

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791530

研究課題名(和文) マウス損傷脊髄に対するヒト骨髄幹細胞移植後のmicrogliaの組織学的検討

研究課題名(英文) Effects of human bone marrow stromal cell transplantation for microglia in spinal cord injury model mice

研究代表者

渡邊 修司 (Watanabe, Shuji)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00596679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷マウスに対して、ヒト骨髄間質細胞および同種マウス骨髄間質細胞移植を行った。脊髄損傷後の脊髄内でのmicrogliaの動態について検討し、骨髄間質細胞移植によるmicroglia活性、特に損傷後慢性期での活性の抑制がみられた。また、microgliaと同様な性質をもち、脊髄損傷のような脳脊髄液関門が破綻する状態で遊走してくるmacrophageの動態も同様に検討を行ったところ、macrophageの遊走が移植により抑制されていることを確認した。また同モデルに加え損傷急性期に抗IL-6受容体抗体による治療介入を行ったところ、骨髄間質細胞の生存率の上昇、運動機能の著明な改善などが確認できた。

研究成果の概要(英文)：After BMSC treatment, locomotor function was significantly improved in BMSC group. Resident microglia and hematogenous macrophage activation were suppressed in chronic state after spinal cord injury. Also, allodynia like behavior was suppressed in chronic state after spinal cord injury. So, suppression of microglia and macrophage has possibility to improve the neuropathic pain after spinal cord injury. In this study, most important problem was the low survival rates of transplanted BMSC. Therefore, we decided to also use anti-IL-6 receptor antibody(MR16-1). With this treatment, the survival rates of BMSC were significantly increased and locomotor function was also improved than BMSC treatment only.

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：spinal cord injury bone marrow stromal cell microglia macrophage MR16-1

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷による重篤な神経症状を回復させる治療は非常に重要性が高く、近年は様々な基礎研究が報告されているが、未だに臨床応用には至っていないのが現実である。脊髄損傷治療には、いくつかのポイントがある。

損傷後に過剰発現する炎症性サイトカインの発現抑制。 損傷後急性期の神経栄養因子の枯渇に対する補充、軸索阻害因子の抑制。

細胞移植療法などに大きく分けられる。

我々はこれまでに、 に関しては、etanercept や MR16-1 を脊髄損傷後に投与することで、急性期の過剰な炎症性サイトカイン(IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6)の発現抑制、neuron や oligodendrocyte のアポトーシス抑制や免疫担当細胞の集積の変化などを報告している (Guerrero AR, Uchida K, et al. *J Neuroinflammation*, 2012)。最近の研究として、 に対して、ラット脊髄損傷モデルを用いて、ヒト骨髄間質細胞の損傷部への直接移植による、運動機能改善、macrophage phenotype の変化などを報告している (Nakajima H, Uchida K, et al. *J Neurotrauma*, 2012)。

最近の報告では、損傷脊髄における免疫担当細胞として、macrophage や脊髄由来の microglia の動態が、脊髄再生に大きく関与するとされており、特に脊髄損傷の2次損傷において、macrophage の phenotype や resident microglia の高い貪食能と脊髄保護効果を調節することが脊髄再生における一つの治療対象となりうることを示唆されている。BMSC 移植による神経保護効果として、これらの炎症担当細胞の変化が関与していることは明確であるが、近年の報告では、損傷脊髄内の移植 BMSC は BMSC 自体が有する神経保護効果や軸索再生誘導効果、血管新生効果、免疫抑制効果などが注目されており、間接的に炎症担当細胞に影響を与えるとされる。

## 2. 研究の目的

以上の知見に基づき、本研究では、マウス胸髄損傷モデルを作成し、移植 BMSC の損傷脊髄内での経時的動態および抗炎症療法との併用療法が移植 BMSC、運動機能改善に与える影響について検討するとともに、脊髄内 microglia に対する BMSC 移植の影響について、実験的に検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

骨髄間質細胞 (BMSC) の損傷脊髄内での動態 (移植細胞の分布や生着率) を免疫組織学的に評価し、その組織修復や液性因子への影響を評価する。この結果を踏まえた上で、脊髄損傷急性期における BMSC が microglia、macrophage に与える影響を組織学的に評価する。また、ラジオアイソトープを用いた手法により、microglia の活性の評価を行い、新しい側面から、microglia の動態を評価する。さらにこれらに我々がこれまで報告してきた脊髄損傷後超急性期における抗炎症薬投与を併用することによる BMSC 移植の有効性増強効果および microglia、macrophage の変化についても検討する。

