

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：34441

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300125

研究課題名(和文) 成体由来幹細胞の移植による脊髄再生のメカニズム - 形態学的究明と新たな動向の推進 -

研究課題名(英文) Mechanisms of spinal cord regeneration by transplantation of matured animal-derived somatic stem cells

研究代表者

井出 千束 (IDE, Chizuka)

藍野大学・医療保健学部・教授

研究者番号：70010080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの脊髄に挫滅損傷を与え、損傷後1、2、4週後の3群に分けて、培養骨髄間質細胞の移植を開始した。移植は毎週1回、3週行った。1回目の移植から4週後に固定し、歩行の回復と組織修復を調べた。歩行は、BBBスコアで3群いずれも対照群と有意の差があった。また、3群とも無数の再生神経がアストロサイトの存在しない損傷部位に伸びていた。再生軸索はシュワン細胞に囲まれていた。骨髄単核細胞は骨髄液から分離、培養を経ないで脊髄損傷のラットの髄液に注入した。有意な歩行の回復、組織の修復が見られた。培養脈絡叢上皮細胞は、脊髄損傷部位に直接移植した。細胞は宿主組織に生着し、再生軸索が移植細胞に沿って伸びていた。

研究成果の概要(英文)：The spinal cord was crush-injured at Th9-10 level in rats. Transplantation of cultured bone marrow stromal cells (BMSCs) began 1 (group 1), 2 (group 2), and 4 weeks (group 3) after injury. Cells were injected into the CSF. Rats were fixed at 4 weeks after the initial injection. BBB scores were significantly higher in the three groups than the control. Numerous regenerating axons grew out through the lesion devoid of astrocytes in the three groups. Astrocyte-devoid areas are composed of connective tissues. Axons were surrounded by Schwann cells. BMSC transplantation is effective for subacute and chronic spinal cord injuries. Mononuclear cells isolated from the bone marrow were injected into the CSF of spinal cord-injured rats. Locomotor improvement and tissue repair were secured. Choroid plexus epithelial cells were cultured and transplanted directly into the spinal cord lesion of rats. Regenerating axons grew out along grafted cells that were integrated into the host tissues.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経再生 移植・再生医療 脊髄再生 再生医学 栄養因子 リハビリテーション

1. 研究開始当初の背景

(1) 中枢神経は再生しないというのが従来の定説であったが、末梢神経の移植で中枢神経系の軸索が再生する事実が明らかになって以来、シュワン細胞の移植が研究されている。我々も以前、活性化シュワン細胞の移植実験を行った。

(2) 一方、胚性幹細胞 (ES 細胞) の移植も一時は期待されたが、倫理上の制約の下にある。神経幹細胞も同様で、研究は進んでいない。マクロファージの移植も注目されているが、大きな進展は報告されていない。iPS 細胞も移植細胞としての応用が追求されつつある。

(3) 骨髄間質細胞は、自家移植が可能な細胞として注目される。脊髄損傷に対して効果があることが多くの研究室から報告されている。我々は脊髄損傷のラットに対して、脊髄の損傷部位内ではなく、髄液経由で移植することで効果があることを明らかにした。骨髄間質細胞は損傷脊髄内の移植あるいは髄液経由の移植いずれにおいても、移植後 1-2 週で消失する。宿主脊髄組織に組み込まれて生き残ることはない。これらの成果を基に、我々のグループは、自家骨髄間質細胞の腰椎穿刺による移植を脊髄損傷の患者さんに応用して、安全性を確かめ、有効性を評価してきた。

2. 研究の目的

(1) これまで、骨髄間質細胞を用いて、急性期の脊髄損傷に対する移植効果を調べてきたが、臨床では亜急性期あるいは慢性期の状態にあること、また髄液経由投与は複数回の投与が可能であることを考慮して、本研究では、脊髄損傷後 1、2、4 週のラットに対して、骨髄間質細胞を 3 回にわたって移植して、その効果を調べた。

