

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：34441

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24615007

研究課題名(和文)ラット骨髄間質細胞が分泌する神経再生因子の同定

研究課題名(英文)Characterization of neuronal regenerating factors secreted from rat bone marrow stromal cells

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)： 脊髄損傷には現在、根本的な治療法がない。我々は骨髄間質細胞の移植が脊髄損傷の治療に有効であることを報告してきた。本研究では、そのメカニズムを明らかにするため、骨髄間質細胞の分泌する液性因子の解析を行った。まず、新生仔ラットの海馬を用いた神経突起伸長アッセイ法の改良を行った。次に、ラット骨髄間質細胞を培養し、その無血清培養上清を回収した。その培養上清から脊髄損傷からの回復に有効な因子を、神経アッセイを指標にして、液体クロマトグラフィーを組み合わせることで分離精製し、質量分析計を用いて同定を行った。

研究成果の概要(英文)： There are no effective therapies for spinal cord injury (SCI). We have reported that transplantation of bone marrow stromal cells (BMSCs) has beneficial effects on SCI. In the present study, we analyzed trophic factors secreted from BMSCs. At first, we improved the neural bioassay of neurite outgrowth using cultured hippocampal neurons of newborn rats. Next, we collected serum-free conditioned medium (CM) of rat BMSCs. We purified the effective factors on SCI from the CM by combination of liquid chromatographies and identified them using mass spectrometry systems.

研究分野：生化学、神経再生

キーワード：神経再生 骨髄間質細胞 脊髄損傷

1. 研究開始当初の背景

我が国において、脊髄損傷患者は現在約 10 万人に上り、毎年約 5,000 人が新たに受傷している。脊髄損傷は交通事故、転落事故、スポーツ事故などにより比較的若い年代が受傷するため、医療費や介護費など財政的・経済的な問題も抱えている。生命予後は改善されてきているものの、根本的な治療法がないのが現状である。

これまで脊髄をはじめとする中枢神経系は一旦損傷を受けると再生しないと長い間考えられていたが、最近の研究により成人においても神経再生が起こることがわかってきた。そのため中枢神経系の再生促進のメカニズムを明らかにし、それに基づいて脊髄損傷に対する画期的な治療法が開発されることが期待されている。

中枢神経を再生させる方法として、人工多能性幹 (iPS) 細胞、神経幹細胞、脈絡叢上細胞、骨髄間質細胞、嗅神経細胞などの移植が注目されている。胚性幹 (ES) 細胞あるいは胎児由来幹細胞の移植は免疫的あるいは倫理的な観点により問題が多い。一方、骨髄間質細胞の移植は、自己細胞を使うために拒絶反応がなく手技的にも容易であることから、臨床応用されうる可能性が高い。

我々は、これまで脊髄挫滅損傷ラットに培養した骨髄間質細胞を移植し、形態学的および行動学的に著明な回復が見られることを報告してきた (Wu et al. *J Neurosci Res* 2003, Ohta et al. *Exp Neurol* 2004, Ide, Nakano et al. *Brain Res* 2010)。骨髄間質細胞の髄液内注入療法を臨床応用するべく、サルを用いて安全性を確認した後、関西医科大学において 5 例の患者に自家移植を行い、骨髄間質細胞移植が安全かつ有効であることを確かめてきた (Saito et al. *J Trauma* 2008)。

一方、骨髄間質細胞の細胞生物学的あるいは分子生物学な解析は進んでおらず、脊髄再生に対する分子メカニズムは明らかになっていない。移植された骨髄間質細胞は脊髄内で最初は生着するが、2~3 週間後には消失することから、骨髄間質細胞は宿主に組み込まれて効果が発揮するのではなく、細胞から分泌された液性因子によって回復がもたらされると考えられる。骨髄間質細胞は、インスリン様増殖因子-1 (IGF-1)、トランスフォーミング増殖因子-1 (TGF- β 1) や肝細胞増殖因子 (HGF) などを分泌している (Nakano et al. *Neurosci Lett* 2010) が、これらの因子だけでは脊髄再生のすべてを説明することができないため、骨髄間質細胞が分泌する因子の網羅的解析が必要であると考えられる。この因子の精製・同定を行うことにより、神経再生の分子的なメカニズムを明らかにし、骨髄間質細胞移植療法の有効性と安全性を高めることによって、脊髄損傷の有効な治療法の開発に道を拓く。

2. 研究の目的

骨髄間質細胞が分泌する脊髄損傷の再生を促進する因子を明らかにする。

具体的には、ラット骨髄間質細胞の無血清培養上清から、ヘパリンアフィニティー、イオン交換、ゲルろ過、逆相クロマトグラフィーなどの液体クロマトグラフィーを組み合わせ、神経突起伸長アッセイを指標に有効因子の分離精製を行う。得られた精製標品は、質量分析計を用いた解析法で同定する。

脊髄損傷に対する再生促進因子を明らかにすることにより、骨髄間質細胞移植の安全性と有効性を基礎的・臨床的に検討するとともに、細胞移植をせずに有効因子のみの投与という、患者の負担がより少ない治療法の開発の礎を築くことを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 骨髄間質細胞培養上清の収集

4週齢 Sprague-Dawley (SD) ラットから大腿骨および脛骨を剖出し、その骨髄から骨髄液を採取し 10 cm 培養皿に播種して、24 時間培養後に培養皿に接着している細胞を骨髄間質細胞として継代培養した。増殖培地は 10% ウシ胎仔血清を含む D-MEM を用いた。2 回継代し confluent に達したのち、無血清 D-MEM に交換して 24 時間後の培養上清を回収した。

