

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25713053

研究課題名(和文)細胞移植治療に於けるドナー・ホスト相互作用の解明と慢性期脊髄損傷研究への応用

研究課題名(英文) Donor-host interaction of engrafted neural stem progenitor cells in injured spinal cord

研究代表者

岡田 誠司 (Okada, Seiji)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30448435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、脊髄損傷に対する神経幹細胞移植が新しい治療法として期待されているが、重度損傷や慢性期移植では殆ど効果が認められない。そこで生着細胞の選択的回収と次世代シーケンサーによる網羅的発現遺伝子解析の系を用いて、なぜこれらの損傷では効果が乏しいのかの解明を試みた。その結果、慢性期環境であっても移植細胞が十分に生着分化し神経栄養因子分泌活性も旺盛であること、中等度損傷であってもホスト介在ニューロン除去により移植効果が消失することが明らかとなった。これらの結果は、生着細胞が宿主の環境に統合されシナプス連続性を再構築することが脊髄損傷後の治療効果を生む上で重要であることを示している。

研究成果の概要(英文)：The transplantation of neural stem/precursor cells (NSPCs) is a promising therapeutic strategy for spinal cord injury (SCI), however, few studies have investigated NSPC transplantation for the severe injury nor chronic phase of SCI, and its therapeutic efficacy remains controversial. In this study, we demonstrated that the interactive synaptic reorganization between engrafted NSPCs and spared host neurons is crucial for functional recovery. In addition, even with the adequate capacity in generating neurons/oligodendrocytes and producing therapeutic molecules, engrafted NSPCs did not improve locomotor function, indicating that failure in chronic transplantation is not due to the lack of therapeutic activities of engrafted NSPCs but the refractory state of chronically injured spinal cords. Environmental modulation, rather modification of transplanting cells, will be significant for successful translation of stem cell-based therapies for SCI.

研究分野：整形外科

キーワード：脊髄損傷 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、脊髄損傷に対する神経幹細胞移植が新しい治療法として期待されている。しかし、その治療効果は限定的であり、かつそのメカニズムも不明な点が依然として多く残されている。その原因として、これまでの動物実験研究では移植後の生着細胞の機能を解析する手法が免疫染色以外ほとんど存在しなかったことがあげられる。すなわち、免疫染色実験により組織切片上での移植細胞の局在や分化 phenotype に関する構造的情報はある程度得られるものの、生着した細胞がどのような分子をどの程度発現しており、どの程度機能しているのか、といった定量的解析は不可能であった。そのため移植後の腫瘍化のリスク、機能改善をもたらすメカニズム、生着環境による違いが移植細胞の機能にどの程度影響を及ぼすか、などの非常に根本的な疑問が未解決のままであった。

2. 研究の目的

本研究課題に於いては、申請者らが開発したセルソーターを応用した生着細胞の選択的回収と次世代シーケンサーによる網羅的発現遺伝子解析の系を用いて、損傷脊髄に対して移植された神経幹細胞の発現遺伝子プロファイル解析を行い、なぜ慢性期移植では効果が乏しいのか、なぜ急性期移植では効果があるのかのメカニズムを明らかにし、慢性期脊髄損傷治療への足掛かりとすることを目的とした。さらに、移植効果の認められた急性期損傷に於いて、損傷重傷度が細胞移植治療効果に及ぼす影響を解析し、急性期移植での生着細胞の作用機序を明らかにすることを試みた。