(2) これとは別に、さらに効果的な細胞の探索を行った。骨髄単核細胞は、いわゆる骨髄間質細胞の培養前の状態と看做されるが、

培養というステップを経ないで移植効果が得られるなら臨床的に大きな利点がある。既に単核細胞を移植に用いた研究も行われているが、我々は髄液経由の移植による効果を調べた。

(3) 脈絡叢組織は、我々が以前、脊髄に移植してその効果を見いだした組織である (Ide et al. Exp Neurol, 2001)。この組織は髄液産生機能を有して、中枢神経系の維持に重要な因子を分泌していると考えられる。培養脈絡叢上皮細胞を、脊髄損傷部位に移植して、ラットの行動の改善と組織修復効果を調べた。上記のいずれの細胞も、成体由来であり、自家移植が可能であるという点で、臨床応用に大きなバリアーがないことが特徴である。

3. 研究の方法

(1) 骨髄間質細胞の移植

(a) SD ラットの胸椎 8-9 レベルの椎弓を除去して、硬膜に囲まれた脊髄を露出させ、その上に 10 g の金属棒を 7.5 cm の高さから自然落下させ、挫滅した。一方、骨髄間質細胞は、GFP トランスジェニック SD ラットの大腿骨と頸骨の骨髄から培養した。培養 5-7 日で $5 \times 10^7 / 10 \text{cm dish}$ の細胞密度になった。細胞は CD90(+), CD29(+), CD34(-), CD11b(-) であった。

(b) ラットは、細胞移植の開始時期の相違 (損傷後 1、2、4 週) によって 3 群に分けた。細胞は 5×10^6 個の細胞を 50 μL の PBS に溶解し、脳定位装置を用いて第 4 脳室から注入した。移植は毎週 1 回とし、計 3 回行った。対照群は PBS のみを注入した。損傷後 1、2 週は亜急性期、4 週は慢性期と看做される。

(c) 細胞移植後、週 1 回、BBB スコアで歩行の改善を調べた。ビデオで記録して、2-3 人で評価した。また、組織学的、免疫組織学的、電顕的な検索は通常の方法で行った。

(d) 細胞移植を受けたラットの髄液の神経突起伸張効果を調べた。細胞移植後 2 日と 7

日で髄液を採取して、培養海馬ニューロンの培養液に5%の濃度で加えた。24時間後、軸索突起の伸びとニューロンの生存を調べた。

(2) 骨髄単核細胞は、Lymphoprep™で分離した。5x10⁶の細胞密度の溶液70μLを第4脳室から注入した。細胞注入後5週まで、毎週BBBを測定、最終週ではラットを固定して組織を調べた。

(3) 脈絡叢上皮細胞は、5x10⁵/30μlの培養細胞を脊髄損傷部内に注入した。損傷中心部とそれより2-3mmの頭尾方向の3カ所にそれぞれ10μLずつ注入した。移植後行動と移植細胞の運命を含めて組織の修復を調べた。

4. 研究成果

(1) 骨髄間質細胞の移植

3群とも、ラットの歩行は対照群に比べて有意に改善した。また、損傷部には、空洞とは別に、アストロサイトのない領域が形成され、その中に無数の再生軸索が伸張していた(図1)。再生軸索の数は対照群に比べて有意に多かった。

(a) 空洞の形成

最終の移植から4週後でラットを固定して、組織を調べた。空洞の大きさは、1、2、3群で、それぞれ10.4±3.5%、13.5±2.0%、31.8±3.7%であった。対照群では、1、2、3群で、それぞれ55.5±5.3%、50.2±5.5%、70.5±5.0%であった。移植群で、明らかに空洞形成が抑えられていた。また、慢性期になるに従って、空洞形成が顕著になる傾向にあった。空洞形成とは別に、アストロサイトの存在しない領域が形成されていた。この領域は、アストロサイトの免疫染色のみではあたかも空洞のように見えるが、実際には結合組織が存在し、その中に再生軸索が伸長していた。

(b) アストロサイトによる瘢痕形成

一般に損傷部にはアストロサイトの瘢痕が

形成されると言われているが、本研究ではその傾向は見られなかった。空洞あるいは上記のアストロサイト非存在領域を囲む辺縁部におけるアストロサイトの増殖を示唆する所見はなかった。

