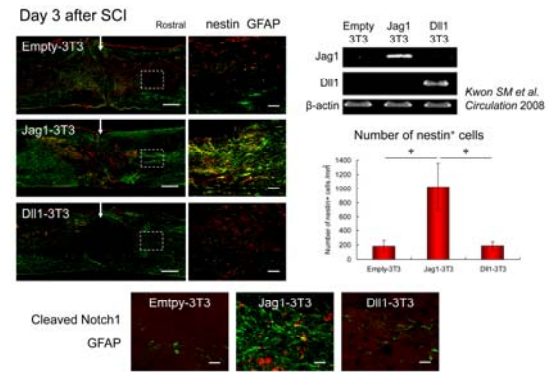


図 8 : Jag1-3T3 群では empty-3T3 群や Dll1-3T3 群と比較して nestin 陽性、GFAP 陽性の細胞を多く認め、Cleaved Notch1 の発現増加も認めた。

(5) 結語

移植した血管内皮前駆細胞由来の Jagged1-Notch シグナルが内在性の神経幹細胞を刺激して、反応性アストロサイトの産生増加を促していた。また、Jagged1-Notch シグナルは血管新生促進や血管成熟にも関与していると考えられた。血管内皮前駆細胞移植は Jagged1-Notch シグナルを介したこれらの反応によって損傷脊髄の修復を促進したと考えられる。

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. Naosuke Kamei et al. Lnk deletion reinforces the function of bone marrow progenitors in promoting neovascularization and astrogliosis following spinal cord injury. *Stem Cells*. 査読有 2010, 28, 365-375
2. Norifumi Tanaka, Naosuke Kamei et al. CD133+ cells from human umbilical cord blood reduce cortical damage and promote axonal growth in neonatal rat organ co-cultures exposed to hypoxia. *Int J Dev Neurosci*. 査読有 2010, 28, 581-587

3. 亀井直輔. 血管内皮前駆細胞移植による脊髄再生. 脊椎脊髄ジャーナル 査読無 2010, 23, 851-858
4. 亀井直輔, 浅原孝之. 臓器再生のための血管再生治療. Surgery Frontier 査読無 2009, 16, 25-29

[学会発表] (計 18 件)

1. 亀井直輔 運動器再生医療の現状と未来への挑戦 (招待講演) 豊見城中央病院院内講演会 2011年2月3日 豊見城中央病院 (沖縄)
2. 亀井直輔 脊髄再生治療研究の最先端 (招待講演) 第8回 呉脊椎・脊髄病研究会講演会 2011年1月28日 City Plaza SUGIYA (広島)
3. Naosuke Kamei. Endothelial progenitor cells promote regeneration of injured spinal cord through Notch signaling. (New Investigator Recognition Award) 2011 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2011年1月13日 Long Beach Convention Center (Long Beach, CA, USA)
4. 亀井直輔 再生医療の現状とこれからの展望 (招待講演) 第63回広島医学会総会 2010年11月14日 広島県医師会館
5. 亀井直輔 Vascular niche を利用した脊髄再生アプローチ (依頼講演・パネルディスカッション) 第25回日本整形外科学会基礎学術集会 2010年10月14日 国立京都国際会館
6. 亀井直輔 Lnk 欠損骨髄前駆細胞移植による脊髄再生 第29回日本運動器移植・再生医学研究会 2010年9月25日 京都テルサ
7. 亀井直輔 ヒト血液由来 CD133 陽性細胞による運動器再生 (ワークショップ) 第31回日本炎症・再生医学会 2010年8月6日 京王プラザホテル
8. 亀井直輔 脊髄再生のための血管再生治療の開発 (シンポジウム) 第83回日本整形外科学会学術総会 2010年5月27日 東京国際フォーラム
9. Naosuke Kamei. Lnk deletion reinforces the function of bone marrow progenitors in promoting neovascularization and astrogliosis following spinal cord

injury. 1st Annual Meeting of Cervical Spine Research Society Asia Pacific Section 2010年4月24日 Kobe International Conference Center (Kobe, Japan)

10. 亀井直輔 Lnk 欠損骨髄前駆細胞移植による損傷脊髄再生 第39回日本脊椎脊髄病学会 2010年4月22日 高知県立県民文化ホール
11. 亀井直輔 ヒト血管内皮前駆細胞移植による脊髄再生 第28回日本運動器移植・再生医学研究会 2009年11月21日 富士ソフトアキバプラザ
12. 亀井直輔 ヒト血管内皮前駆細胞移植による脊髄再生 (パネルディスカッション) 第24回日本整形外科学会基礎学術集会 2009年11月5日 パシフィコ横浜
13. 亀井直輔 脊髄損傷における血管内皮前駆細胞の動態と役割 第24回日本整形外科学会基礎学術集会 2009年11月5日 パシフィコ横浜
14. 亀井直輔 血管内皮前駆細胞移植による脊髄再生 (依頼講演) 第10回運動器科学研究会 2009年9月18日 東京ステーションコンファレンス
15. 亀井直輔 ヒト血管内皮前駆細胞の体外増幅と再生医療への応用 (依頼講演) 化学工学会 第41回秋季大会 2009年9月16日 広島大学東広島キャンパス
16. 亀井直輔 脊髄損傷に対する血管再生治療の開発 (招待講演) 第6回心血管再生治療フォーラム 2009年9月12日 東京国際フォーラム
17. 亀井直輔 血管再生による脊髄再生 (招待講演) 名古屋脊椎脊髄セミナー 2009年7月11日 名古屋大学医学部
18. 亀井直輔 神経・血管ニッチ形成による脊髄再生 第38回日本脊椎脊髄病学会 2009年4月23日 神戸ポートピアホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀井 直輔 (KAMEI NAOSUKE)
 広島大学・病院・病院助教
 研究者番号：70444685

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：