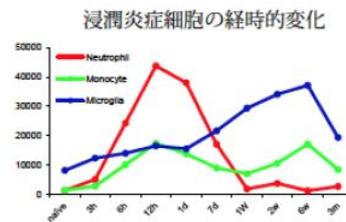
3. 研究の方法

実験動物は成体 B6 マウス(雌)8週齢を用いた。脊髄損傷はコンピューター制御下に定量的な圧挫損傷を作成可能な IH impactor を用い、第9胸髄レベルに 70Kdyn の圧挫損傷を作成した。移植神経幹細胞は胎児 E14 線条体を neurosphere あるいは monolayer culture し、移植細胞数は 50 万個とした。細胞移植は、非損傷脊髄へ移植、損傷直後の急性期移植、損傷後7日後の亜急性期移植、損傷後3ヶ月後の慢性期移植、の4群に行ない、それぞれ移植から6週間、下肢運動機能評価を行い、細胞移植が運動麻痺に与える影響を検討する。生着細胞を選択的に採取し次世代シーケンサー (Solexa Genome analyzer x) を用いて発現している mRNA を網羅的に定量化した。各サンプル毎の発現遺伝子ライブラリーの homogeneity を確認した後に、GO 解析や各群での分化傾向、神経栄養因子の発現を比較した。炎症細胞浸潤の経時的変化については FACS を用いて、損傷脊髄中の好中球、マクロファージ、マイクログリアを定量した。運動機能評価については open-field motor スコアを用いて客観的定量を行なった。統計

学的解析には、one-way ANOVA を基本とし、運動機能解析に関しては repeated measure ANOVA を行った。

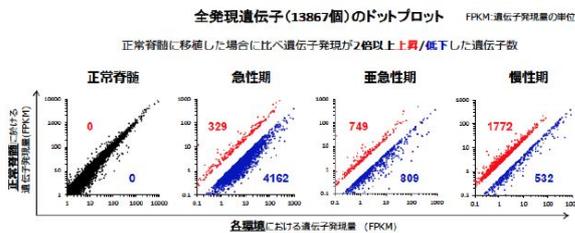
4. 研究成果

我々は既に、生着細胞の遺伝子プロファイルは生着環境によって劇的に変化することを明らかにしている(Kumamaru et al., Nature Commun, 2012)。そこで、慢性期での神経幹細胞移植の効果や有効性を検討するためには、まず慢性脊髄中の環境を明らかにする必要がある。FACS を用いた浸潤炎症細胞数を定量した結果、下図の如く、好中球や単球は損傷後 12 時間をピークに浸潤していたが、マイクログリアは損傷後慢性期にかけて徐々に増殖を認めた。



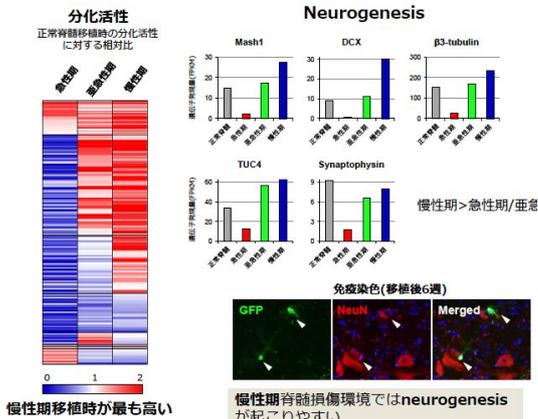
早期の炎症細胞浸潤を反映して、IL-6、IL-1、TNF などの炎症性サイトカインは急性期に上昇し、炎症細胞の遊走に関わるケモカインも同様に急性期での発現上昇が認められたが、一方で慢性期には TGF β 、IL-10、IL-4 などの抗炎症性サイトカインや、IGF、HGF、FGF2 などの増殖因子の発現上昇が認められた。次に、慢性期環境に於ける移植細胞の生着率を *in vivo* imaging システムにて検討した。これは、ホタル発光酵素が ATP と酸素を触媒として基質である luciferin と反応して放つ微弱な光を超高感度 CCD カメラで定量的に測定するものである。すでに、脊髄損傷急性期に移植した場合も、損傷後7日後の亜急性期に移植した場合でも、移植後6週後の生着率は 20%程度であり、移植後数日で大多数の細胞は壊死に陥ることを証明している。このシステムを用いて、損傷後3ヶ月経過した慢性期損傷脊髄にレンチウイルスでラベルした神経幹細胞 50 万個を損傷部に移植した。その結果、急性期や亜急性期と遜色無い生着率を示し、組織切片解析によっても GFP 陽性の移植細胞が多数生着し、神経突起様の構造を呈していることを確認した。そこで、細胞移植後1週間後にセルソーターを用いて生着細胞を選択的に回収し、ギガシーケンサーにて発現遺伝子の網羅的プロファイル解析を行なった。発現遺伝子の比較は、正常脊髄へ移植した神経幹細胞 (Naive)、損傷直後に移植した神経幹細胞 (Acute)、損傷後7日後に移植した神経幹細胞 (Subacute)、損傷後3ヶ月後に移植した神経幹細胞 (Chronic) の4群で行なった。いずれの群も発現している遺伝子の種類は 12000 程度であり、うち4群ともにオーバーラップしているものが 11000 程度であった。しかし、各遺伝子の発現強度を

