

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 4 月 10 日現在

機関番号：13401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791631
 研究課題名（和文） 脊髄損傷に対する骨髄間質細胞移植の有効性・機序および併用療法に関する基礎的研究
 研究課題名（英文） The effects and mechanism of bone marrow stromal cells for spinal cord injury
 研究代表者
 中嶋 秀明（NAKAJIMA HIDEAKI）
 福井大学・医学部・助教
 研究者番号：10397276

研究成果の概要（和文）：

BMSCは移植後1週では損傷部周囲に分布し、5週ではPKH26でlabelingされたBMSCは11.9%残存し、損傷部を含めた頭尾側方向に分布がみられた。分布したBMSCは、神経グリア系細胞の間隙に入り込むように存在しており、分化した細胞は確認されなかった。BMSC移植群は、損傷後1週で組織修復作用をもつalternatively activated macrophage (M2 type)の発現上昇(0%→32.2%)および組織障害性作用をもつclassically activated macrophage (M1 type)の発現減少(93.4%→11.7%)、TNF α およびIL-6の発現制御、IL-4およびIL-13の発現上昇がみられ、損傷後1週以降での運動機能の改善、損傷後5週でのcavity areaの縮小、損傷部周辺におけるRT-97、GAP-43の発現上昇がみられた。

研究成果の概要（英文）：

The precise mechanisms through which transplanted MSC attenuate inflammation after SCI are still unclear. The transplanted MSC migrated within the injured spinal cord without differentiating into glial or neuronal elements. MSC transplantation was associated with marked changes in the SCI environment, with significant increases in IL-4 and IL-13 levels reductions in TNF- α and IL-6 levels. This was associated simultaneously with increased numbers of alternatively activated macrophages (M2 phenotype: arginase-1 or CD206-positive) and decreased numbers of classically activated macrophages (M1 phenotype: iNOS or CD16/32-positive). These changes were associated with functional locomotion recovery in the MSC transplanted group, which correlated with preserved axons, less scar tissue formation and increased myelin sparring. Our results suggested that acute transplantation of MSC after SCI modified the inflammatory environment by shifting the macrophage phenotype from M1 to M2, and that this may reduce the effects of the inhibitory scar tissue in the subacute/chronic phase after injury to provide a permissive environment for axonal extension and functional recovery.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

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：骨・脊椎脊髄病学

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷の本邦における患者数は約 10 万人で、さらに毎年 5000 人のペースで増加しており、さらにその多くは若年者が占めている。このことから、脊髄損傷によりいったん出現した重篤な四肢神経麻痺症状を回復させる医療は極めて重要性が高く、近年急速に基礎的研究が進められているが、未だ臨床応用には高い壁が存在する。脊髄再生研究の柱は、①損傷直後の過剰な炎症性サイトカイン発現抑制による神経再生の足場形成、②急性期～亜急性期における神経栄養因子の枯渇に対する補充療法、軸索再生阻害因子の抑制、③亜急性期～慢性期における細胞移植療法、グリア瘢痕組織形成の抑制、などに大きく分けられる。

本研究では、③の細胞移植療法の有効性についての検討を行うことを目的とした。移植材料としては、比較的容易に自家骨より採取可能であり安全性が高いこと、培養技術が確立されていることなどの利点から、脊髄損傷の領域のみならず、多くの領域でその有効性が多数報告されており、臨床応用が期待される骨髄間質細胞 (Bone marrow stromal cell: BMSC) を用いることとした。BMSC を用いた治療法を確立するためには、有効性の機序についてのさらなる科学的検証が必須と考えられる。

2. 研究の目的

Bone marrow stromal cell (BMSC) は、自家移植が可能な安全性の高い材料であるが、その有効性のメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、脊髄損傷モデルに対しヒト骨髄間質細胞移植 (hBMSC) を行い、移植細胞の動態や有効性とメカニズムについて特に急性期における抗炎症効果に注目し検討を行った。

3. 研究の方法

SD rat の第 9 胸椎の椎弓切除を行い、IH impactor 200Kdyne にて脊髄損傷モデルを作成した。Medium $5\mu\text{l}$ を損傷部に注入した rat をコントロールとし比較検討した。損傷後 3 日目に $1 \times 10^6 / \mu\text{l}$ 個の PKH-26 で labelling した hBMSC を損傷部に移植し経時的に評価した。評価項目は、損傷後 1 週・5 週における移植 hBMSC の損傷脊髄内での分布と移植細胞の differentiation の評価、損傷後 1 週における免疫染色および flowcytometry での macrophage の phenotype の変化の評価、Western blotting・ELISA による cytokines 発現の評価、損傷後 5 週における cavity area の評価、再生軸索評価 (RT-97, GAP-43)、経時的な BBB score による運動機能評価とした。

