

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659685

研究課題名(和文)軸索再生効果の高い嗅神経鞘細胞の誘導と移植用三次元デバイスの開発

研究課題名(英文)Development of implantable three-dimensional device with the induction of olfactory ensheathing cells with high axonal regeneration effect

研究代表者

森脇 崇(moriwaki, takashi)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20591019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：嗅粘膜は神経幹細胞、嗅神経鞘細胞(olfactory ensheathing cell(OEC))などを含み、脊髄損傷治療に於いて、有力な細胞供給源の一つである。多くの研究では嗅粘膜から単離したOECの神経軸索伸長促進作用についての報告にはらつきがある。その一因に、単離したOECのみでなく、嗅粘膜に含まれる他の細胞との相互作用がある。そこで、嗅粘膜を構成する嗅上皮(olfactory epithelium(OE))、嗅粘膜固有層(lamina propria(LP))を分離し、軸索との相互作用の違いを検討した結果、LP内のOECに発現するPSA-NCAMが軸索との直接相互作用に関与することが示された。

研究成果の概要(英文)：Including neural stem cells, olfactory ensheathing cells (olfactory ensheathing cell and (OEC)), and in the spinal cord injury treatment, olfactory mucosa is one of the leading cell source. There is variation in the reports of neurite outgrowth-promoting effect of OEC isolated from the olfactory mucosa in many studies. To the cause, not only OEC isolated, there is interaction with other cells that are included in the olfactory mucosa. As a result of separating the olfactory epithelium (olfactory epithelium) that make up the olfactory mucosa (OE), olfactory mucosa lamina propria (lamina propria the (LP)), we examined the difference in the interaction with the axon, PSA-which is expressed in the OEC of LP in that NCAM is involved in direct interaction with the axon has been shown.

研究分野：脊髄損傷

科研費の分科・細目：挑戦的萌芽研究

キーワード：脊髄損傷 嗅粘膜移植法 新生再生

1. 研究開始当初の背景

外傷や虚血などにより、脊髄に不可逆的な損傷が及ぶと運動障害は終生続き、大きく QOL が損なわれる。また、医療、介護面における社会的負担も多大である。

近年、脊髄損傷に対してさまざまな細胞や薬剤を用い神経再生の基礎研究が盛んに行われている。iPS 細胞から神経細胞を分化させるアプローチは有望ではあるが、ヒト臨床では、ドナー由来の iPS 細胞樹立に長時間かかることから、allogeneic とせざるを得ず、免疫抑制剤の継続投与が必要となるなど、依然ハードルが高い。

嗅粘膜組織は、終生にわたって神経が再生されることから、その高い神経再生支持能力が注目されてきた。また、ドナー本人からきわめて容易に採取でき、免疫抑制の必要が無く、倫理的・技術的問題が少ない。Lima et al は慢性期の脊髄損傷患者に自家嗅粘膜移植を行い、下肢運動機能の改善を報告した。申請者らのグループでも、10 年以上にわたる完全麻痺の慢性期脊髄損傷患者への自己嗅粘膜組織の移植を行い、一定の機能回復を見ている。

一方、移植された嗅粘膜組織に対し、ホストの神経軸索がどのように相互作用するかは必ずしも明らかでない。ラット脊髄損傷モデルに移植した嗅粘膜組織中にホストから軸索の進入が一部みられるものの、嗅粘膜細胞やその構造との関連は直接観察されていなかった。

また、単離した嗅粘膜鞘細胞(OEC)の移植もマウス、ラットの脊髄損傷モデルで検討されてきたが、その効果や移植後の細胞の生存は報告によってばらつきがあった。

そこで本研究では、単離した OEC と神経軸索との相互作用に関与する分子の探索、および臨床と同様、細胞を単離せず、組織のままの嗅粘膜を後根神経節と共培養し、in vitro で嗅粘膜内の細胞と伸長軸索の相互作用を検討するモデル系による相互作用の検討を行った。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでに各種細胞を播種した三次元ゲルと大脳皮質スライスによる“三次元ゲル共培養系”により、伸長軸索の定量解析システムを確立し以下を見出した。ゲル中の OEC は、表面で astrocyte 型(A 型)と Schwann 型(S 型)の両型を呈し、A 型は互いに接着して flat 面を構成し、そこに軸索が多数伸長する。ゲル内では OEC が S 型となり、長いプロセスに沿って軸索が伸長した。これらの結果は OEC の多型性が伸長軸索の数密度と長さに影響することを示唆する。そこで本研究では、S 型と A 型を誘導する細胞外基質を検討し、またこれらの型で発現が異なる分子を検討することを目的とした。

