

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19591696
 研究課題名（和文）ES細胞および骨髄間質幹細胞の脳内共同移植療法の開発
 —脳出血モデルでの検討—
 研究課題名（英文）Co-transplantation of ES Cells and Bone Marrow Stromal Cells For
 Cerebral hemorrhage
 研究代表者
 吉川 正英（YOSHIKAWA MASAhide）
 奈良県立医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：50230701

研究成果の概要：脳出血後の機能回復を目指して、ES由来神経幹細胞（ES-NSC）および骨髄間質幹細胞（BM-MSC）の共同移植を行った。脳出血モデルラットを作成し、9日目に病巣部に 10^6 個ずつを共同移植した。ES-NSC単独移植群と比較して、共同移植群に行動学的に有意な改善は認めなかったが、病巣近傍脳に多数のES細胞由来神経細胞を認めた。共培養実験では、ES-NSC分画に残存して含まれた未分化ES細胞に由来する未分化関連指標の早期消失と神経系分化指標の出現促進が観察された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科

キーワード：脳血管障害・ES細胞・骨髄幹細胞

1. 研究開始当初の背景

脳出血後の機能回復にはリハビリテーション以外に有効な機能回復療法が無いのが現状である。中枢神経の自己再生能は極めて乏しく、組織破壊の著しい脳出血では、内在性の再生能力を最大活用しても修復には限界がある。そこで、細胞移植治療が有効となる可能性がある。ES細胞は高い増殖能と分化全能性を有し、in vitroにおける豊富な細胞供給と、神経系細胞にも分化可能で、神経疾患の細胞移植治療の細胞源として有望である。一方、骨髄間質幹細胞は、ES細胞には劣るが、なお高い増殖性と多分化

能を有し、さらに種々の栄養増殖因子産生により組織修復を促すことが知られている。それゆえ、本研究では、脳出血後の機能回復を目指して、ES由来神経幹細胞および骨髄間質幹細胞の共同移植による脳出血に対する細胞移植療法の開発を行うこととした。ES由来神経幹細胞および骨髄間質幹細胞を同時に病巣部へ共同移植することにより、主としてES由来神経幹細胞による「材料」供給と骨髄間質幹細胞による「環境」整備による脳再生を通じて脳出血後の機能回復療法の開発を試みた。

2. 研究の目的

脳出血モデル動物にES細胞由来神経幹細胞 (ES-NSC) および骨髄間質幹細胞 (BM-MSc) を共同移植し、本療法の有用性を明らかにすることを目的とした。

片側大脳半球にコラゲナーゼ液を定量的に注入して脳出血モデルラットを作製した。注入9日後、病巣内にマウスES細胞由来神経幹細胞 (ES-NSC) および骨髄間質幹細胞 (BM-MSc) をそれぞれ単独あるいは共同に移植し、まず、疾病ラットの行動学的改善を評価した。次に、血腫腔および近傍脳における移植細胞の存在とそれらの神経系細胞への分化を組織化学的に検討した。また、ES細胞とBM-MScとをin vitroにて共培養し、ES細胞の神経系細胞への分化に及ぼすBM-MScの影響を明らかにする。本研究の成果を、将来のヒトES細胞および骨髄間質幹細胞を用いた幹細胞共同移植療法の開発の一助とする。

3. 研究の方法

(1) 移植細胞の準備

① ES細胞由来神経幹細胞 (ES-NSC) の調整

GFP蛍光で標識した129系マウス由来ES細胞を使用した。LIF無添加培養液にて4日間 hanging drop 培養して胚様体を作製し、その胚様体を無血清下に、神経系分化選択性が高いITSFn(Insulin/ Transferin/ Selenium/ Fibronectin)培養液にて6日間付着培養し、その後 FGF2 を添加してさらに6日間培養し、nestin 陽性の高純度な神経幹細胞集団を準備した。

② 骨髄間質幹細胞 (BM-MSc) の調整

5-7週齢C57BL/6マウスの大腿骨および脛骨より骨髄を採集し培養にて、浮遊性造血系細胞を除去し、付着性の間質幹細胞集団を得た。トリプシンにて剥離採集して、poly(D)-lysine をコートした培養皿にて2日間培養しBrdU標識(24時間)を施した。

(2) ES-NSC と BM-MSc の共培養

ES-NSC分画にわずかに残存する未分化ES細胞に分化を誘導することを目的として、ES-NSCとBM-MScを液性因子透過膜を隔壁として共培養し、未分化指標(Oct3/4, Nanog, Sox2)および神経分化指標(Nestin, Map2, GFAP)の遺伝子発現をRT-PCRにて解析した。FGF2添加後6日目ES-NSC (ES-NSC(d6))にはすでに未分化指標は消失していたため、この共培養にはなお未分化指標マーカー発現の認められる

FGF2添加後2日目ES-NSC (ES-NSC(d2))を使用した。

(3) 脳出血ラット作製と細胞移植実施およびその後の行動評価

① 脳出血ラット作製

Fisher344系雄ラット(体重160-180g)の右脳線条体に0.20Uのコラゲナーゼを含む生理食塩水2.0ulを30-gage針をつけたHamilton syringeにて注入して脳出血モデルを作製した。移植細胞はコラゲナーゼ注入後9日目に出血病巣へ注入した。移植細胞により脳出血モデルラットを次の4群に分けた。Group 1は細胞移植なしの無移植群、Group 2はES-NSC^{10⁶}個を移植したES-NSC移植群、Group 3はBM-MSc^{10⁶}個を移植したBM-MSc移植群、Group 4はESNSCおよびBMMSCをそれぞれ10⁶個ずつ同時に混合して移植した(ES+MSc)移植群。