4. 研究成果

移植 BMSC は移植後 1 週では損傷部周囲に分布し、5 週では損傷部を含めた頭尾側方向に分布がみられた (図 1)。

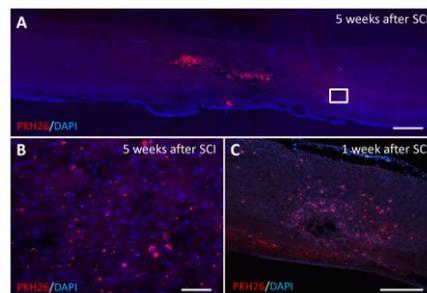


図 1. 移植 BMSC の分布

分布した BMSC は、neuron, oligodendrocyte, astrocyte, microglia それぞれの間隙に入り込むように存在しており、分化した細胞は確認されなかった (図 2)。

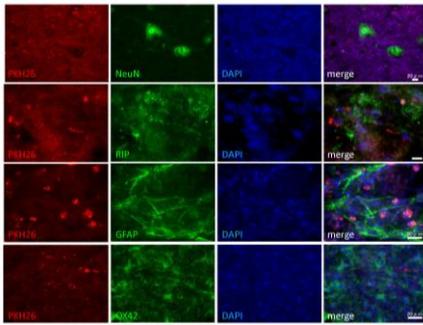


図 2. 移植 BMSC の分化についての評価

BMSC 移植群では、損傷後 1 週で組織修復作用をもつ alternatively activated macrophage (M2 type; arginase-1, CD206 で標識) の発現上昇および組織障害性作用をもつ classically activated macrophage (M1 type; iNOS, CD16/32 で標識) の発現減少が免疫染色 (図 3) および Flow cytometry (図 4) で確認された。

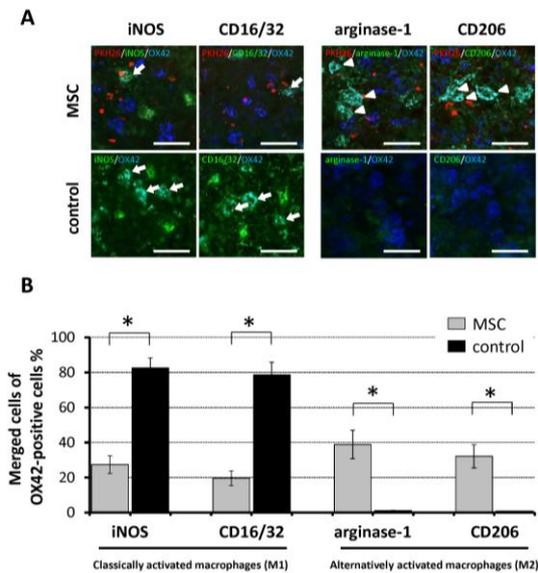


図 3. iNOS, CD16/32, arginase-1, CD206 の BMSC 移植による発現の変化

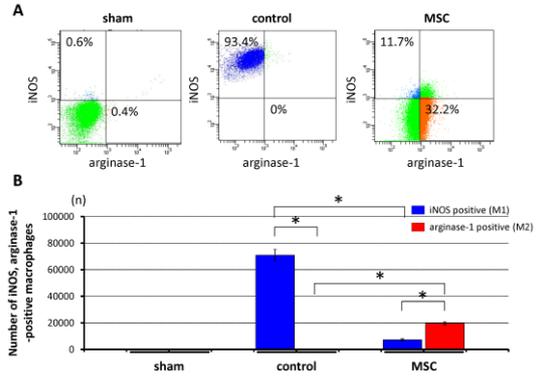


図 4. BMSC 移植後の arginase-1, iNOS の発現変化 (Flow cytometry による評価)

Western blotting による評価では、TNF α および IL-6 の発現制御、IL-4 および IL-13 の発現上昇がみられた (図 5)。

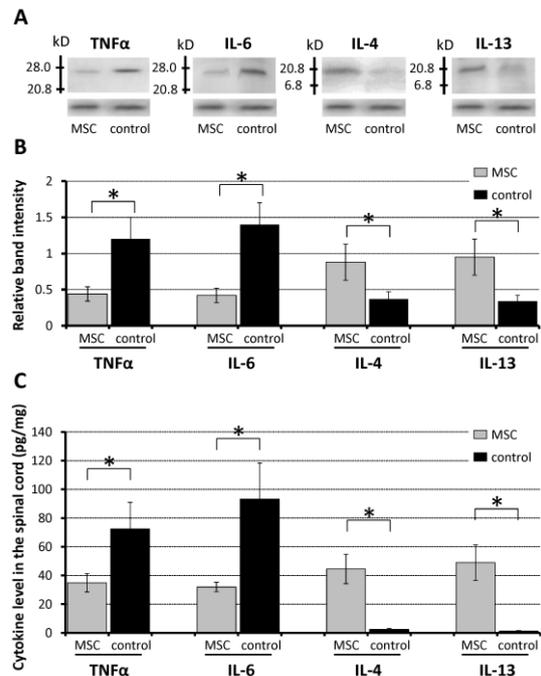


図 5. Western blotting による各サイトカイン発現変化の評価

損傷後 1 週以降での運動機能の改善、損傷後 5 週での cavity area の縮小、損傷部周辺における RT-97, GAP-43 の発現上昇がみられた (図 6, 7)。