次に OM の組織について、含まれる細胞が異なる層をそれぞれ剥離し、部分組織培養を行

った。OM は神経幹細胞や支持細胞を含む嗅上皮(olfactory epithelium: OE)と、軸索およびそれを束化する OEM から構成される嗅粘膜固有層(Lamina propria: LP)からなる。これらを剥離して、それぞれどのような因子を遊離し、ガイダンス効果を示すか、その分子機構を組織化学的観察・抗体処理・ELISA で明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 嗅神経鞘細胞(OEC)の単離培養

8 週齢のラット()より嗅粘膜を採取し、細切後、コラゲナーゼと Dispase を含む溶液中で処理し、OEC を含む分画を採取した。MACS により、p75 を発現している OEC を単離した。poly-L-lysine(PLL)あるいは Matrigel をコーティングした well 中で OEC を培養した。

(2) 免疫染色

2% paraformaldehyde で固定後、NCAM, L1CAM, sema3A, EDG2(LPAR)に対する抗体で免疫染色を行った。

(3) real time PCR

96well で PLL coating あるいは Matrigel coating 上で培養した細胞を用い、NCAM, L1CAM, sema3A, EDG2(LPA2)の mRNA 発現量を比較した。

(4) 嗅粘膜(OM)、嗅上皮(OE)、固有層(LM)の分離と後根神経節(DRG)との共培養

成体ラット鼻中隔から嗅粘膜を分離した。Dispase 処理により、顕微鏡下でピンセットを用いて OE と LP に剥離したのち細片とした。

8 週齢ラット()より、脊髄由来後根神経節(DRG)を分離し、OM あるいは、OE、あるいは LP とともにセルカルチャーインサート上に置き、コラーゲンゲル中で培養した。培養 7 日目に固定し、軸索を抗ニューロフィラメント抗体で免疫染色し、DRG からの伸長軸索の本数・長さを image-J を用いて計測した。

(5) 可溶性因子の軸索伸長に対する効果の比較
DRG をセルカルチャーインサートの中央に置き、周囲を 4 つのエリアに分割し、OM あるいは OE あるいは LP の移置切片をいずれか 1 つのエリアに置いて、コラーゲンゲル中で 7 日間培養した。固定後抗ニューロフィラメント抗体で軸索を染色し、4 つのエリア毎に軸索の総伸長を image-J で計測した。

可溶性因子の効果調べるため、培養中に抗 NGF 抗体、抗 BDNF 抗体、抗 NT3 抗体、およびこれらの混合、抗 VEGF 抗体、あるいはコントロール Ig を添加して培養した。

(6) 神経栄養因子の定量

培養上清中の神経栄養因子 NGF, VEGF は培養上清を 0、3、5、7 日目に採取し、ELISA で測定した。

(7) 細胞接着因子の阻害

嗅粘膜上の細胞接着因子の作用を阻害するために、抗 NCAM あるいは抗 L1CAM 存在

下で培養を行った。
PSA-NCAM のポリシアル酸を切断するために、培養 3, 5 日目に endoneuraminidase (Endo-N) をゲル上に添加した。

4. 研究成果

(1) OEC 形態の 2 型性と発現分子

当グループではこれまで、OEC が形態により神経軸索との相互作用が変化することを三次元培養系で見出してきた。本研究では、OEC がアストロサイト型とシュワン細胞型への変化にかかわる分子の検討を平面培養系で行った。

培養の際、poly-L-lysine(PLL)コーティングの場合、Matrigel コーティングに比べ、OEC が A 型となる割合が増加することが示された。(図 1) また免疫染色により形態による発現に差がある分子を探索し、細胞接着分子 NCAM, L1CAM, 軸索ガイダンス関連蛋白 sema3A, LPA 受容体である EDG2 が S 型でやや多く発現することが示唆された。そこで両培養条件における遺伝子発現をリアルタイム PCR で定量した結果、PLL コーティング培養では細胞接着分子 NCAM および LPA 受容体の発現が Matrigel 上に比べて高かった。一方、L1CAM は Matrigel 上でやや高く、sema3A においては差がなかった。(図.2)

