

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462290

研究課題名(和文) 脊髄損傷における骨髄間質細胞移植効率向上のための病態解明と克服に関する基礎的研究

研究課題名(英文) The basic reaserch for the pathologic symptom to improve the survival rate of transplanted bone marrow stromal cells in the injured spinal cord

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷に対する骨髄間質細胞移植(BMSC)の問題点のひとつは、損傷脊髄内での移植細胞生存率の低さである。移植BMSCの生存率と運動機能改善は相関すると報告されている。脊髄損傷後に抗IL-6受容体抗体を投与することで、MAPK pathwayを主とした炎症性変化を抑制し、移植BMSCの生存率を向上させることで運動機能改善に寄与した。移植BMSCの細胞死のメカニズムは、flow cytometryでの検討では、necrosisではなくapoptosisであった。脊髄損傷後3日目のBMSC移植は、血管脊髄関門破綻の改善、マイクログリア/マクロファージ調整を介して、脊髄損傷後疼痛の改善に寄与した。

研究成果の概要(英文)：One of the problems of bone marrow stromal cells (BMSC) transplantation for spinal cord injury (SCI) is the low survival rate in the injured spinal cord. Some research indicated that the survival rate of transplanted BMSC are correlated with the functional recovery. A temporal blockade of IL-6 signaling after SCI abrogates damaging inflammatory activity, especially MAPK pathway, and promotes functional recovery by promoting the survival rate of transplanted BMSC. The mechanism of transplanted BMSC death is apoptosis (Annexin-V) but not necrosis (PI-positive) by flow cytometry. BMSC transplantation at day 3 post-SCI improved motor function and relieved SCI-induced hypersensitivities to mechanical and thermal stimulation through a variety of related mechanisms that include neuronal sparing and restoration of the disturbed blood-spinal cord barrier, mediated through modulation of the activity of spinal-resident microglia and the activity and recruitment of hematogenous macrophages.

研究分野：脊椎脊髄病学

キーワード：脊髄損傷 骨髄間質細胞 細胞移植 脊髄損傷後疼痛

### 1. 研究開始当初の背景

骨髄間質細胞 (Bone marrow stromal cell: BMSC) は間葉系由来の細胞であり、間葉系幹細胞の供給源のひとつとして最も利用されている。間葉系幹細胞は中胚葉組織 (間葉) 由来の体性幹細胞であり、サイトカインや液性因子酸性による組織保護や免疫抑制作用、組織内における分化能と修復機能など多岐にわたる能力が報告されている。間葉系幹細胞は、自家移植であること、移植後細胞分化を示すこと、倫理的問題を回避できるといった利点を持ち合わせており、アメリカ国立衛生研究所 (NIH) のホームページ上では、2011年以降の幹細胞移植に関する臨床研究 17 件のうち 8 件が間葉系幹細胞移植によるものである。この点からも、本細胞の臨床応用への期待が伺える。

しかしながら一方で、BMSC 移植のみでは有意な運動機能改善は得られにくいとする報告も散見される。この理由として、移植 BMSC の生存率が機能改善と相関があると報告されているにもかかわらず、損傷脊髄内での生存率は著しく低いと考えられている点が挙げられ、BMSC 移植の最大の問題点であると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、未だ十分に解明されていない移植 BMSC の生存率低下のメカニズムについて調べ、さらにこれを克服する方法として、抗 IL-6 受容体抗体を併用し、移植 BMSC 生存率、組織学的・運動機能改善に与える影響を調べ、BMSC の有用性がさらに発揮される環境を整える方法について検討する。

また、脊髄損傷においては運動障害だけではなく、約 8 割の患者においてなんらかの疼痛が生じるとされており、受傷後の亜急性期に神経障害性疼痛があると、痛みは 3-5 年続く傾向にあるとも報告されている。この疼痛発生のメカニズムについてはさまざまな報告があり、損傷に伴うグルタミン酸、ATP などの分子の増加、抑制性ニューロンの抑制低下、マイクログリアなどの損傷脊髄内の炎症細胞の活性化などについての報告が散見される。我々は特にこの中でマイクログリアなどの炎症細胞の動態が BMSC 移植により変化し得る点に着目し検討を行った。