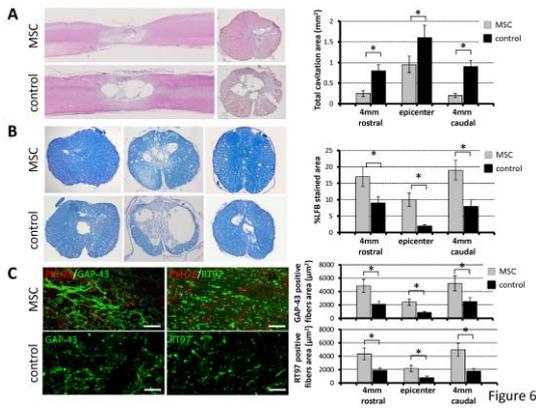


図 6. 組織学的評価、軸索評価

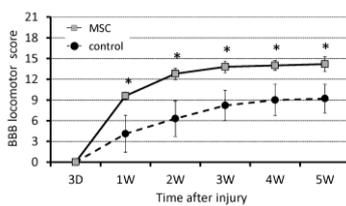


図 7. 運動機能評価

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)

- Guerrero AR, Uchida K, Nakajima H, Watanabe S, Nakamura M, Johnson WE, Baba H. Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice. *J Neuroinflammation* 27:9:40, 2012 doi: 10.1186/1742-2094-9-40. 査読有
- Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, Watanabe S, Sugita D, Takeura N, Yoshida A, Long G, Wright KT, Johnson WE, Baba H. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery

after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 29:1614-1625, 2012

doi: 10.1089/neu.2011.2109 査読有

- Chen KB, Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Hirai T, Guerrero AR, Kobayashi S, Ma WY, Liu SY, Zhu P, Baba H. High-mobility Group Box-1 and Its Receptors Contribute to Proinflammatory Response in the Acute Phase of Spinal Cord Injury in Rats. *Spine* 36: 2122-2129, 2011. doi: 10.1097/BRS.0b013e318203941c. 査読有
- Chen KB, Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Guerrero AR, Kobayashi S, Ma WY, Liu SY, Baba H. Tumor necrosis factor-alpha antagonist reduces apoptosis of neurons and oligodendroglia in rat spinal cord injury. *Spine* 36: 1350-1358, 2011 doi: 10.1097/BRS.0b013e3181f014ec 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, Watanabe S, Takeura N, Yoshida A, Baba H. Transplantation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after spinal cord injury contribute functional recovery and tissue regeneration by promoting alternative pathway of macrophage activation. International Society of Stem Cell Research Annual Meeting 2012. 6.13-16 Yokohama
- Nakajima H, Uchida K, Alexander Rodriguez G, Yayama T, Watanabe S, Baba H. Transplanted bone marrow stromal cells promote functional

recovery, tissue regeneration with production of neuroprotective macrophage after spinal cord injury. The 39th CSRS Annual Meeting, 2011. 12.8-10 Arizona, USA

3. Nakajima H, Uchida K, Chen KB, Hirai T, Alexander Rodriguez G, Sugita D, Baba H. Prevention of the development of inflammatory tissue damage and apoptosis of neurons and oligodendroglia after spinal cord injury by tumor necrosis factor- α antagonist. The CSRS Eurpearn Section Annual Meeting 2011. 6.8-11 Istanbul, Turkey
4. 中嶋秀明、内田研造、Alexander Rodriguez Guerrero、渡邊修司、杉田大輔、竹浦直人、吉田藍、馬場久敏. 骨髄由来間葉系幹細胞移植が脊髄損傷後急性期における macrophage 分画に与える影響. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012. 10.26-27 名古屋
5. 中嶋秀明、内田研造、Alexander Rodriguez Guerrero、渡邊修司、杉田大輔、竹浦直人、馬場久敏. 骨髄間質細胞移植が脊髄損傷後 macrophage の動態に与える影響. 第 85 回日本整形外科学会学術集会 2012. 5.17-20 京都
6. 中嶋秀明、内田研造、Alexander Rodriguez Guerrero、渡邊修司、杉田大輔、竹浦直人、吉田藍、馬場久敏. 骨間質細胞移植が脊髄損傷後微小環境の変化. 第 41 回日本脊椎脊髄病学会学術集会 2012. 4.19-21 久留米
7. 中嶋秀明、内田研造、Alexander Rodriguez Guerrero、渡邊修司、杉田大輔、竹浦直人、吉田藍、馬場久敏. 脊髄損傷に対する骨髄由来 Mesenchymal

Syem Cell 移植の有用性の検討—急性期における macrophage phenotype に与える影響—. 第 30 回日本運動器移植・再生医学研究会 2011. 9.25 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 秀明 (NAKAJIMA HIDEAKI)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：10397276