

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 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791397

研究課題名（和文）

再髄鞘化による脊髄の再生～細胞移植療法で得られる機能回復メカニズムの解明～

研究課題名（英文） Spinal cord repair by re-myelination enhancement. -Elucidation of the functional recovery mechanism after cell transplantation for spinal cord injury-

研究代表者

安田 明正 (YASUDA AKIMASA)

慶應義塾大学・医学部・助教（非常勤）

研究者番号：40445226

研究成果の概要（和文）：

脊髄損傷に対して神経幹細胞移植による治療効果が得られることは多く示されてきたが、そのメカニズムの詳細は不明であった。今回、われわれは、先天的に髄鞘が欠損した *shiverer mutant mouse* から採取した神経幹細胞を用いて、野生型マウス由来神経幹細胞との比較を行い、機能回復における移植細胞由来の再髄鞘化の重要性を証明した。

研究成果の概要（英文）：

We have reported that transplantation of neural stem/progenitor cells (NS/PCs) for spinal cord injury promoted functional recovery, while the precise mechanism of functional recovery still remains unclear. In the present study, we utilized NS/PCs derived from genetically myelin deficient *shiverer* mutant mice. We compared *shiverer* mouse derived NS/PCs with wild type mouse derived NS/PCs. We have shown that graft-derived re-myelination is significant in the functional recovery after neural stem/progenitor cell transplantation after spinal cord injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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

キーワード：脊髄損傷・神経幹細胞・細胞移植・再髄鞘化

1. 研究開始当初の背景

当研究室では、齧歯類および霊長類共通マウスモデル脊髄損傷モデルにおいて、神経幹細胞移植の有効性を報告してきたが、運動機能回復が得られるその詳細には不明な点が多かった。そこで、今回我々は、提唱メカニズムの1つである移植細胞由来オリゴデンドロサイトによる再髄鞘化の機能回復への関与を証明するために研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脊髄損傷に対する神経幹細胞

移植により得られる機能回復メカニズムのうち再髄鞘化の寄与を証明し、更に髄鞘形成細胞移植による脊髄損傷治療の効果を検討することである。

3. 研究の方法

自然発生の（ミエリン塩基性タンパク質、以下 MBP）遺伝子変異を持ち、正常な髄鞘を形成しない *shiverer mutant* マウスの胎生 14.5 日目の胎仔線条体から神経幹細胞を採取し（*shi*-NS/PCs）、野生型マウス神経幹細胞（*wt*-NS/PCs）との比較を *in vitro* および *in*

*vivo*で行った。

*In vitro*では、*shi*-および *wt*-NS/PCs の増殖能・分化能を評価し、*in vivo*では、免疫不全 NOD/SCID マウスの成体メスに脊髄圧挫損傷モデルの作製後、損傷後 9 日目に *shi*-および *wt*-NS/PCs の細胞移植を損傷中心部へと行った (*shi*; n=15, *wt*; n=13)。対照群も作製し、対照群の脊髄損傷モデルマウスには細胞移植を行わず、PBS のみを損傷後 9 日目に注入 (n=14) した。細胞移植後 6 週まで、後肢運動機能評価及び Bio-imaging による移植細胞生存の確認を行った後、電気生理および組織学的検討を行った。

4. 研究成果

In vitro:

- ① *shi*-NS/PC は neurosphere 法で培養することで、*wt*-NS/PC と同様に細胞塊 neurosphere を形成した。neurosphere の形態には両者に違いを認めず、細胞の代謝産物である ATP 測定による増殖能の評価でも有意差を認めなかった (図 1)。

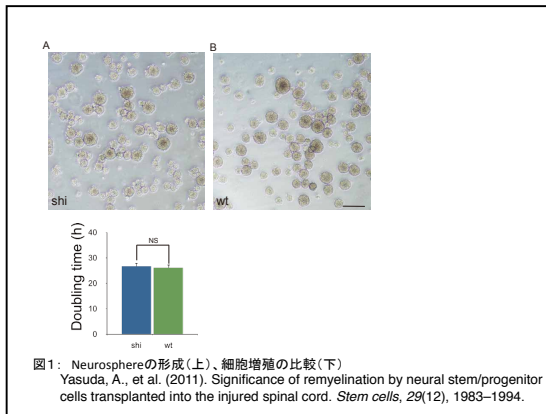


図1: Neurosphereの形成(上)、細胞増殖の比較(下)
Yasuda, A., et al. (2011). Significance of remyelination by neural stem/progenitor cells transplanted into the injured spinal cord. *Stem cells*, 29(12), 1983–1994.