## 4. 研究成果

移植 BMSC は損傷後3日目に移植するのが、最も生存率が高かった(図1)。

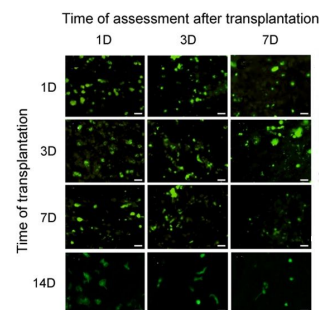


図1. 移植 BMSC の至適移植時期

MR16-1 投与により移植 BMSC の生存率の上昇がみられた。また運動機能も併用療法によりさらに改善がみられた(図2)。

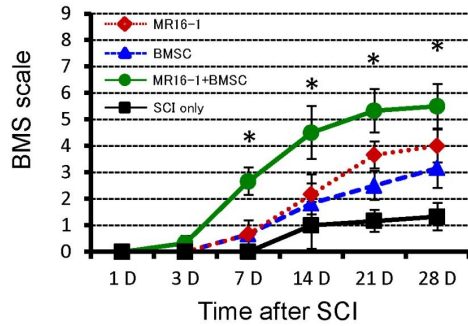
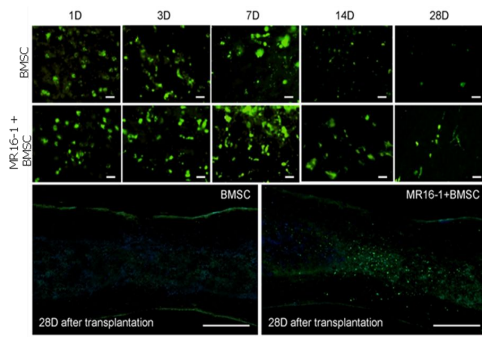


図 2 .MR16-1 併用の効果、運動機能改善

MR16-1 群では、BMSC 単独投与に比べ、脊髄内の IL-6, TNF- $\alpha$  抑制、BDNF, NGF, VEGF, IGF-1 発現増加がみられた(図 3)。

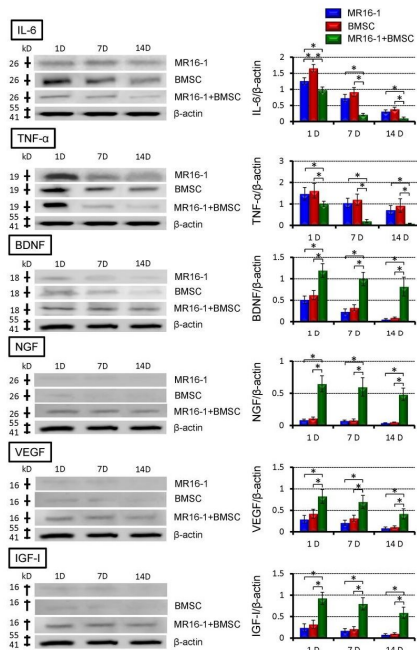


図 3. 損傷脊髄の液性因子の検討

MR16-1 併用により移植 BMSC の apoptosis(Annexin-V)が抑制され、生存率が改善した一因と考えられた(図 4)。

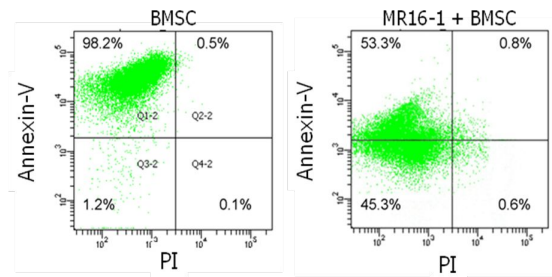


図 4. 移植細胞の flow cytometry での apoptosis の検討

移植 BMSC における細胞生存シグナル (pErk1/2, pAkt)が MR16-1 により活性化していた(図 5)

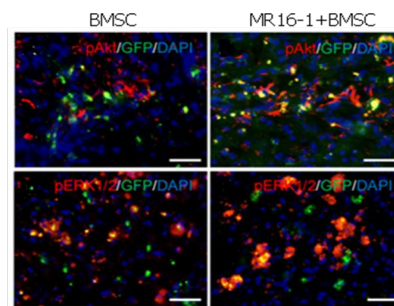


図 5. 免疫染色での移植 BMSC の細胞生存シグナルの評価

骨髄細胞のみ GFP 陽性細胞に置き換えたキメラマウスの作成に成功し、このマウスを用いて、脊髄内 microglia の動態を経時的に評価することが可能となった。また、BMSC 移植により microglia 活性の抑制がみられた(図 6)。

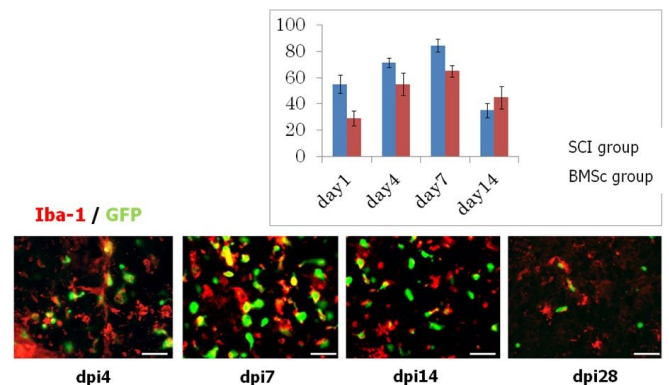


図 6.GFP-BM chimeric mouse を用いた脊髄内 microglia の検討

flow cytometry を用いて、末梢性ベンゾジ

アゼピン受容体 (PBR) が損傷脊髄で主に microglia も発現しているという結果を得た (図 7)。

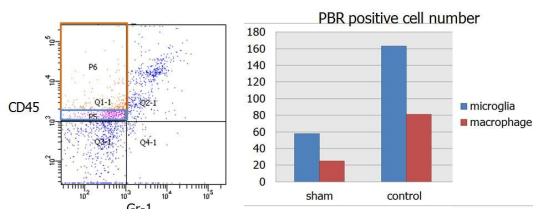


図 7. PBR の局在についての検討

H<sup>3</sup>-PK11195 による Autoradiography を用いて、活性化 microglia が BMSC により抑制されるという結果を得た (図 8)。

