

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：23701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659729

研究課題名（和文）

脊髄損傷修復作用をもつヒト型間質系幹細胞の樹立とその医学的応用

研究課題名（英文）

Establishment and medical application of human mesenchymal stem cells with spinal cord injury repair action

研究代表者

古川 昭栄 (FURUKAWA SHOEI)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90159129

研究成果の概要（和文）：

以前、ラットの脊髄損傷部に塩基性線維芽細胞成長因子（FGF-2）を投与すると、脊髄由来の間質系細胞（FIF）が増殖し運動機能が著明に回復することを見出した。この効果は増殖した FIF 細胞によると考えられたので、ラットと同様の方法で霊長類の脊髄組織内に FIF 様の活性を持つ細胞の探索を行った。その結果、サル脊髄組織から FIF 様の形態を持つ細胞を誘導できたので同細胞をラット脊髄損傷部へ移植したが顕著な運動機能回復は認められなかった。しかし、特別な培養処理を施したヒト歯髄細胞を移植すると FIF に匹敵する修復効果を示すことを見出した。この成果は歯髄細胞の応用の可能性を強く示唆している。

研究成果の概要（英文）：

In previous study, we have shown that the locomotor functions of the rats are improved after complete transection of the spinal cord, when FGF-2 is directly injected into the spinal cord immediately after transection. A massive tissue composed of FGF-2-induced fibronectin-positive cells (FIFs) had appeared and filled large cystic cavities, into which numerous axons penetrated and through which they coursed. In this study, we have examined the possible existence of FIF-like cells in the primate tissues. We found that the transplantation of human dental pulp cells but not those of FIF-like cells derived from monkey spinal cord improved the locomotor functions of the rats after complete transection of the spinal cord.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：脊髄損傷、軸索再生、運動機能回復、脊髄由来間質系幹細胞、FIF 細胞、細胞移植

1. 研究開始当初の背景

脊髄に損傷を受けると上、下行性の連絡線維が途切れ、下位の運動・知覚機能が失われる。我が国では毎年 6 千人の受傷者があり、脊髄損傷の総患者数は約 11 万人である。脊髄を含む中枢神経系では、損傷した神経軸索を再生することは困

難であり、完治はおろか一部の機能回復すら望めない。抜本的治療法の開発が望まれる中、国内外の研究で 1) ES 細胞由来の神経細胞、神経幹細胞や骨髄性間質系幹細胞の移植（細胞療法）、2) 神経突起伸展を抑制する Nogo やセマフォリ

ン3Aの阻害物質の投与(化学療法)などの効果が報告された(Bradburgら Nature 2002; Tengら PNAS, 2002; Urdzkovaら J Neurotrauma 2006)。しかし、モデル動物に部分的な軸索再生を促すものの運動機能の顕著な改善は認められておらずヒトへの応用には程遠いのが実状である。

我々は以前、ラットの脊髄損傷部に塩基性線維芽細胞成長因子(FGF-2)を投与するとフィブロネクチン陽性の線維芽細胞(FGF-2-inducible fibronectin-positive cells; FIF細胞)が増殖し、運動機能が回復することを見出した。さらに、FIF細胞を培養下で増やして移植するとより顕著に運動機能が改善されることを示した(Kasaiら J Neurotrauma, 2010)。この方法はこれまでのどの方法より機能的回復が顕著であったので、細胞調製法とその効果の特許出願した(特許公開 2010-172281: 本学機関承継)。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト型のFIF様細胞を樹立し、その細胞移植による脊髄損傷治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) サル脊髄からのFIF様細胞の樹立: ヒトの脊髄内にFIF様細胞が存在するかどうかは脊髄損傷治療法の確立に必要な情報である。しかしヒトの脊髄を用いるのは不可能なためサルを用いて検討した。サルの脊髄は京都大学霊長類研究所との共同研究により提供を受けた。ラット脊髄と同様にサル脊髄をスライス培養して遊走する細胞を継代培養で増やしラットの脊髄損傷部位に移植した。運動機能はBBBスケールで評価した。