- ② *shi*-NS/PC は、*in vitro*において Tuj-1 陽性の neuron, GFAP 陽性の astrocyte, CNPase 陽性の oligodendrocyte の神経系 3 系統への分化を示した。この分化傾向は、*wt*-NS/PC と同様であった (図 2)。

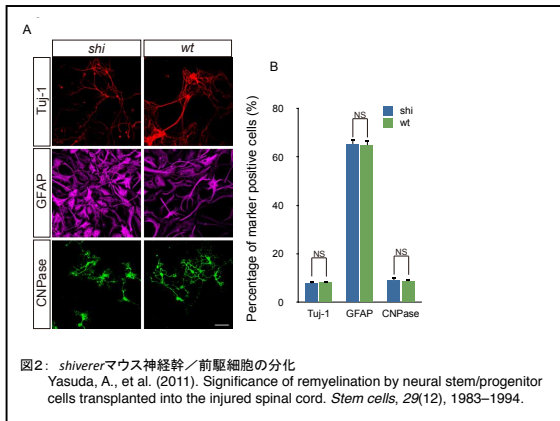


図2: *shiverer*マウス神経幹/前駆細胞の分化
Yasuda, A., et al. (2011). Significance of remyelination by neural stem/progenitor cells transplanted into the injured spinal cord. *Stem cells*, 29(12), 1983–1994.

- ③ PDGF-AA および CNTF を培養液中に添加し、*in vitro*において、成熟 oligodendrocyte の誘導を試みた。*shiverer* マウスは髄鞘形成不全マウスであるが、*shi*-NS/PC は成熟 oligodendrocyte のマーカーとしても用いられる O1、成熟後に形成すると考えられている髄鞘蛋白質のマーカーとして用いられる CNPase、PLP で免疫染色学的に標識可能であった。これら 3 マーカーを用いた定量では、*wt*-NS/PCs との比較で有意差を認めなかった。一方、MBP 陽性の oligodendrocyte へは *wt*-NS/PC は同条件の培養で陽性細胞を認めるものの、*shi*-NS/PC からの分化では一切認めなかった (図 3)。

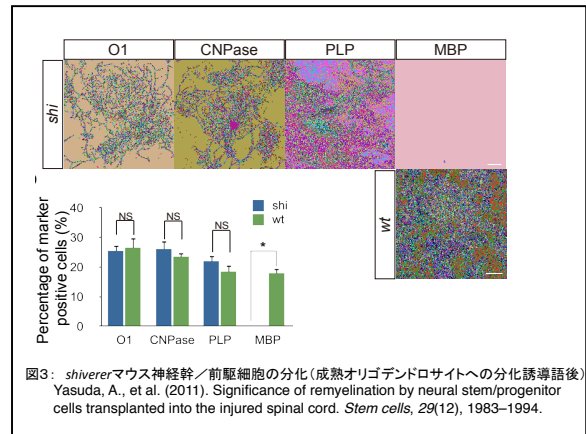


図3: *shiverer*マウス神経幹/前駆細胞の分化(成熟オリゴデンドロサイトへの分化誘導後)
Yasuda, A., et al. (2011). Significance of remyelination by neural stem/progenitor cells transplanted into the injured spinal cord. *Stem cells*, 29(12), 1983–1994.