### 3. 研究の方法

損傷脊髄内に移植された骨髄間質細胞が細胞死に至るメカニズムは十分に明らかになってはいないため、まず第一に、このメカニズムの解明 (apoptosis もしくは necrosis; preliminary には early apoptosis が主と考えられる) を行った。次に、移植時期と生存率の関係を調査し、骨髄間質細胞の移植至適

時期を調査する。これらのメカニズムを踏まえたうえで、脊髄損傷直後に抗 IL-6 受容体抗体 (MR16-1) を投与し、移植骨髄間質細胞の生存率の変化を観察する。また、移植骨髄間質細胞の生存を促す因子、細胞死に導く因子をそれぞれ想定し、これらの発現変化について、免疫組織化学的検討や flow cytometry での検討を行う。また、骨髄間質細胞移植の脊髄障害性疼痛に対する有効性評価を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 損傷脊髄内での BMSC の分布と文化

ラット急性脊髄損傷モデルに対し、損傷後 3 日目にヒト BMSC を損傷部に移植し、経時的に評価した。移植 BMSC は少なくとも損傷後 5 週までは、損傷部を含めた頭尾側方向にその分布が確認された (図 1)。

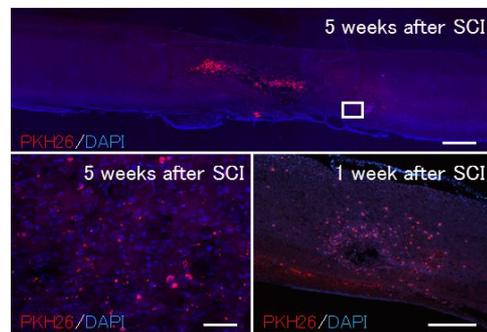


図 1. ヒト BMSC の移植後の分布

これらの分布した BMSC の局在や分化の可能性について調べると、移植後 5 週の時点での評価では、移植細胞から分化した神経グリア系細胞は確認されず、移植 BMSC はニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、マイクログリアそれぞれの間隙に入り込むように存在していた。

#### (2) BMSC 移植の問題点と対策 - 抗 IL-6 受容体抗体との併用療法 -

脊髄損傷直後にマウス抗 IL-6 受容体抗体である MR16-1 をマウス脊髄損傷モデルに投与し、移植 BMSC の生存率に与える影響について検討した。MR16-1 投与群では移植後 1 週以降で有意に移植細胞の生存率が改善し、運動機能回復効果も向上していた (図 2)。

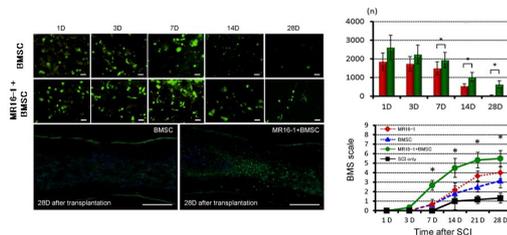


図 2. 抗 IL-6 受容体抗体が移植 BMSC の生存率に与える影響

フローサイトメトリーを用いて、損傷脊髄内の移植 BMSC を抽出し、BMSC に発現するのが主に apoptosis であるか、necrosis であるか検討を行ったところ、多くの BMSC が apoptosis のマーカーを発現しており、移植 BMSC の細胞死の原因が主に apoptosis であることが確認できた。MR16-1 併用群ではこれが減少し、細胞死が抑制されていることが示唆された (図 3)。

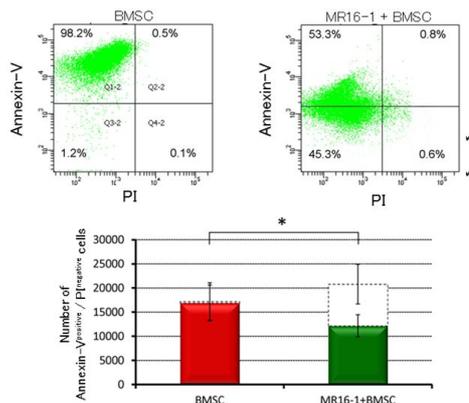


図 3. 移植 BMSC の細胞死のメカニズム

免疫組織学的評価においても、MR16-1 併用群では、BMSC 単独群に比べ、TUNEL 陽性 BMSC が移植後早期から減少し、移植 BMSC の caspase-3, -8, -9 発現も同様に併用群で有意な低下がみられた。