比較すると、下図の如く、移植の時期によって生着した神経幹細胞の発現遺伝子プロファイルは著明に異なることが明らかとなった。正常脊髄に移植した場合と比較すると、急性期移植では発現が2倍以上高い遺伝子数がわずかに329に対し、発現強度が1/2以下に下がる遺伝子数は4162と著明に多かった。これは、急性期に移植した場合は生着細胞内の転写が著明に抑制されていることを示している。亜急性期移植に於いては遺伝子発現の強度は2倍以上に上昇するものと1/2以下に低下するものがそれぞれ749と809であり、ほぼ同数であった。逆に、慢性期移植に於いては発現強度が2倍以上の遺伝子は1772であるのに対し、発現が1/2以下のものは532であったことから、慢性期移植では生着細胞の転写抑制はおこらず、活性が最も高いことが示唆された。



実際にランダムに 96 遺伝子を選択して定量的リアルタイム PCR を行なったところ、急性期移植では正常脊髄に移植した場合に比して発現強度は 60%程度に低下しているのに対して、慢性期移植では 20%近く転写活性が上昇していることが明らかになった。

また、上記の4群について、正常脊髄に移植した場合をベースとして GO 解析の際に分類される分化関連遺伝子の発現をヒートマップ解析した(下図)。その結果、CNS development は急性期で著明に抑制されており、逆に慢性期移植では相対比が最も高いという興味深い結果が明らかとなった。実際に、ニューロン分化に関する遺伝子である Mash1、Dcx、tubulin、TUC4、Synaptophysin の発現を比較した結果、慢性期移植の神経幹細胞が最も高いという結果であり、組織切片解析にても移植後6週で NeuN 陽性のニューロンに分化した移植細胞が観察された。

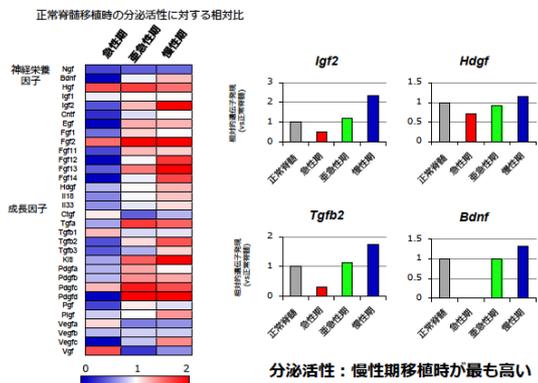


この結果は、移植された神経幹細胞は慢性期

環境に於いて最もニューロンへ分化しやすいことを示唆している。

また、オリゴデンドロサイト分化関連遺伝子である Olig1、Olig2、NG2、Pdgfr、Sox10、CNPase、MBP などに関しても、急性期移植では発現の抑制が認められたが、慢性期移植の神経幹細胞に於いても正常脊髄環境と同様に十分な発現が認められた。オリゴデンドロサイト分化に関しては慢性期よりも若干であるが、亜急性期移植で最も発現が高かったことは、注目すべき点であった。

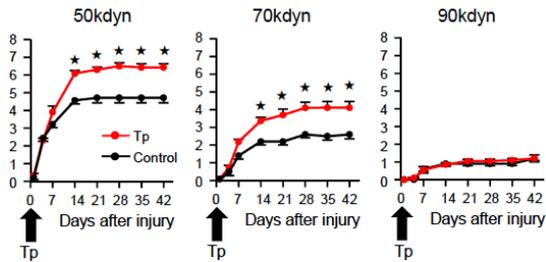
また、神経幹細胞移植が機能改善をもたらす大きな要因として、神経栄養因子などの分泌活性が挙げられる。そこでこれらの4群について trophic factor の分泌に関して比較を行なった。その結果、急性期移植ではやはり転写抑制が認められたが、驚くべきことに慢性期移植群で最も高い活性が認められた。すなわち、ニューロン分化、オリゴデンドロサイト分化、神経栄養因子の発現と、これまでに提唱されている神経幹細胞の機能改善メカニズムに関して、いずれの細胞活性も慢性期環境に移植された神経幹細胞に於いて十分な activity が確認された。