LPA は成長因子 VEGF の産生や OEC の遊走性

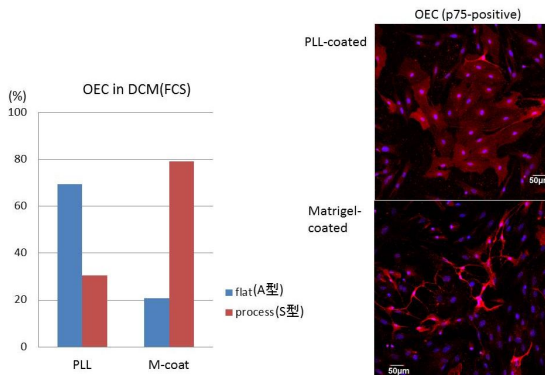


図 1. OEC 形態と細胞外マトリックス

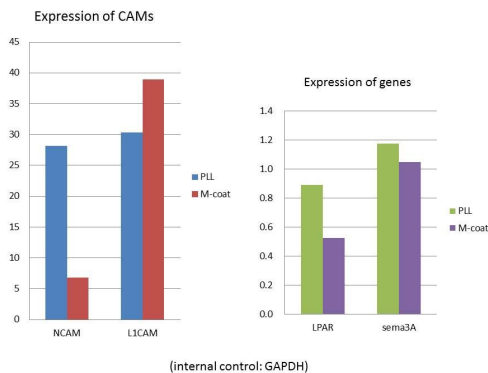


図 2. 細胞外マトリックスと発現分子の比較

を制御する因子であり、LPA 添加による上記遺伝子発現の変化を調べたところ、PLL コーティング上では LPA 添加で NCAM の発現が低下し Matrigel 上と同程度になった。一方、Matrigel 上では L1CAM の発現が増加した。LPA 添加により、PLL 上では遊走性が高まり、Matrigel 上では逆に接着性が高まる可能性が示唆された。

(2) 嗅粘膜の組織培養系による神経軸索伸長効果の検討

細胞外マトリックスの評価対象として、完全合成自己集合ペプチドゲルの評価を行った結果、OEC、Schwann 細胞、神経系細胞の増殖性が高くなく、また細胞質の形態にも通常と異なるパターンがみられることがわかり、単離細胞を用いた移植への適合性が低いと判断された。そこで、移植実験の方向性を再検討し、嗅粘膜組織の構造を保った状態での評価を行った。移植医療においては、細胞を単離培養して組織内へ注入することが多く行われているが、コンタミネーションを防ぎ迅速な治療のためには、これらの過程を経ずに自家由来組織を直接移植することが望ましい。自家由来 OM の組織切片を直接移植は、上記に加え、OM 本来の構造が軸索伸長のスキャホールドなる可能性を有している。よって、OM の構造を保持したまま、神経伸長の誘導や軸索ガイダンス効果が見られるか否かを、in vitro の 3 次元培養で検討した。

OM, OE, LP への DRG 軸索の誘引

DRG からの軸索は、OM, LP あるいは OE に向かって伸長した。OM, LP は強い誘引性を示した。軸索は OM あるいは LP 内の OEC の配列構造に沿って伸長し、組織を乗り越えてさらに延伸した(図 3)。レーザー共焦点顕微鏡による観察で、軸索が LP 内部に進入していることが示された。

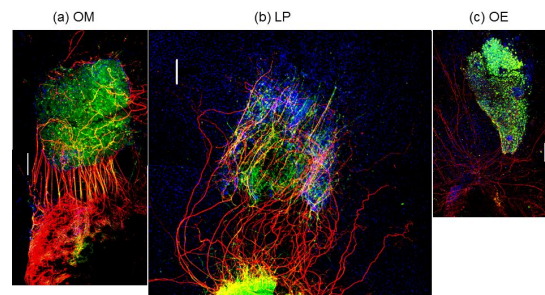


図 3. OM, LP, OE 上に伸長する軸索
赤: ニューロフィラメント、緑: p75、
青: DAPI、bar:200 μm

LP による軸索伸長誘導

DRG 周囲を 4 エリアに分け、異なるエリアに LP を置いて共培養すると、LP の存在するエリアに集中して軸索が伸長した(図 4)。この軸索伸長は、外液に NT-3 抗体あるいは抗 NGF、

NGF 抗体を添加すると阻害された。抗 BDNF 抗体、抗 VEGF 抗体は有意な阻害を示さなかった (図 5)。

培養上清の ELISA から、NGF, VEGF が遊離されることが確認された。NT-3 は測定限度以下であった。

これらの結果から、LP が可溶性因子である NT-3、NGF を産生・遊離し、これらが神経軸索の伸長を促進すること、NT-3 は低濃度でも強い誘引作用を持つことが示唆された。