(c) 再生軸索の伸張

アストロサイト非存在領域に無数の再生軸索が伸びてきた。電子顕微鏡で調べると、この領域はコラーゲン線維をマトリックスとする結合組織の特徴を示していた。その中で伸びる軸索はシュワン細胞に囲まれ、末梢神経の形態を示していた(図2)。この結合組織領域にはオリゴデンドロサイトは存在しない。つまり中枢性の組織環境ではない。新たに形成された領域内を伸びる軸索は再生軸索と考えられる。再生軸索は1、2、3群とも多かった。その平均は291.6±64.7/0.25mm²、対照群は65.5±15.3/0.25mm²であった。脊髄損傷部の再生軸索が末梢神経系の環境にあり、かつ末梢神経の形態をとることは興味深い。再生軸索は損傷部辺縁で伸張を阻害されることなく、宿主脊髄組織内に伸びていた。

再生軸索には、下行性の伝導路である皮質脊髄路の線維(Texas red-dextran amineで標識)が、短い距離、損傷部に伸びていた。また、serotonin, catecholamine 陽性軸索が損傷部に存在した。これは下行性軸索の再生を示す。一方、CGRP 陽性の軸索も損傷部に存在した。これは、上行性軸索の再生を示す。

(d) 移植した骨髄間質細胞の運命

髄液経由で移植された骨髄間質細胞は、移植1週後に少数が損傷部内に見られた。また脳室脈絡叢、脊髄表面などにも付着していた。しかし、2週間には全く見られなかった。骨髄間質細胞は、初期は脊髄組織とその周辺部に生存するが、間もなく消失するものと考えられる。

(e) 骨髄間質細胞を移植された髄液の効果

骨髄間質細胞を移植したラットから、移植2

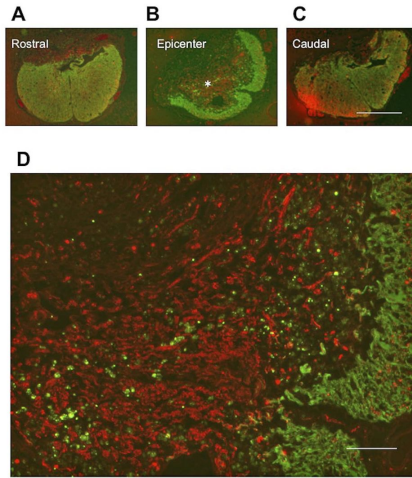


図1. 第2群、移植開始4週後。緑:アストロサイ、赤:軸索、DはBの一部を拡大。

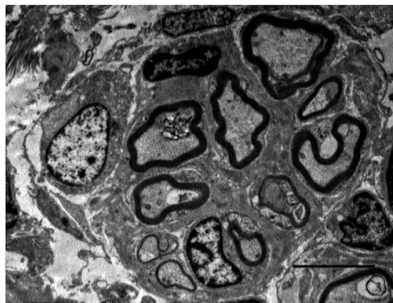


図2. 第3群。移植開始4週後。末梢性の再生神経の束

日後と7日後に髄液を採取してニューロンの生存と突起伸張効果を調べた。移植2日後の髄液では、ニューロンの生存は、移植群と対照群で、それぞれ 46.4 ± 3.5 と $23.0 \pm 2.7/0.25 \text{ mm}^2$ であった。また、突起の伸張は、それぞれ 14.1 ± 2.3 と $9.0 \pm 1.5/\text{neuron}$ であった。ニューロンの生存および突起伸張いずれも有意の差があった。移植後7日の髄液では明らかな差は見られなかった。

(f) 歩行の回復

BBB スコアによる歩行の判定によって、いずれの群でも対照群に比して有意に高い値であった(図3)。1群では、移植前の 1.4 ± 0.4 から 9.0 ± 1.0 に、対照群では 0.5 ± 0.3 から 3.0 ± 0.5 に回復。2群では、 3.0 ± 1.5 から 10.9 ± 2.2 に、対照群では 3.5 ± 1.5 から 5.0