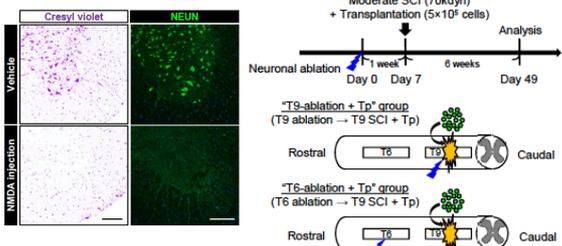
ただし、損傷後3ヶ月経過した慢性期脊髄損傷に神経幹細胞移植を行ない、運動機能評価を行ったが、慢性期移植に於いては機能改善効果は認められなかった。同時に行った急性期および亜急性期移植では機能改善効果を認めたため、これらの結果を総合すると、慢性期環境に移植された神経幹細胞は十分な細胞活性とニューロンへの分化能を有しているにも関わらず、運動機能改善効果が認められなかったことは、移植された細胞ではなく移植された環境にあるといえる。今後は移植細胞の修飾ではなく、生着環境の制御に焦点が当てられる必要性を示したものと考えている。

では、急性期移植や亜急性期移植ではどのようなメカニズムで機能改善をもたらしているのでしょうか? この手がかりを得るために、我々は移植環境の損傷重傷度を変化させた際の細胞移植の効果について検討した。マウスせき損モデルに於いて、軽度損傷(50Kdyn)、中等度損傷(70Kdyn)、重度損傷(90Kdyn)を作製し、損傷急性期あるいは亜

急性期で神経幹細胞 50 万個の移植を行った。その結果、下記の如く軽度損傷ならびに中等度損傷ではメディウムを移植したコントロール群に比して有意に良好な機能回復が認められたが、重度損傷に対しては移植の効果は殆ど認められなかった。

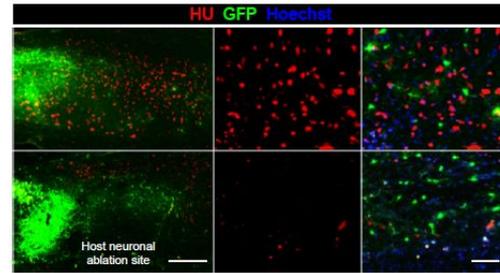


この結果は、急性期移植のみならず、亜急性期移植に於いても全く同様の結果であった。これは、最も治療の必要性が高い重度損傷に於いて移植治療の効果が乏しくなるという臨床応用に於いての新しい課題を提唱している。では、なぜ重度損傷に於いて移植効果が乏しいのかを検討した。特に我々が注目したのは組織切片解析に於いて、移植細胞が生着した範囲に於けるホストニューロンの残存に大きな差があった点である。中等度損傷に於いても重度損傷に於いても、移植細胞の生着範囲には差が認められなかったが、この移植細胞の生着範囲におけるホストニューロンの残存に大きな差が認められた。そこで我々は、中等度損傷であってもホストニューロンが移植細胞の生着範囲に存在しなければ、移植の効果が無くなってしまおうのかを検討した。即ち、移植細胞が運動機能改善に効果を発揮するためにはホストニューロンとのインタラクションが必要であるかどうかを検討した。ホストニューロンを選択的に ablation する方法として NMDA injection を選択した。特に、胸髄レベルであればこの方法で灰白質ホストニューロンを ablation しても、このレベルのニューロンはほぼ全て介在ニューロンであり脳からの命令は皮質脊髄路を下降するため下肢運動機能には全く影響がないことが報告されている。実際に我々も、下図の如く灰白質に於けるホストニューロンを ablation したが、下肢運動機能に変化は認められなかった。そこで、下図実験プロトコルの如く、予め損傷並びに細胞移植部位のホストニューロンを ablation しておき、1 週間後に同部位に脊髓損傷ならびに細胞移植を行い、移植効果を検討した。