(2) 神経突起伸長アッセイ法の改良

出生直前または直後 SD ラットの海馬から神経細胞を単離し、ポリ-L-リジンでコートしたマイクロプレートで培養した。細胞が接着した後、検定試料を培地中に添加し、さらに培養し、神経細胞の突起伸長および生存維持について評価するバイオアッセイ法を確立してきた。このアッセイ法を再現性よく、高感度で、簡便なものとするように検討を行った。

(3) 神経再生因子の精製

上記 (1) の方法で得られた培養上清から、液体クロマトグラフィーを組み合わせ、(2) で確立した神経突起伸長アッセイ法を指標にして神経再生に対する有効因子の精製を行った。

具体的には、ヘパリンアフィニティー、イオン交換、ゲル濾過あるいは逆相クロマトグラフィーなどのカラムを用いた。得られた精製標品は、MALDI-TOF MS や LC-MS/MS などの質量分析計を用いた方法により同定を行った。

4. 研究成果

まず、我々がこれまで用いてきた神経突起伸長アッセイ法の改良を行った。今までのものより再現性よく、高感度で、簡便なものとするように検討を行った。海馬の剖出方法および剖出部位、細胞の播種濃度、培養時間、マイクロプレートの種類、プレートのコーテ

イング方法などについて検討を行った。これらにより、バイオアッセイ法がより良いものへと改善された。

次に、このアッセイ法を指標にして、ラット骨髄間質細胞の培養上清から神経再生に関わる因子を液体クロマトグラフィーを用いて分離精製した。培養上清は、骨髄間質細胞を継代培養し、confluentに達したのち無血清培地に交換して24時間後に回収した。

この培養上清を、はじめにヘパリンアフィニティーカラムに添加し、NaClの濃度勾配により溶出した。各フラクションを神経アッセイにより活性を測定したところ、いくつかの活性のピークがみられた。それらに含まれる因子をLC-MS/MSを用いて解析したところ、いくつかの既知の因子を同定した。さらに、イオン交換、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィーなどを組み合わせて分離精製を行い、LC-MS/MSやMALDI-TOF MSにより同定を行った(図1)。

これらの解析によって明らかになった因子について脊髄損傷の再生に対する作用をさらに解析することにより、骨髄間質細胞の移植療法の有効性および安全性を高めるとともに、細胞を用いない有効因子投与による治療法の開発の基礎を確立できると考えられる。

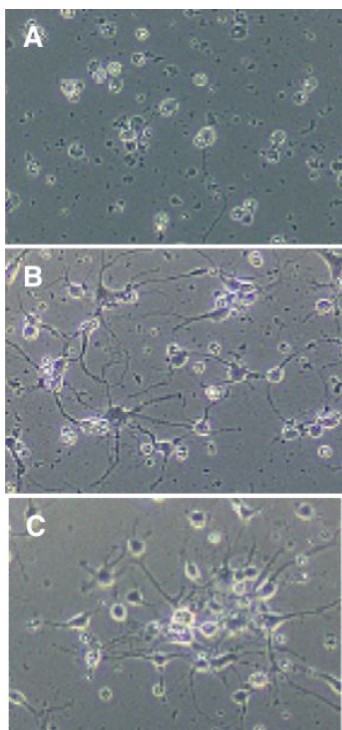


図1 神経細胞への効果

- A: コントロール培地。神経細胞は死んでいる。
B: 骨髄間質細胞培養上清。神経細胞は生存し神経突起の伸長がみられる。
C: 分画フラクション。クロマトグラフィーによって、より強い活性分画を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2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*, 32, 473-482, 2014. doi: 10.3233/RNN-130363. 査読有

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

〔学会発表〕(計12件)

兼清健志、**中野法彦**、野田亨、井出千束：Effect of transplantation of choroid plexus epithelial cells for spinal cord injury in rats、第120回日本解剖学会総会・第92回日本生理学会大会、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)、平成27年3月21-23日。

兼清健志、**中野法彦**、野田亨、井出千束：脈絡叢上皮細胞の脊髄損傷モデルラットへの移植効果、第14回日本再生医療学会総会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)、平成26年3月19-21日

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誘導される脈絡叢上皮細胞由来の神経再生因子の探索、第87回日本生化学会大会、京都国際会館(京都府・京都市)、平成26年10月15-18日

兼清健志、本間玲実、**中野法彦**、松本直也、井出千束：A Search for Nerve Regeneration Factors from Choroid Plexus Epithelial Cells、第37回日本神経科学大会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)、平成26年9月11-13日

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、自治医科大学(栃木県・下野市)、平成26年3月27-29日

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、京都国際会館(京都府・京都市)、平成26年3月4-6日

中野法彦、本間玲実、兼清健志、井出千束：

ラット骨髄間質細胞培養上清による神経再生の解析、第 86 回日本生化学会大会、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）、平成 25 年 9 月 11-13 日

本間玲実、中野法彦、井出千束：骨髄間質細胞の培養メディウ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）、京都国際会館（京都府・京都市）、平成 25 年 6 月 20-23 日

中野法彦、本間玲実、井出千束：ラット骨髄間質細胞の培養上清による神経再生に対する効果、第 12 回日本再生医療学会総会、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）、平成 25 年 3 月 21-23 日

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、福岡国際会議場（福岡県・福岡市）、平成 24 年 12 月 14-16 日

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）、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）、平成 24 年 9 月 18-21 日

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、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）、平成 24 年 6 月 12-14 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

井出 千束（IDE, Chizuka）
藍野大学・医療保健学部・再生医療研究所・教授
研究者番号：70010080