± 2.1 に回復。3群では、 3.5 ± 1.5 から 10.2 ± 1.0 に、対照群では 4.0 ± 1.5 から 5.1 ± 1.7 に回復。

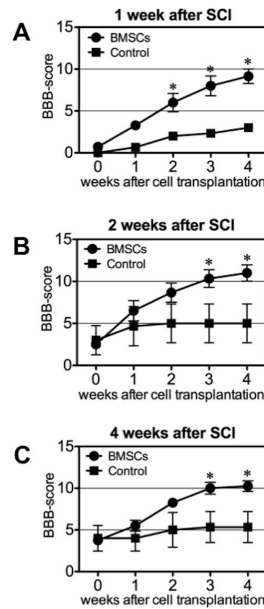


図3. BBB スコア

これらの結果は、骨髄間質細胞の髄液移植は亜急性期、慢性期のいずれでも有効であることを示している。髄液経由の移植であるので、臨床的には腰椎穿刺によって、投与の回数を増やすことが出来る。アストロサイト非存在領域の形成とその中を無数の再生軸索が伸びてきている所見は注目に値する。

(2) 骨髄単核細胞の移植

この実験は以前行った実験の再試になるが、結果は以前のものと同じであった (Yoahihara et al. J Neurotrauma, 2007)。行動の回復、組織的な修復が明らかであった。この細胞も生着することはないが、神経栄養的な働きをすることが考えられた。

この結果は、臨床的に骨髄を採取して単核細胞を分離し、培養という手順を経ないで移植ができることを示している。この方法の臨床応用を論文に発表した(雑誌論文)。

(3) 脈絡叢上皮細胞の移植

脈絡叢上皮細胞はGFPトランスジェニックSDラットの脈絡叢から培養した。 $5 \times 10^5/30 \mu\text{l}$

の細胞を、損傷部、それより頭側、尾側の3カ所にそれぞれ10 μ Lずつ注入した。移植2日、1週、3週4週でラットの行動の回復と移植細胞の生存を調べた。行動の回復は明らかに対照群より有意に改善した。また、移植細胞は少なくとも2週までは生存して宿主脊髄組織内に組み込まれていた。特質すべきは、再生軸索が移植細胞に沿って伸びていることである。脈絡叢上皮細胞は神経系由来の細胞であるので、脊髄に組み込まれて再生軸索の支持細胞としての働きをするのではないかと考えられる。この研究は現在進行中である。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計10件)

Suzuki Y, Ishikawa N, Omae K., Hirai T, Ohnishi K, Nakano N, Nishida H, Nakatani T, Fukushima M, and Ide C: Bone marrow-derived mononuclear cell transplantation in spinal cord injury patients by lumbar puncture. Restor Neurol Neurosci (in press) 2014 (査読有)

Nakano N, Nakai Y, Seo TB, Homma T, Yamada Y, Ohta M, Suzuki Y, Nakatani T, Fukushima M, Hayashibe M, Ide C: Effects of bone marrow stromal cell transplantation through CSF on the subacute and chronic spinal cord injury in rats. PLoS ONE 8 (9): e73494. doi: 10.1371/journal.pone.0073494, 2013 (有)

Hayashibe M, Hashimoto H, Abe S, Ozawa, K, Ide C: Effects of locomotor training on the functional recovery from the spinal cord injury. Aino Journal 11:39-50, 2012

Tamura K, Harada Y, Nagashima N, Itoi T, Ishino H, Yogo T, Nezu Y, Hara Y, Suzuki Y, Ide C, Tagawa M: Autotransplanting of bone marrow-derived mononuclear cells for complete cases of canine paraplegia and loss of pain perception, secondary to intervertebral disc herniation. Exp Clin Transplant 10(3):263-272, 2012 (有)

Saito F, Nakatani T, Iwase M, Maeda Y, Murao Y, Suzuki Y, Fukushima M, Ide C: Administration of cultured autologous bone marrow stromal cells into cerebrospinal fluid in spinal injury patients: a pilot study. Restor Neurol Neurosci 30(2):127-136, 2012(有)