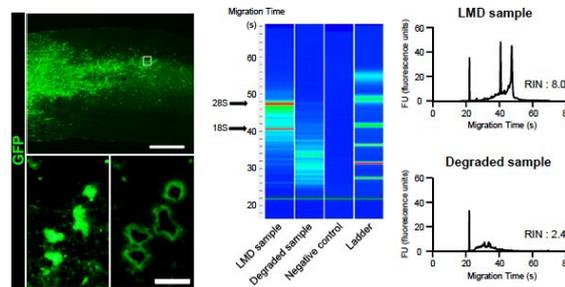


その結果、免疫染色に於いてコントロール群

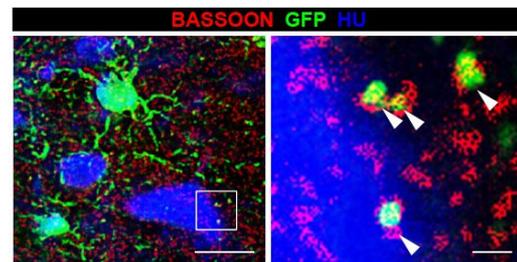
に於いては GFP 陽性の生着細胞に隣接して多数の Hu 陽性ホストニューロンが存在するのに対し、ablation 群に於いては殆どホストニューロンが存在しないことを確認した。



移植 6 週間後に下肢運動機能評価を行ったが、予想通り中等度損傷であっても ablation 群に於いては神経幹細胞移植による運動機能改善効果は殆ど認められなかった。では、ホスト介在ニューロンが存在しないことで、生着した移植細胞のどのような機能が変化したのかを選択的に調べるため、細胞移植後に生着した神経幹細胞を選択的に回収できるレーザーマイクロダイセクションを用いて発現遺伝子解析を行った。

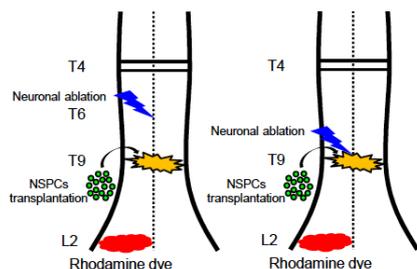


選択的に採取した細胞から RNA を採取しバイオアナライザーで quality check を行い、室に問題ないことを確認し両群より採取した神経幹細胞について定量的 RT-PCR を行った。その結果、ablation 群の神経幹細胞においては C-fos, Arc, Zif268 といった神経活動性のマーカーが軒並み低下しているだけでなく、プレシナプスおよびポストシナプスマーカーも有意に低下していることが明らかとなった。実際に、これらのシナプスタンパク質を免疫染色してもコントロール群では移植細胞が軸索や樹状突起をホストニューロンに伸長させ両細胞間でシナプス形成をしていることが証明された。

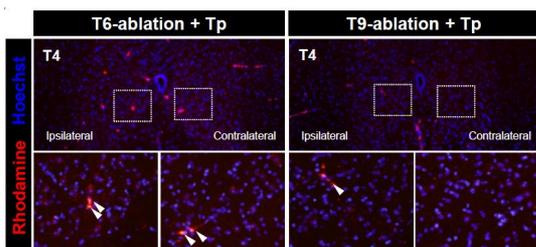


さらに、下肢運動機能の改善のためには、皮質脊髄路よりはむしろ損傷後に内在性の介在神経同士が作る回路 (propriospinal

neuronal circuit)の再構築が重要であると考えられている。これは下行性の間接的な神経回路であり、脊髄のニューロン間をつなぐネットワークとして認識されている。そこで損傷後の propriospinal circuit 回路を評価するため、ロードミントレーサーを使って逆行性の経シナプストレーシングを行った。第9胸髄脊髄損傷後6週の時点で、左第2腰髄にトレーサーを投与し、トレーサー投与後7日の時点で、同側および対側の第4胸髄でラベルされたニューロンの数を定量した。



その結果、同側および対側においても、細胞移植群では損傷のみの群と比してより多くのニューロンがラベルされた。これは、損傷部周囲の生き残った宿主ニューロンが propriospinal circuit の再構築に重要な役割を果たしていることを示している。たとえ神経幹細胞移植を行わない状況であったとしても、生き残った宿主ニューロンが propriospinal circuit の再構築に重要な役割を果たしており、神経幹細胞移植を行った場合は、より一層重要な役割を果たしていると考えられた。実際に損傷周囲部のニューロンを除去すると、自然回復までもが抑えられていた。