*In vitro*において、*shi*-NS/PC は MBP 陽性の oligodendrocyte に分化しないという点のみ *wt*-NS/PC と異なっていた。

in vivo

- ① 成体メス免疫不全 NOD/SCID マウスの圧挫脊髄損傷 (IH インパクト 60kdyn) モデルの損傷後 9 日目に *shi*-NS/PC および *wt*-NS/PC 由来の neurosphere の細胞移植を損傷中心部へと行った。移植後の細胞は Bio-imaging システムの IVIS で経時的に発光測定 total flux を測定し、移植細胞の生存率を推定した。研究者は、*shi*-NS/PCs の生存率が *wt*-NS/PCs と移植後 6 週間にわたり同程度であることを確認した (図 4)。

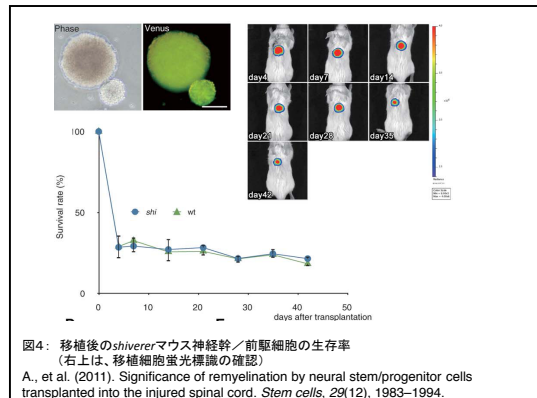
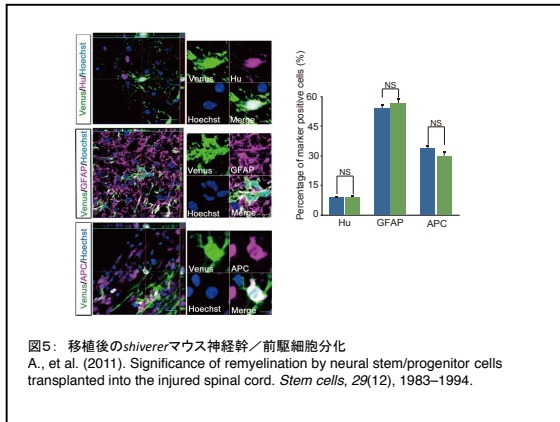
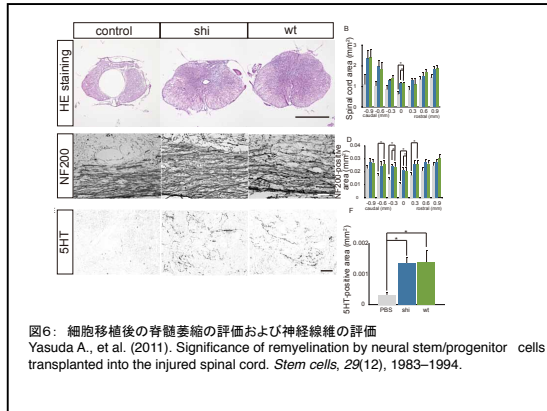


図4: 移植後の *shiverer*マウス神経幹/前駆細胞の生存率
(右上は、移植細胞蛍光標識の確認)
A., et al. (2011). Significance of remyelination by neural stem/progenitor cells transplanted into the injured spinal cord. *Stem cells*, 29(12), 1983–1994.

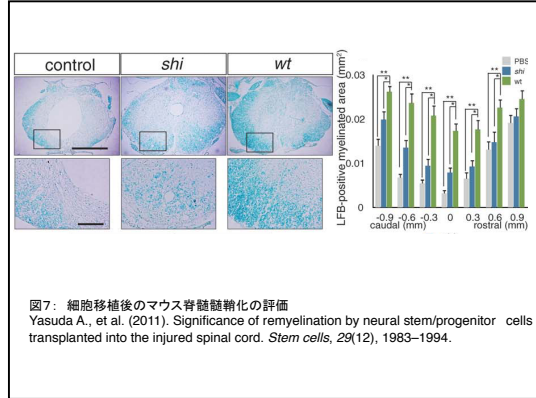
② *shi*-NS/PCs は、*in vivo* においても Hu 陽性の neuron、GFAP 陽性の astrocyte、APC 陽性の oligodendrocyte へ分化した。また、*in vitro* 同様 *wt*-NS/PC と同様の分化傾向を示した (図 5)。