細胞接着因子の関与

OEC 表面には L1CAM, PSA - NCAM 等数種の細胞接着因子が発現していることが報告されている。LP 内の OEC と軸索の相互作用に与する分子を推測するため、抗 L1 CAM 抗体あるいは抗 PSA-NCAM 抗体存在下で共培養を行った。その結果、抗 PSA-NCAM 抗体で処理した LP 上には軸索が伸長しなかった (図 6)。

Endo-N 処理により、PSA-NCAM 上のポリシアル酸を除去すると、LP 内に伸長する軸索の総数は Endo-N の濃度依存的に減少した。

このことから、OEC と伸長軸索の直接相互作用に PSA-NCAM が関与していることが示唆された。

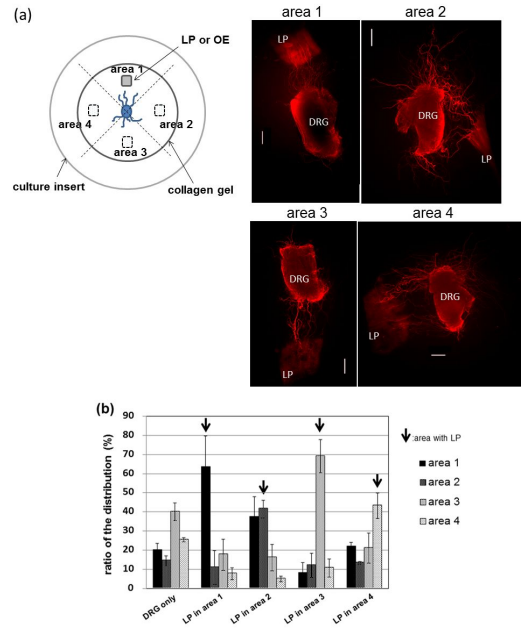


図 4. LP の軸索伸長誘引

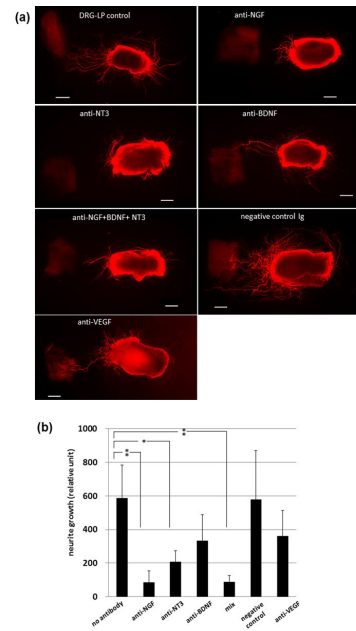


図 5 . 可溶性増殖因子の抗体添加による伸長阻害

(a) DRG からの軸索伸長 (b) 外液に添加した抗体と軸索伸長量
bar: 500 μm

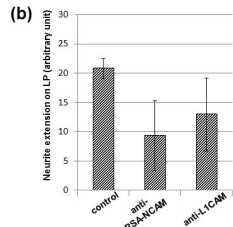
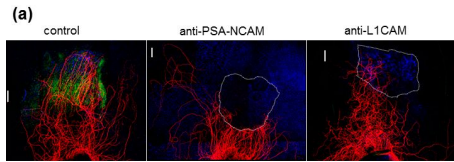


図6．細胞接着因子の抗体で処理したLPと軸索伸長

(a) 抗PSA-NCAM抗体、あるいは抗L1CAM抗体存在下でLPとDRGを共培養した。赤：ニューロフィラメント、緑：p75、青：DAPI、

(b) LP内の軸索の定量評価

bar: 200 um

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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

森脇 崇 (Moriwaki Takashi)

大阪大学医学部附属病院・医員

研究者番号：20591019

(2)研究分担者

吉峰 俊樹 (Yoshimine Toshiki)

大阪大学脳神経外科教授

研究者番号：00201046

(3)連携研究者

岩月 幸一 (Iwatsuki Koichi)

大阪大学脳神経外科講師

研究者番号：80346204

梅垣 昌士 (Umegaki Masao)

大阪大学脳神経外科特任研究員

研究者番号：30448063

石原 正浩 (Ishihara Masahiro)

大阪大学脳神経外科特任研究員

研究者番号：533803

大西 諭一郎 (Ohnishi Yuichiro)

大阪大学脳神経外科医員

研究者番号：533811