(2) ヒトのFIF様細胞について: ヒトのFIF様細胞を樹立できれば有力な治療法へと発展する可能性がある。本研究では当初は、ヒトiPS細胞からのFIF細胞の樹立を計画していたが、その過程で、ヒトの歯髄細胞がFIF細胞に類似の間葉系細胞の性質を持つことを見出し、基本培地で増殖させた細胞をラットの脊髄損傷部位に移植した。運動機能はBBBスケールで評価した。

4. 研究成果

ラット脊髄組織からFIF細胞を誘導する手法によりサル脊髄からの培養を試みたところ、ラットFIF細胞と形態的に類似する細胞が得られた。このサル脊髄組織由来のFIF様細胞をラットの脊髄損傷部位に移植したと

ころ、損傷部位の空洞化は抑制されたが、運動機能の回復効果は認められなかった。ラットFIF細胞に比べると、サルFIF様細胞は、(1) 増殖速度が遅い、(2) 組織からの遊走に長時間を要する、(3) 継代回数を経ないうちに扁平化する細胞が多い、などの違いが認められた。すなわち、形態学的に類似の細胞はサルの脊髄組織から誘導可能であるが、同じ機能を有するかどうかは不明でありさらに検討が必要である。

本研究では当初「iPS細胞を効果的に誘導できるヒト細胞としての歯髄細胞の利用」を考えていたが、予備実験によりヒト歯髄細胞そのものが、(1) FIF細胞に類似の遺伝子発現パターンを示すこと、(2) 歯髄細胞を基本培地で培養した後、脊髄損傷モデルラットに移植すると、顕著な運動機能回復作用を示すことを明らかにした。この知見をさらに検証し、以下の成果を得た。(1) 歯髄細胞の性質はドナーによって異なり、治療効果にも違いがあること、(2) 特殊な培養法により歯髄細胞の均質性を高めた細胞はオリジナル細胞に比べて高い運動機能回復効果をもつこと、(3) 特殊な培養によって細胞の特性が均一化する、などを明らかにした。

今後、脊髄損傷治療効果と関連する細胞特性が明らかになれば、移植する細胞の質保障のための重要な情報を提供できるものと期待している。

4. 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16件)

1) Hara T, Fukumitsu H, Soumiya H, Furukawa Y, Furukawa S, Injury-induced accumulation of glial cell line-derived neurotrophic factor in the rostral part of the injured rat spinal cord. Int J Mol Sci, 査読有, 13, 13484-13500, 2012, doi: 10.3390/ijms131013484.

2) Tanaka Y, Fukumitsu H, Soumiya H, Yoshimura S, Iwama T, Furukawa S. 2-Decenoic acid ethyl ester, a compound that elicits neurotrophin-like intracellular signals, facilitating functional recovery from cerebral infarction in mice. Int J Mol Sci, 13, 4968-4981, 2012, doi: 10.3390/ijms13044968.

3) Fukumitsu H, Soumiya H, Furukawa S. Knockdown of pre-mRNA cleavage factor Im 25kDa promotes neurite outgrowth. Biochem Biophys Res Commun, 425, 848-853, 2012,

doi:10.1016/j.bbrc. 2012.07.164. Epub 2012 Aug 7.

4) Kasai M, Fukumitsu H, Soumiya H, Furukawa S. Caffeic acid phenethyl ester reduces spinal cord injury-evoked locomotor dysfunction. *Biomed Res*, 32, 1-7, 2011.

5) Soumiya H, Fukumitsu H, Furukawa S. Prenatal immune challenge compromises development of upper-layer but not deeper-layer neurons of the mouse cerebral cortex. *J Neurosci Res*, 89, 1342-1350, 2011. doi: 10.1002/jnr.22636. Epub 2011 Jun 14.

6) Soumiya H, Fukumitsu H, Furukawa S. Prenatal immune challenge compromises the normal course of neurogenesis during development of the mouse cerebral cortex. *J Neurosci Res*, 89, 1575-1585, 2011. doi: 10.1002/jnr.22704. Epub 2011 Jul 5.

