

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 4月20日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22791381

研究課題名（和文）新規脊髄損傷再生療法による損傷神経回路網再建メカニズムの解明

研究課題名（英文） Regenerative therapy for spinal cord injury and their mechanism for reconstruction.

研究代表者 あべ松 昌彦（ABEMATSU MASAHIKO）

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70448190

研究成果の概要（和文）：

重度脊髄損傷などの壊れた中枢神経回路網の再建は非常に難しく、根本的な治療法は未だに確立していない。我々は神経幹細胞と抗てんかん薬を併用して効率よく神経細胞をつくり、重度脊髄損傷マウスが歩行可能になる治療法を開発するとともに、このときに働く新たな治癒メカニズムを明らかにしたので報告する。

研究成果の概要（英文）：Neural stem cells (NSCs) possess the ability to self-renew and to differentiate into the three major cell types found in the central nervous system (CNS). Recent studies have shown that epigenetic gene regulation events such as DNA methylation and histone modification play important roles in regulating NSC fate specification. In this context, we have previously shown that the histone deacetylase inhibitor valproic acid (VPA) enhances neuronal differentiation of NSCs. Perhaps because these patterns of NSC differentiation are exquisitely controlled during normal embryonic development, restoration of damaged neural networks in the injured adult CNS is severely limited. Here, using a mouse model of spinal cord injury (SCI), we examined the effectiveness of NSC transplantation and differentiation control by VPA administration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,600,000	480,000	2,080,000
平成23年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：脊椎脊髄病学

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷や脳卒中をはじめとする損傷した中枢神経系の再建は困難であり、悪

化した麻痺症状は不可逆的であると言われている。古くからこの問題を解決するために多くの研究者によって神経変性疾

患や神経損傷モデル動物に対する再生治療への応用研究がなされてきた。神経再生の妨げになる損傷部の炎症を抑制する方法や、損傷した軸索の再伸長を促進する方法、脱髄した軸索を移植細胞で再髄鞘化する方法、損傷部の血流を改善する方法などがこれまでに試されている (Oudega, et al. Eur. J. Neurosci. 1999, Schnell, et al. Nature. 1990, Cummings, et al. PNAS 2002, Leist, et al. Science. 2004)。これまでの報告では治療効果が観察されても、治療効果を発揮するメカニズムについて詳細に検討している報告は少なく、はっきりとしたエビデンスを元にした臨床応用には程遠い状況である。

2. 研究の目的

我々はこれまでに神経幹細胞移植とヒストン脱アセチル化酵素阻害活性をもつバルプロ酸を併用することで、脊髄損傷に対して高い治療効果を発揮する新規治療法を開発した。しかし、今回我々が開発したこの新規治療法を安全に臨床応用するためには、この治療の作用メカニズムを明らかにすることが必須である。当研究では損傷した神経ネットワーク再構築のメカニズムを多面的に解明するとともに、臨床応用を見据え倫理的問題の少ないヒト iPS 細胞由来神経幹細胞でも高い治療効果が発揮されるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

本研究ではまず、バルプロ酸投与により分化制御された移植細胞由来ニューロンがどのような機序で損傷した神経ネットワークを再構築しているのか複数のトレーサーを用いて明らかにするとともに治療後移植細胞のみを特異的に死滅させることで、移植細胞が神経ネットワーク再建に直接的に貢献しているかを明らかにする。さらに将来の臨床応用を想定し、マウス胎仔脳由来の神経幹細胞の代わりにヒト iPS 細胞由来神経幹細胞を移植し、