抗 IL-6 受容体抗体を併用することにより、移植 BMSC の生存率を向上させることで、BMSC の移植効率が高まったと考えられた。

### (3) BMSC 移植が脊髄損傷後疼痛に与える影響

疼痛行動学的評価では、圧刺激、熱刺激共に、脊髄損傷を受けたマウスでは疼痛閾値の低下が経時的に悪化する傾向がみられた。しかし、BMSC 移植群 (損傷後 3 日目に移植) で損傷単独群に比べ、損傷後 2 週以降で閾値の有意な改善がみられた (図 4)。

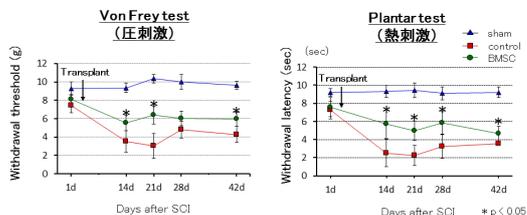


図 4. BMSC 移植による疼痛行動学的評価

アロデニアの評価として、脊髄後角ニューロンにおける CREB 発現を評価した。損傷群においては免疫染色および western blotting にて著明な上昇を認めしたが、BMSC 移植群ではこれが優位に低下していることが示された。

疼痛発現物質として、MAP kinase family のうち、p38 および ERK1/2 について免疫染色、

Western blotting を用いて評価した。評価は疼痛が出現する脊髄損傷後 2 週で行った。両者とも損傷群で著明な上昇を認めたが、BMSC 移植により優位に低下した。

骨髄由来細胞の脊髄損傷後の動態を観察するために、グリーンマウス骨髄細胞を移植したキメラマウスを作製した。キメラマウスの脊髄損傷後 14 日頃に骨髄由来細胞の脊髄内集積のピークがみられ、4 週ごろにはこれらがほとんどみられなくなることが確認できた。BMSC 移植を行うと、この細胞の集積は減少し、特に CD11b と GFP の二重陽性細胞、つまり骨髄由来のマクロファージの流入が減少していることが確認できた。一方で、脊髄由来のマикроグリア (CD11b 陽性、GFP 陰性) は治療介入でもほとんど変化はみられないという結果であった (図 5)。

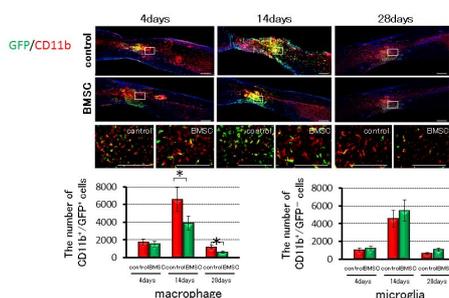


図 5. BMSC 移植によるマイクログリア・マクロファージの動態変化

フローサイトメトリーを用いて、損傷脊髄内に存在するマクロファージおよびマイクログリアを抽出し解析したところ、そのほとんどに MAP kinase (p-p38, p-ERK1/2) が発現していることが分かった。この結果は、マイクログリアおよびマクロファージがいずれも脊髄損傷後疼痛発現に関与していることを示唆するものと考えられる。BMSC 移植群では、MAP kinase の発現が有意に低下していた。血管脊髄関門 (blood-spinal cord barrier: BSCB) の評価目的に、損傷脊髄に漏出するアルブミン、アストロサイトに存在し血管透過性亢進を示唆するといわれる PDGFR- $\alpha$  を用いた免疫染色を行った。いずれも損傷後 4 日に発現のピークがみられ、経時的に低下することが確認できた。また BMSC 移植により、損傷後 1 週頃から優位な発現低下が確認できた。また、BSCB 透過性亢進に関する報告されている、TNF- $\alpha$ 、IL-6、MMP-9 などの炎症性サイトカインは BMSC 移植群で低下していた。骨髄由来マクロファージの主な遊走因子とされている chemokine として CCL2、CCL5、CXCL10 を定量化したところ、BMSC 群で著明に低下がみられ、液性因子としても炎症細胞浸潤を抑制していることが示された。