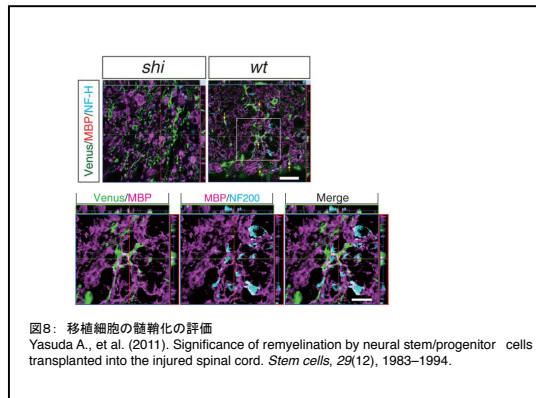
③ *shi*-NS/PC および *wt*-NS/PC が損傷された脊髄損傷モデルでは、細胞移植を行わなかったマウスと比較して脱髄の回避が認められた。また、NF200 陽性および 5HT 陽性の神経繊維はそれぞれ、損傷中心部および周辺部、腰膨大部において対照群と比較して統計学的有意差をもって、両細胞移植群において増加を認めた。しかし、両細胞移植群間での有意差は認められなかった (図 6)。



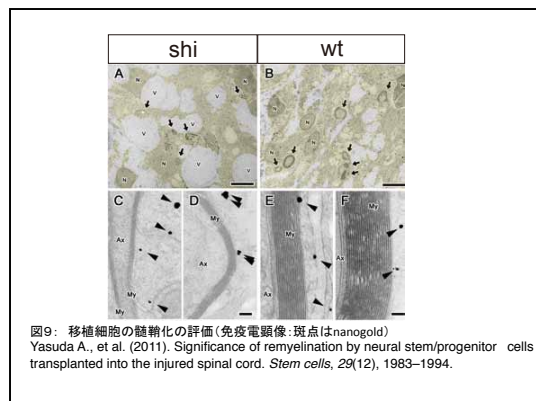
④ LFB 染色による髓鞘面積の定量では、髓鞘形成不全を示すはずの *shi*-NS/PC 移植群においても、対照群との比較で髓鞘面積の増加を、損傷中心部および周辺部に確認できた。しかし、*shi*-NS/PC 移植群の髓鞘面積は *wt*-NS/PC 移植群と比較すると有意に小さくなっていた (図 7)。



⑤ 移植細胞を標識した Venus と髓鞘タンパク質マーカである MBP を用いた免疫 2 重染色を行った。*shi*-NS/PC 移植群では、Venus および MBP の二重陽性の髓鞘は全く認めなかったが、*wt*-NS/PC 移植群では、散見された (図 8)。



⑥ 免疫電顕像では、移植細胞を標識した蛍光 Venus を Nanogold の斑点で同定した。髓鞘形成不全を呈する *shi*-NS/PC 由来であっても、髓鞘の形成が確認出来たが、*wt*-NS/PC と比較すると非常に薄い髓鞘であった (図 9)。



⑦ 運動機能評価では、Open Field Score である BMS スコア、Rota-rod treadmill および Digigait システムを用いた歩行解析を行った。脊髄損傷後 7 週間の BMS スコアでは、*shi*-NS/PC 移植群において、移植後早期に若干の機能回復を認めたものの、細胞移植を行わなかった対照群と比較して有意差は認められなかった。一方で、*wt*-NS/PC 移植群では、移植後 2 週目から対照群との比較で有意に機能回復が認められ、移植後 5 週目以降では *shi*-NS/PC との比較においても有意な機能回復が認められた (図 10)。細胞移植後 6 週