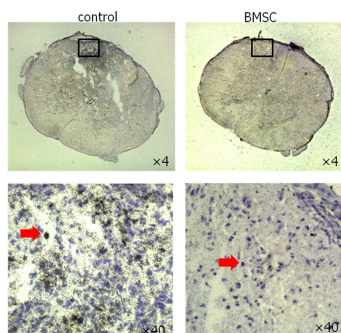


図 8. H<sup>3</sup>-PK11195 の autoradiography

## 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 1 件)

1. Tan Y, Uchida K, Nakajima H, Guerrero AR, Watanabe S, Hirai T, Takeura N, Liu SY, Johnson WE, Baba H. Blockade of interleukin 6 signaling improves the survival rate of transplanted bone marrow stromal cells and increases locomotor function in mice with spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2013 Oct;72(10):980-93. doi:10.1097/NEN.0b013e3182a79de9. 査読有

[学会発表](計 12 件)

1. 渡邊修司、内田研造、中嶋秀明、松尾英

明、竹浦直人、馬場久敏. 脊髄損傷モデルの慢性疼痛の解析および骨髄間質細胞移植の有効性についての目値機組織学的検討. 第 21 回日本腰痛学会. 2013.11.1-2. 東京

2. 渡邊修司、内田研造、中嶋秀明、松尾英明、竹浦直人、吉田藍、馬場久敏. 骨髄間質細胞移植の脊髄損傷後慢性疼痛に対する有効性の検討. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2013.10.18-19. 千葉

3. Shuji Watanabe, Kenzo Uchida, Hideaki Nakajima, Alexander Rodriguez Guerrero, Hisatoshi Baba. Dynamic state and localization of microglia in injured spinal cord by the peripheral benzodiazepine receptor ligand PK11195. Euro Spine 2013 Annual meeting October 2 - 4, Liverpool, UK.

4. 渡邊修司、内田研造、中嶋秀明、吉田藍、竹浦直人、馬場久敏. 脊髄損傷モデルの慢性疼痛の解析および骨髄間質細胞移植の与える効果についての検討. 第 42 回日本脊椎脊髄病学会. 2013.4.25-27. 宜野湾

5. 渡邊修司、内田研造、中嶋秀明、松尾英明、竹浦直人、馬場久敏. 脊髄損傷モデルの慢性疼痛に対する骨髄間質細胞移植の与える有効性. 第 5 回日本運動器疼痛学会. 2012.11.17-18. 東京

6. 渡邊修司、内田研造、中嶋秀明、松尾英明、竹浦直人、馬場久敏. 脊髄損傷モデルの慢性疼痛に対する骨髄間質細胞移植の与える影響. 第 20 回日本腰痛学会. 2012.11.3. 神戸

7. 渡邊修司、内田研造、中嶋秀明、Alexander Rodriguez Guerrero、平井貴之、馬場久敏. 脊髄損傷動物モデルにおける PK11195 を用いた activated microglia の組織学的評価. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2012.10.26-27. 名古屋

8. 渡邊修司、内田研造、中嶋秀明、平井貴之、松尾英明、Alexander Rodriguez Guerrero、

竹浦直人、馬場久敏．脊髄損傷モデルの慢性疼痛に対する骨髄間質細胞移植の与える影響．第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会．2012.10.26-27．名古屋

9. 渡邊修司、内田研造、中嶋秀明、Alexander Rodriguez Guerrero、平井貴之、馬場久敏．損傷脊髄における PK11195 を用いた activated microglia の組織学的検討．第 119 回中部整形外科災害外科学会学術集会．2012.10.5-6．福井

10. 渡邊修司、内田研造、中嶋秀明、A. Guerrero、平井貴之、吉田藍、馬場久敏．PK11195 を用いた脊髄損傷における microglia の局在と動態．第 85 回日本整形外科学会学術総会．2012.5.17-20．京都

11. 渡邊修司、内田研造、中嶋秀明、Alexander Rodriguez Guerrero、平井貴之、吉田藍、馬場久敏．脊髄損傷におけるヒト骨髄間質細胞移植後の activated microglia の組織学的検討．第 41 回日本脊椎脊髄病学会．2012. 4.19-21．久留米

12. 渡邊修司、内田研造、中嶋秀明、Long Guang、平井貴之、馬場久敏．抗 IL-6 受容体抗体を用いた損傷脊髄におけるヒト骨髄間質細胞移植後の細胞死抑制．第 41 回日本脊椎脊髄病学会．2012. 4.19-21．久留米

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

渡邊 修司 (Watanabe Shuji)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00596679