BMSC 移植により血管脊髄関門の破綻が抑制され、脊髄内へのマクロファージの遊走が抑制されることが示唆された。骨髄由来マクロファージは脊髄損傷後疼痛発現物質を発現しており、BMSC が血管脊髄関門の破綻抑制を介して、この発現を抑制することが、脊髄損傷後疼痛抑制のメカニズムと考えられた。

#### 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3件)

- (1) Watanabe S, Uchida K, Nakajima H, et al. Early transplantation of mesenchymal stem cells after spinal cord injury relieves pain hypersensitivity through suppression of pain-related signaling cascades and reduced inflammatory cell recruitment. *Stem Cells* 33:1902-1914, 2015. 査読有
- (2) Tan Y, Uchida K, Nakajima H, et al. 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* 72:980-993, 2013. 査読有
- (3) Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, et al. 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. 査読有

[学会発表](計8件)

- (1) 内田研造、中嶋秀明、渡邊修司、高橋藍、本定和也. 脊髄損傷に対する間葉系幹細胞移植後の脊髄再生. 第30回日本整形外科学会基礎学術集会. 2015.10.22-23. 富山
- (2) 中嶋秀明、内田研造、渡邊修司、本定和也. 脊髄損傷部および腰膨大部における hematogenous macrophage および resident microglia の動態. 第44回日本脊椎脊髄病学会. 2015.4.16-18. 福岡
- (3) 中嶋秀明、内田研造、渡邊修司、竹浦直人、本定和也、馬場久敏. 脊髄損傷後の損傷高位および腰膨大部における microglia/macrophage の動態と極性. 第29回日本整形外科学会基礎学術集会. 2014.10.9-10. 鹿児島
- (4) 中嶋秀明、内田研造、渡邊修司、本定和

也、坂本拓己、馬場久敏. 急性脊髄損傷に対する抗 IL-6 受容体抗体併用骨髄間質細胞移植. 第29回日本整形外科学会基礎学術集会. 2014.10.9-10. 鹿児島

- (5) 中嶋秀明、内田研造、Alexander Rodriguez Guerrero、渡邊修司、竹浦直人、馬場久敏. 脊髄損傷急性期における抗 IL-6 受容体抗体投与による macrophage 極性変化と機能改善効果. 第28回日本整形外科学会基礎学術集会. 2013.10.17-18. 千葉
- (6) 中嶋秀明、内田研造、渡邊修司、Alexander Rodriguez Guerrero、本定和也、馬場久敏. 損傷脊髄内移植骨髄間質細胞の細胞死メカニズムと抗 IL-6 受容体抗体併用による移植効率改善効果. 第28回日本整形外科学会基礎学術集会. 2013.10.17-18. 千葉
- (7) 中嶋秀明、内田研造、渡邊修司、Tan Ying、Alexander Rodriguez Guerrero、馬場久敏. 抗 IL-6 抗体投与が移植骨髄間質細胞の生存率に与える影響. 第86回日本整形外科学会. 2013.5.23-25. 広島
- (8) 中嶋秀明、内田研造、渡邊修司、Tan Ying、Alexander Rodriguez Guerrero、馬場久敏. 抗 IL-6 受容体抗体が脊髄損傷後移植骨髄間質細胞の生存率に与える影響. 第42回脊椎脊髄病学会. 2013.4.25-27. 沖縄

[図書](計1件)

1. Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow in the injured spinal cord. *Neuroprotection and Regeneration of the Spinal Cord* (Uchida K, Nakamura M, Ozawa H, Katoh S, Toyama Y ed.), Springer: 283-293, 2014

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中嶋 秀明 (NAKAJIMA Hideaki1)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号: 10397276

##### (2) 研究分担者

内田 研造 (UCHIDA Kenzo)  
福井大学・医学部・教授  
研究者番号: 60273009  
(H27.10 まで)