7) Ito S, Nitta Y, Fukumitsu H, Soumiya H, Ikeno K, Nakamura T, Furukawa S. Antidepressant-like activity of 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, a unique unsaturated fatty acid of royal jelly, in stress-inducible depression-like mouse model. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012:139140, 2012; Epub 2011 Jul 24.

8) Nishina A, Kimura H, Kozawa K, Sommen G, Nakamura T, Heimgartner H, Koketsu M, Furukawa S. A superoxide anion-scavenger, 1,3-selenazolidin-4-one suppresses serum deprivation-induced apoptosis in PC12 cells by activating MAP kinase. *Toxicol Appl Pharmacol*, 257, 388-395, 2011

9) Nishina A, Kimura H, Kozawa K, Sommen G, Favero F, Heimgartner H, Koketsu M, Furukawa S. 3-(2,6-Dimethylphenyl)-2-selenoxo-1,3-thiazolidin-4-one suppresses hydrogen peroxide-induced cytotoxicity on PC12 cells via activation of MAPK. *Int J Toxicol*, 30, 690-699, 2011

10) Furukawa Y, Urano T, Minamimura M, Nakajima M, Okuyama S, Furukawa S. 4-Methylcatechol-induced heme oxygenase-1 exerts a protective effect against oxidative stress in cultured neural stem/progenitor cells via PI3 kinase/Akt pathway. *Biomed Res* 31, 45-52, 2010

11) Kasai M, Jikoh T, Fukumitsu H, Furukawa S. FGF-2-responsive and spinal cord-resident cells improve locomotor function after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2010 Mar 3 [Epub ahead of print]

12) Nakajima H, Uchida K, Yayama T, Kobayashi S, Guerrero AR, Furukawa S, Baba H. Targeted retrograde gene delivery of brain-derived neurotrophic factor suppresses apoptosis of neurons and oligodendroglia after spinal cord injury in rats. *Spine*, 35, 497-504, 2010

13) Kasai M, Fukumitsu H, Soumiya H, Furukawa S. Ethanol extract of chinese propolis facilitates functional recovery of locomotor activity after spinal cord injury. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011;2011. pii: 749627. Epub 2010 Sep 8.

14) Hirakawa A, Shimizu K, Fukumitsu H, Soumiya H, Iinuma M, Furukawa S. 2-Decenoic acid ethyl ester, a derivative of unsaturated medium-chain fatty acids, facilitates functional recovery of locomotor activity after spinal cord injury. *Neuroscience*. 171, 1377-1385, 2010 doi:10.1016/j.neuroscience.2010.10.004. Epub 2010 Oct 8. 2010 Oct 8.

15) Okada M, Makino A, Nakajima M, Okuyama S, Furukawa S, Furukawa Y. Estrogen Stimulates Proliferation and Differentiation of Neural Stem/Progenitor Cells through Different Signal Transduction Pathways. *Int J Mol Sci* 11, 4114-4123, 2010

16) Makino A, Iinuma M, Fukumitsu H, Soumiya H, Furukawa Y, Furukawa S. 2-Decenoic acid ethyl ester possesses neurotrophin-like activities to facilitate intracellular signals and increase synapse-specific proteins in neurons cultured from embryonic rat brain. *Biomed Res*, 31, 379-386, 2010

[学会発表] (計15件)

1) 柴田翔洋ら：コルチコステロン慢性投与によるうつ病モデル動物の作製とそれを用いたデセン酸誘導体の活性評価。日本薬学会第133年会（横浜）平成25年3月30日

2) 影山耕太ら：手がかり学習における脳由来神経栄養因子の役割に関する研究。日本薬学会第133年会（横浜）平成25年3月28日

3) 古川昭榮：プロポリスによる脊髄損傷の修復。第1回ファイトケミカル研究会－機能性食品への展開－（岐阜）、平成25年3月2日

4) 古川昭榮：神経栄養因子シグナルの活性化に基づく新規アルツハイマー病治療薬（新規デセン酸誘導体）。創薬シーズ・基盤技術アラランスネットワーク疾患別商談会（大阪）平成25年2月1日