バルプロ酸で分化誘導することで、脊髄損傷を治療可能かどうかを検証する。

4. 研究成果

申請者らはバルプロ酸により神経幹細胞を処理するとニューロン分化が選択的に誘導されることをこれまでに見いだしているが、本研究では *in vivo* でもバルプロ酸を投与すると移植した神経幹細胞がニューロンへと分化誘導されるかどうかを実際に脊髄損傷モデルマウスを用いて評価した。脊髄損傷後7日目に GFP マウスから得た神経幹細胞をマイクロインジェクターを用いて損傷中心部に移植した。バルプロ酸は移植当日から 150mg/kg を1週間毎日腹腔内投与した。移植1週間後に灌流固定し、取り出した脊髄の凍結切片を作製して、ニューロンのマーカーとともに GFP に対する抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。バルプロ酸投与群では非投与群に比べて、GFP 陽性細胞におけるニューロンマーカー陽性細胞の割合が高く損傷脊髄内においてもニューロン分化が誘導されることが示唆された。また、先行実験において損傷中心部から分布した移植細胞の突起長を計測すると、バルプロ酸投与群では非投与群に比べて、より著明な突起伸長が見られた。さらに非治療群も含めて下肢運動機能評価 (BBB scoring) を行ったところ、神経幹細胞移植後バルプロ酸を投与した群では非治療群、バルプロ酸非投与群と比べて明らかに下肢運動機能の改善が見られた。錐体路のトレーシング実験では、移植した神経細胞が損傷した神経回路をリレーするように再建している様子が観察された。移植細胞を特異的に除去すると、一度改善した運動機能が再度悪化することからも、移植細胞が直接的に損傷脊髄の再建に貢献していることが推察された。

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4件)

① Treatment of a Mouse Model of Spinal Cord Injury by Transplantation of Human iPS Cell-derived Long-term Self-renewing Neuroepithelial-like Stem Cells.

Fujimoto Y, Abematsu M, Falk A, Tsujimura K, Sanosaka T, Juliandi B, Semi K, Namihira M, Komiyama S, Smith A,

Nakashima K. Stem Cells. 2012 Mar 14.
(査読有り)

②Chromatin remodeling in neural stem cell differentiation.

Juliandi B., Abematsu M., Nakashima K.
Current Opinion in Neurobiology
20:1-8,2010 (査読有り)

③Epigenetic regulation in neural stem cell differentiation.

Juliandi B., Abematsu M., Nakashima K.
Development Growth and Differentiation
52(6):493-504,2010 Aug (査読有り)

④Neurons derived from transplanted neural stem cells restore disrupted neuronal circuitry in a mouse model of spinal cord injury.

Abematsu M., Tsujimura K, Yamano M, Saito M, Kohno K, Kohyama J, Namihira M, Komiya S, Nakashima K.
Journal of Clinical Investigation
120(9):3255-66,2010 Sep 1 (査読有り)

[学会発表] (計10件)

①第122回西日本整形・災害外科学会
平成23年11月27日 熊本市
術後髄液漏に対する閉鎖術—筋膜再建とポリグリコール酸フェルト併用
精松昌彦、他8名

②第76回 西日本脊椎研究会
平成23年11月25日 福岡市
脊椎手術における3次元立体模型の有用性
精松昌彦、他9名

③ Bio-Rheumatology International Congress (BRIC) Tokyo The 8th GARN Meeting 平成23年11月14日 東京都

Reconstruction of injured spinal cord by epigenetic regulation of transplanted neural stem cells (招待講演)
精松昌彦、他8名

④第12回運動器科学研究会 平成23年9月2日 高知県安芸郡芸西村
脊髄損傷マウスに対するエピジェネティック治療と運動器回復能
精松昌彦、他8名

⑤第121回西日本整形・災害外科学会
平成23年6月11日 福岡市
胸椎後縦靭帯骨化症に対する後方除圧固定術後の治療成績
精松昌彦、他7名

⑥第84回日本整形外科学会
平成23年5月12日 Web上
脊髄損傷に対する新規再生治療ストラテジー
精松昌彦、他7名

⑦Neuroscience meeting 2010【アメリカ合衆国, サンディエゴ】
2010年11月13-17日
Epigenetic regulation of transplanted neural stem cells reconstructed injured spinal cord
Masahiko Abematsu, Keita Tsujimura, Mariko Yamano, Michiko Saito, Kenji Kohno, Jun Kohyama, Masakazu Namihira, Setsuro Komiya, Kinichi Nakashima

⑧第25回日本整形外科学会基礎学術集会

【京都府】2010年10月14日

移植神経幹細胞由来ニューロンによる脊髄
損傷再生治療

鹿児島大学整形外科

○木青松 昌彦 , 中島欽一, 小宮節郎

⑨第9回日本再生医療学会【広島県】

2010年3月18日

エピジェネティック修飾変換による移植神
経幹細胞の分化制御と損傷脊髄の再建

Masahiko Abematsu, Kinichi Nakashima

[その他]

ホームページ等

<http://www2.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~mdio/list/o/o5/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

あべ松 昌彦 (ABEMATSU MASAHIKO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・
医員

研究者番号：70448190