以上の結果は、損傷脊髄に生着した神経幹細胞が、宿主脊髄の propriospinal circuit へ統合することで、運動機能を改善させることを示している。重度損傷脊髄では宿主ニューロンの大半が移植細胞の生着範囲で死滅しており、これが神経幹細胞移植の運動機能改善効果を失わせている原因であると考えられた。つまり、細胞移植治療に於いては損傷程度に応じた治療ストラテジーが重要であり、重度損傷の場合は細胞移植のみでは効果が期待できず、2次損傷の抑制等によりホストニューロンを残存させた状態での細胞移植が必須であるといえる。

これらの成果は、Stem Cell Reports, Stem Cells, Science Translational Medicine, Journal of Neurochemistry などの雑誌に掲載され、脊髄損傷の病態解明や治療指針に大

きく貢献したものと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者に下線、研究代表者が corresponding author の場合は*印)

1. Saiwai H, Kumamaru H, Ohkawa Y, Kubota K, Kobayakawa K, Yamada H, Yokomizo T, Iwamoto Y, Okada S*. Ly6C+Ly6G- myeloid-derived suppressor cells play a critical role in the resolution of acute inflammation and the subsequent tissue repair process after spinal cord injury. *J Neurochem.* 125:74-88, 2013. doi: 10.1111/jnc.12135.
2. Kubota K, Doi T, Murata M, Kobayakawa K, Matsumoto Y, Harimaya K, Shiba K, Hashizume M, Iwamoto Y, Okada S*. Disturbance of ribcage development causes progressive thoracic scoliosis: The creation of a nonsurgical structural scoliosis model in mice. *J Bone Joint Surg.* 95:e1301-7, 2013. doi: 10.2106/JBJS.L.01381.
3. Kumamaru H, Kobayakawa K, Saiwai H, Kubota K, Yokota K, Ohkawa Y, Shiba K, Iwamoto Y, Okada S*. The therapeutic activities of engrafted neural stem/progenitor cells are not dormant in the chronically injured spinal cord. *Stem Cells.* 31:1535-47, 2013. doi: 10.1002/stem.1404.
4. Takao T, Morishita Y, Okada S, Maeda T, Katoh F, Ueta T, Mori E, Yugeu I, Kawano O, Shiba K. Clinical relationship between cervical spinal canal stenosis and traumatic cervical spinal cord injury without major fracture or dislocation. *Eur Spine J.* 22:2228-31, 2013. doi: 10.1007/s00586-013-2865-7.
5. Harada A, Okazaki E, Okada S, Tachibana T, Ohkawa Y. Production of a Monoclonal antibody for C/EBP β : The subnuclear localization of C/EBP β in mouse L929 cells. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 33:34-7, 2014. doi: 10.1089/mab.2013.0069.
6. Tarukado K, Tono O, Ikuta K, Harimaya K, Matsumoto Y, Okada S, Hayashida M, Iwamoto Y, Doi T. Instability of the vertebrae remains following balloon kyphoplasty. *Global Spine J.* 4:89-92, 2014 doi: 10.1055/s-0034-1370790.
7. Doi T, Masumoto Y, Tono O, Tarudado K, Harimaya K, Okada S, Kubota K, Hayashida M, Iwamoto Y. A shallow chest correlates with the aortic position in the normal spine: features resembling those observed in structural scoliosis. *Scoliosis.* 9:14-, 2014. doi: 10.1186/1748-7161-9-14.
8. Okada S*, Saito T, Kawano O, Hayashida M, Matsumoto Y, Harimaya K, Iwamoto Y.