5) 古川昭榮ら：カフェイン酸フェネチルエステル（CAPE）の抗うつ作用。第3回岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会（岐阜）平成24年12月1日

6) 荒磯ひろみら：生後直後の感覚入力遮断がマウスの社会性行動と情動機能に及ぼす影響。日本病院薬剤師東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2012（岐阜）平成24年11月18日

7) Ushiro D et al.: Amelioration of locomotor dysfunction after spinal cord injury by orally-administered 2-decenoic acid derivatives. 第55回日本神経化学会（神戸）平成24年11月5日

8) 後大輔ら：2-デセン酸誘導体による脊髄損傷修復について。日本薬学会第132年会（札幌）平成24年3月30日

9) 森大輔、古川昭榮：ピーナツ渋皮抽出物の抗うつ様作用。日本農芸化学会2012年度大会（京都）平成24年3月23日

10) 樹下洋輔ら：大豆ソヤサポニンによる脊髄損傷修復。第2回岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会（岐阜）平成23年11月26日

11) 森大輔ら：ピーナツ渋皮抽出物のアルツハイマー病予防作用に関する研究。第2回岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会（岐阜）平成23年11月26日

12) 虎谷厚志ら：PQQの脳内マップキナーゼ活性化作用と抗うつ効果。第2回岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会（岐阜）平成23年11月26日

13) 樹下洋輔ら：大豆成分ソヤサポニンの腹腔内投与による脊髄損傷修復。第84回日本

生化学会（京都）平成23年9月23日

14) Kasai M et al.: FGF-2 induced fibronectin-positive cells retained the potential to repair spinal cord injury through several passages. 第53回日本神経化学会（神戸）平成22年9月3日

15) Itoh S. et al.: Therapeutic effects of soybean isoflavone equol on depression of animal model via the activation of brain MAP kinases. 第53回日本神経化学会（神戸）平成22年9月3日

〔図書〕（計2件）

Furukawa S, Kasai M, Fukumitsu H, Soumiya H, Furukawa Y : Propolis: Implications for the treatment of spinal cord injuries. in “Beneficial effects of propolis on human chronic diseases” Eds : Tahira Farooqui, Akhlaq A. Farooqui, Nova Science Publishers (2012)

古川昭榮、福光秀文、古川美子：5. 増殖因子4) Neurotrophins. 臨床免疫・アレルギー科、サイトカインのすべて、第57巻 特別増刊号 (Suppl. 21) pp.523-530 (2012)

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：PCT出願「トランス-2-デセン酸誘導体及びこれを含有する医薬」
発明者：飯沼宗和、古川昭榮
権利者：中部TLO
種類：PCT/JP
番号：PCT/JP2011/075228
出願年月日：平成23年11月1日
国内外の別：国際出願

○取得状況（計3件）

名称：トランス-2-デセン酸誘導体及びこれを含有する医薬
発明者：飯沼宗和、古川昭榮、内木充、松元智規、杉本八郎
権利者：中部TLO、日本臓器株式会社
種類：特願2012-513796
番号：特許第5044059
取得年月日：平成24年7月20日
国内外の別：国内

名称：抗がん剤による末梢神経障害の予防又は治療剤
発明者：飯沼宗和、古川昭榮、内木充、岡田

智行、松元智規、澤田和好
権利者：中部 TLO、日本臓器株式会社
種類：特願 2012-516241
番号：特許 50009451
取得年月日：平成 24 年 6 月 8 日
国内外の別：国内

名称：鎮痛剤
発明者：飯沼宗和、古川昭栄、内木充、岡田
智行、松元智規、澤田和好
権利者：中部 TLO、日本臓器株式会社
種類：特願 2012-516240
番号：特許 5009450
取得年月日：平成 24 年 6 月 8 日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ

http://www.gifu-pu.ac.jp/research/research_bunsei.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 昭栄 (FURUKAWA SHOEI)
岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：90159129

(2) 研究分担者

福光 秀文 (FUKUMITSU HIDEFUMI)
岐阜薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：00308280

宗宮 仁美 (SOURIYA HITOMI)
岐阜薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：20548713