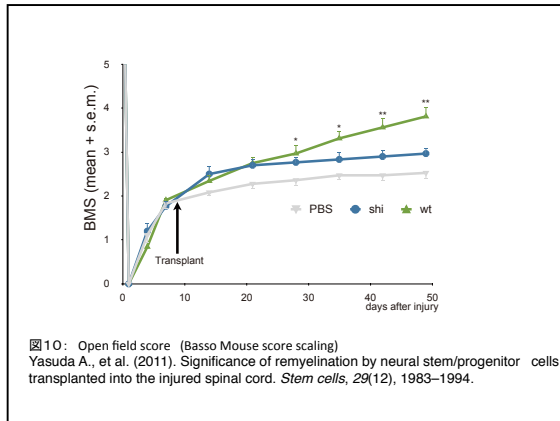


図10: Open field score (Basso Mouse score scaling) Yasuda A., et al. (2011). Significance of remyelination by neural stem/progenitor cells transplanted into the injured spinal cord. *Stem cells*, 29(12), 1983-1994.

目時点での Rota-rod treadmill および歩行解析における歩調の解析においても同様の傾向を確認出来た。

⑧ Motor Evoked Potential (MEP)による電気生理学的解析では、本検討における条件では、対照群では、反応を確認できなかったが、両細胞移植群において反応を確認できた (図 11)。また潜時は *shi*-NS/PC 移植群において有意に延長しており、伝導性は *wt*-NS/PC 移植群に及ばないことが確認出来た。

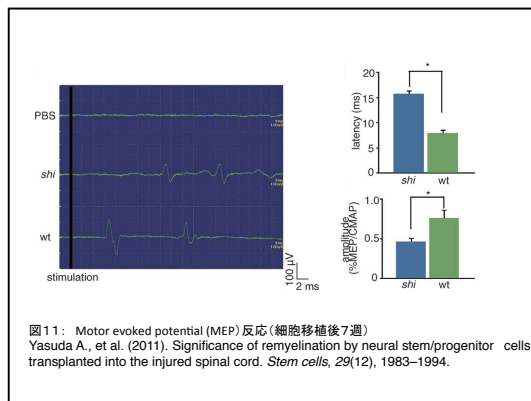


図11: Motor evoked potential (MEP) 反応 (細胞移植後7週) Yasuda A., et al. (2011). Significance of remyelination by neural stem/progenitor cells transplanted into the injured spinal cord. *Stem cells*, 29(12), 1983-1994.

脊髄損傷に対する細胞移植治療において、いい職細胞由来の再髄鞘化が重要であるという結果をふまえて、自家組織移植可能な末梢神経由来のシュワン細胞から細胞塊を形成させ、脊髄損傷治療に有効であるかを検討している。一部、移植細胞による再髄鞘化が確認できた。

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 5 件)

1. Hara-Miyauchi, C. C., Tsuji, O. O., Hanyu, A. A., Okada, S. S., Yasuda, A. A., Fukano, T. T., Akazawa, C. C., et al. (2012). Bioluminescent system for dynamic imaging of cell and animal behavior. *Biochemical and biophysical research communications*, 419(2), 188-193. 査読: 有り

2. Yasuda, A., O. Tsuji, S. Shibata, S. Nori, M. Takano, Y. Kobayashi, Y. Takahashi, K. Fujiyoshi, C.M. Hara, A. Miyawaki, H.J. Okano, Y. Toyama, M. Nakamura, and H. Okano, *Significance of remyelination by neural stem/progenitor cells transplanted into the injured spinal cord*. *Stem Cells*, 2011. 29(12): p. 1983-94. 査読: 有り

3. Renault-Mihara, F., H. Katoh, T. Ikegami, A. Iwanami, M. Mukaino, A. Yasuda, S. Nori, Y. Mabuchi, H. Tada, S. Shibata, K. Saito, M. Matsushita, K. Kaibuchi, S. Okada, Y. Toyama, M. Nakamura, and H. Okano, *Beneficial compaction of spinal cord lesion by migrating astrocytes through glycogen synthase kinase-3 inhibition*. *EMBO Mol Med*, 2011. 3(11): p. 682-96. 査読: 有り