- Sequential changes of ascending myelopathy after spinal cord injury on MRI: A case report of neurological deterioration from paraplegia to tetraplegia. *Spine J.* 14:e9-14, 2014. doi: 10.1016/j.spinee.2014.08.449.
9. Koabayakawa K, Kumamaru H, Saiwai H, Kubota K, Ohkawa Y, Kishimoto J, Yokota K, Ideta R, Shiba K, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Iwamoto Y, Okada S*. Acute hyperglycemia impairs functional improvement after spinal cord injury in mice and humans. *Science Transl. Med.* 6:256ra137, 2014. doi: 10.1126/scitranslmed.3009430.
 10. Harada A, Mallappa C, Okada S, Butler J, Parker S, Lawrence J, Ohkawa Y, Imbalzano A. Spatial re-organization of myogenic regulatory sequences temporally controls gene expression. *Nucleic Acids Res.* 43:2008-21, 2015. doi: 10.1093/nar/gkv046.
 11. Matsumoto Y, Matsumoto K, Harimaya K, Okada S, Doi T, Iwamoto Y. Scoliosis in patients with multiple hereditary exostoses. *Eur Spine J.* 24:1568-73, 2015. doi: 10.1007/s00586-015-3883-4.
 12. Hatano M, Matsumoto Y, Fukushi J, Matsunobu T, Endo M, Okada S, Iura K, Kamura S, Fujiwara T, Iida K, Fujiwara Y, Nabeshima A, Yokoyama N, Fukushima S, Oda Y, Iwamoto Y. Cadherin-11 regulates the metastasis of Ewing sarcoma cells to bone. *Clin Exp Metastasis.* 32:589-91, 2015. doi: 10.1007/s10585-015-9729-y.
 13. Yokota K, Koabayakawa K, Kubota K, Miyawaki A, Okano H, Ohkawa Y, Iwamoto Y, Okada S*. Engrafted neural stem/progenitor cells promote functional recovery through interactive synaptic reorganization with spared host neurons after spinal cord injury. *Stem Cell Reports.* 5:264-, 2015. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.06.004.
 14. Doi T, Tono O, Tarukado K, Harimaya K, Matsumoto Y, Hayashida M, Okada S, Iwamoto Y. A new sagittal parameter to estimate pelvic tilt using the iliac cortical density line and iliac tilt: a retrospective X-ray measurement study. *J Orthop Surg Res.* 10:115-, 2015. doi: 10.1186/s13018-015-0262-0.
 15. Yague I, Okada S, Ueta T, Maeda T, Mori E, Kawano O, Takao T, Sakai H, Masuda M, Morishita Y, Shiba K. Risk factors for adjacent segment pathology requiring additional surgery after single level spinal fusion: Impact of pre-existing spinal stenosis demonstrated by preoperative myelography. *Eur Spine J*, in press 2015. doi: 10.1007/s00586-015-4185-6.
 16. Saiwai H, Okada S, Miyazaki K, Nakano R, Iwamoto Y, Tsuchiya K. Clinical features and surgical management of rare cases of thoracic intraspinal cysts: Report of 3 cases. *J Orthop Sci*, in press 2015. doi: 10.1016/j.jos.2015.09.004.
 17. Bekki H, Harimaya K, Matsumoto Y, Hayashida M, Okada S, Doi T, Iwamoto Y. The Position of the Aorta Relative to the Vertebrae in Patients with Lenke Type 1 Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine*, in press 2015. doi: 10.1097/BRS.0000000000001257.
 18. Matsumoto Y, Harimaya K, Kawaguchi K, Hayashida M, Okada S, Doi T, Iwamoto Y. Dumbbell scoring system: a new method for the differential diagnosis of malignant and benign spinal dumbbell tumors. *Spine*, in press 2016
 19. Yokota K, Saito T, Koabayakawa K, Kubota K, Hara M, Murata M, Ohkawa Y, Iwamoto Y, Okada S*. The feasibility of in vivo imaging of infiltrating blood cells for predicting the functional prognosis after spinal cord injury. *Scientific Reports*, in press 2016. doi: 10.1038/srep25673.
 20. Okada S*, Chang C, Chang G, Yue JJ. Venous hypertensive myelopathy associated with cervical spondylosis. *Spine J*, in press 2016
- 〔雑誌論文〕(計 件)
 〔学会発表〕(計 件)
 〔図書〕(計 0件)
 〔産業財産権〕
 出願状況(計 0件)
 取得状況(計 0件)
- 〔その他〕
 ホームページ等
<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003217>
- 6 . 研究組織
 (1)研究代表者
 岡田 誠司 (OKADA SEIJI)
 九州大学・医学研究院・特別准教授
 研究者番号：30448435
 (2)研究分担者 なし