Nishida H, Nakayama M, Tanaka H, Kitamura M, Hatoya S, Sugiura K, Harada Y, Suzuki Y, Ide C, Inaba T: Safety of autologous bone marrow stromal cell transplantation in dogs with acute spinal cord injury. Vet Surg. 41(4):437-442. 2012(有)

Nishida H, Shoji Y, Nakamura M, Hatoya S, Sugiura K, Yamate J, Kuwamura M, Kotani T, Nakayama M, Suzuki Y, Ide C, Inaba T: Evaluation of methods for cell harvesting and the biological properties at successive passages of canine bone marrow stromal cells. Am J Vet Res. 3(11): 1832-1840. 2012 (有)

Homma T, Nakano N, Yamada Y, and Ide C: Choroid Plexus -with special reference to neuroprotective function- Aino Journal 10:33-43, 2011

Nishida H, Nakayama M, Tanaka H, Kitamura M, Hatoya S, Sugiura K, Suzuki Y, Ide C, Inaba T: Evaluation of

transplantation of autologous bone marrow stromal cells into the cerebrospinal fluid for treatment of chronic spinal cord injury in dogs. Am J Vet Res.72(8):1118-23, 2011 (有)
Nakai Y, Nakano N, Seo TB, Yamada Y, Noda T and Ide C: Bone marrow stromal cell transplantation in spinal cord injury. in Advances in Medicine and Biology Vol.21 (Nova Science Publishers, NY.) 201-208, 2011(有)

[学会発表](計8件)

兼清健志、本間玲実、中野法彦、松本直也、井出千束: 骨髄間質細胞により発現が誘導される脈絡叢上皮細胞由来の神経再生因子の同定、第119回日本解剖学会総会全国学術集会、2014年3月27-29日、自治医科大学キャンパス

中野法彦、兼清健志、本間玲実、井出千束: ラット骨髄間質細胞培養上清の投与による神経再生に対する効果、第13回日本再生医療学会総会、2014年3月4-6日、京都国際会館

井出千束: 脊髄損傷に対する骨髄間質細胞を用いた基礎的研究、TRI10周年記念シンポジウム、2014年1月19日、JA 共済ビル カンファレンスルーム

本間玲実、中野法彦、井出千束: 骨髄間質細胞の培養メディアムによる脊髄損傷ラットに対する行動回復効果、第36回日本神経科学大会 (Neuro2013)、2013年6月20-23日、京都国際会館

中野法彦、本間玲実、井出千束: ラット骨髄間質細胞を用いた神経再生の解析、第85回日本生化学会大会、2012年12月14-16日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

中野法彦、中井吉保、本間玲実、井出千束: 脊髄損傷モデルラットにおける骨髄間質細胞の脳脊髄液中への投与の効果、第35回日本神経科学大会 (Neuro2012)、2012年9月18-21日、名古屋国際会議場
中野法彦、本間玲実、井出千束: ラット骨髄間質細胞の移植による脊髄損傷への効果、第11回日本再生医療学会総会、2012年6月12-14日、パシフィコ横浜
中野法彦、中井吉保、井出千束: 脊髄損傷に対するラット骨髄間質細胞の効果の解析、第34回日本神経科学大会、2011年9月14-17日、パシフィコ横浜

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井出千束 (IDE Chizuka)
藍野大学・医療保健学部・教授
研究者番号: 70010080

(2) 研究分担者

山田 義博 (YAMADA Yoshihiro)
藍野大学・医療保健学部・教授
研究者番号: 30252464

中野法彦 (NAKANO Norihiko)
藍野大学・再生医療研究所・准教授
研究者番号: 40322721

(3) 連携研究者

出澤 真里 (DEZAWA Mari)
東北大学・医学部・教授
研究者番号: 50272323

谷口 直之 (TANIGUCHI Naoyuki)
大阪大学・産業科学研究所・名誉教授、特任教授
研究者番号: 90002188

鈴木 義久 (SUZUKI Yoshihisa)
財団法人田附興風会・北野病院第三研究部・形成外科部長、京都大学医学部臨床教授
研究者番号: 30243025