4. Takagi, T., K. Ishii, S. Shibata, A. Yasuda, M. Sato, N. Nagoshi, H. Saito, H. J. Okano, Y. Toyama, H. Okano, and M. Nakamura, *Schwann-Spheres Derived from Injured Peripheral Nerves in Adult Mice - Their In Vitro Characterization and Therapeutic Potential*. *PloS one*, 2011. 6(6): p. e21497. 査読: 有り
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0021497>

5. Nori, S., Y. Okada, A. Yasuda, O. Tsuji, Y. Takahashi, Y. Kobayashi, K. Fujiyoshi, M. Koike, Y. Uchiyama, E. Ikeda, Y. Toyama, S. Yamanaka, M. Nakamura, and H. Okano, *Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011: p. 1-10. (論文) 査読: 有り

〔学会発表〕（計 8 件）

1. Yasuda, A., Tsuji, O., Shibata, S., Fujiyoshi, K., Takahashi, Y., Nori, S., Kobayashi, Y., Toyama, Y., Nakamura, M., Okano, H.; “Significance of re-myelination by Neural stem/progenitor cells grafted into the injured spinal cord.” “41st Annual meeting Neuroscience 2011”, 2011.11.13*session 11/12-16（ポスター発表：Washington Walter E Convention Center, Washington D.C., USA）

2. 安田明正、辻収彦、芝田晋介、藤吉兼浩、高橋勇一朗、海苔聡、小林喜臣、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也 脊髄損傷に対する神経幹細胞移植後の機能回復における再髄鞘化の重要性。第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 2011 年 10 月 20 日*会期 10/20-21（口頭発表：高崎）

3. Yasuda, A., Tsuji, O., Shibata, S., Fujiyoshi, K., Takahashi, Y., Nori, S., Kobayashi, Y., Toyama, Y., Nakamura, M., Okano, H.; “Significance of re-myelination after NS/PC transplantation to SCI.” “ISSCR 9th annual meeting”, 2011.6.16*session 6/15-18, 2011（ポスター発表：Metro Convention Center, Toronto, Canada）

4. 安田明正、辻収彦、芝田晋介、藤吉兼浩、高橋勇一朗、海苔聡、小林喜臣、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也 脊髄損傷に対する神経幹細胞移植後の機能回復における再髄鞘化の重要性 先天性脱髄マウス由来神経幹細胞を用いた解析。第 40 回脊椎脊髄病学会 2011 年 4 月 21 日*会期 4/21-23（口頭発表：東京）

5. 安田明正 辻収彦 海苔聡 高橋勇一朗 藤吉兼浩 戸山芳昭 中村雅也 岡野栄之 Significance of re-myelination in the functional recovery after NS/PC transplantation to SCI. Neuroscience 2010, 2010.11.15*session 11/12-16, 2010（ポスター発表：San Diego Convention Center, サンディエゴ、USA）

6. 安田明正、辻収彦、海苔聡、高橋勇一朗、藤吉兼浩、高野盛登、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也：損傷脊髄への神経幹細胞移植療法における再髄鞘化の重要性-先天性脱髄マウス由来神経幹細胞を用いた検討- 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会 2011 年 10 月 14 日*会期 10/14-15（口頭発表：京都）

7. 安田明正、辻収彦、芝田晋介、海苔聡、高橋勇一朗、藤吉兼浩、戸山芳昭、中村雅也、岡野栄之：損傷脊髄の再生において再髄鞘化が及ぼす影響の検討 -神経幹細胞移植療法における行動機能回復メカニズムの解析- Neuro2010（第 33 回日本神経科学大会）2010 年 9 月 4 日*会期 9/2-4（ポスター発表：神戸）

8. 安田明正、辻収彦、海苔聡、高橋勇一朗、藤吉兼浩、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也：損傷脊髄の再生において再髄鞘化が及ぼす影響の検討 -神経幹細胞移植療法における行動機能回復メカニズムの解析- 第 39 回日本脊椎脊髄病学会 2010 年 4 月 23 日*会期 4/22-23（高知：口頭発表）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 明正 (YASUDA AKIMASA)

慶應義塾大学・医学部・助教（非常勤）

研究者番号：40445226