② 行動評価

2つの行動評価テスト(rotarod testおよびlimb placing test:いずれもStroke 2003:2258-63に準じる)およびapomorphine誘発回転運動を、コラゲナーゼ注入日をDay 0として、Day -1とDay 7よりDay 56までの毎週1回実施した。

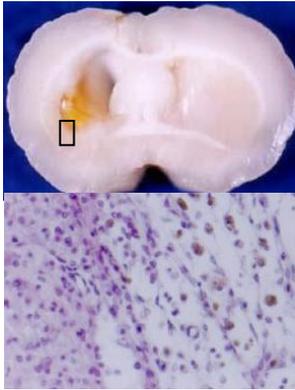
(4) 移植巣の組織学的観察

麻醉下で経心臓的に冷PBS、つづいて4% paraformaldehyde(in PBS)で環流した後、脳を摘出し、4% paraformaldehydeにて24時間固定した。30% sucrose処置の後凍結し、厚さ30umの凍結切片を作製した。血腫腔および周辺脳の評価のために、針刺入部(脳表より視診可能)を含む冠状断面と、その1.0mm前および1.0mm後の3平行面で切断した。前および後方向に1mm間隔部で切片を作製し、全脳組織評価の試料とした。観察時期はDay 9(移植直前), Day 16, Day 37, Day 56とした。

免疫染色では、骨髄間質幹細胞およびこれらより分化した細胞は抗BrdU抗体にて、またES細胞由来神経幹細胞およびこれらより分化した細胞は抗GFP抗体にて鑑別した。細胞種判別マーカーとして、抗nestin抗体(神経幹細胞)、抗NeuN抗体・MAP2抗体(神経細胞)、抗GFAP抗体(astrocyte)、抗NG2抗体(oligodendrocyte progenitor cell)、抗O4抗体(oligodendrocyte)を使用し、BrdU(あるいはGFP)陽性細胞を二重染色にて評価した。

4. 研究成果

(1) コラゲナーゼ注入による脳出血モデルラットの作成



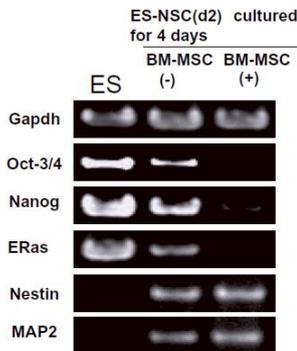
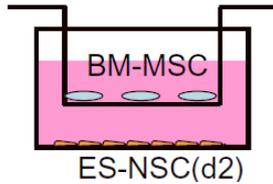
まず、コラゲナーゼ注入法の脳出血モデルとして妥当性を検討した。注入9日目後のマクロおよびミクロの脳組織像を示す。組織の欠損する血腫腔の形成を認め、腔壁にはヘモジデリン貪食細胞を認めた。

(2) ES-NSC と BM-MSC との共培養

—残存未分化 ES 細胞の分化促進—

EB を無血清 ITSFn 培地にて 6 日間付着培養した ES-NSC (d6) では Oct3/4 等未分化指標は RT-PCR で検出できず、培養 2 日目の ES-NSC (d2) では検出可能であった。それ故、ES-NSC (d2) と

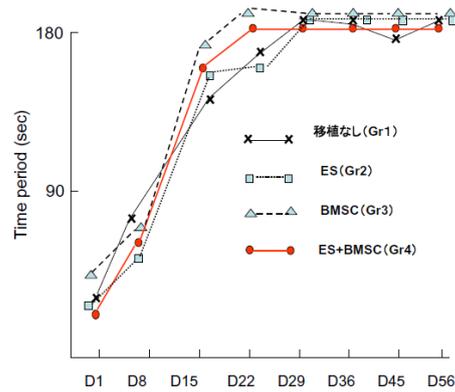
BM-MSC を液性因子透過膜を隔壁として 7 日間共培養した。未分化指標群 (Oct3/4, Nanog, Eras) は共培養により消失し、一方単独培養ではなおこれらの遺伝子発現を認めた。また、神経幹細胞指標 nestin および神経細胞指標 MAP2 の遺伝子発現を認めた。アストログリア、オリゴグリアの指標である GFAP や O4 の発現は認めなかった。



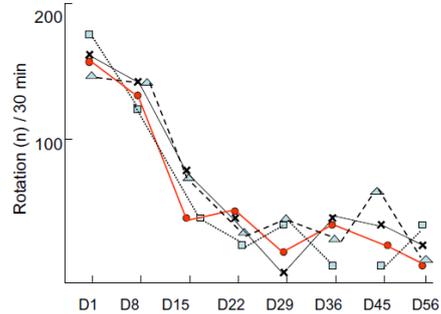
(3) 行動評価

rotarrod 試験 (6 回/分) および apomorphine 誘発回転運動試験 (30 分観察) の成績を次に図示する。横軸はコラゲナーゼ注入日を Day0 (D0) とした時間軸、縦軸はそれぞれ rotarrod 上滞在時間 (秒)、誘発回転数である。予測に反して、無移植群と比較して、いずれの移植群 (ES-NSC 移植群、BM-MSC 移植群あるいは共移植群) においても行動学的改善効果は認めなかった。また、各移植群間にも有意な差を認めなかった。Limb placing 試験においても同様に改善は認めなかった。

rotarrod 試験

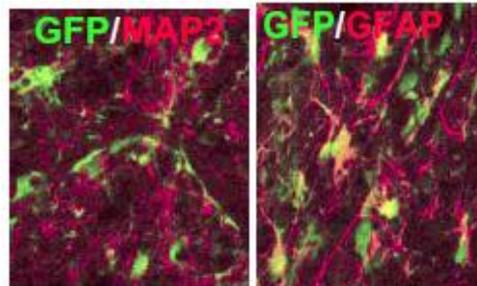


apomorphine 誘発回転運動試験

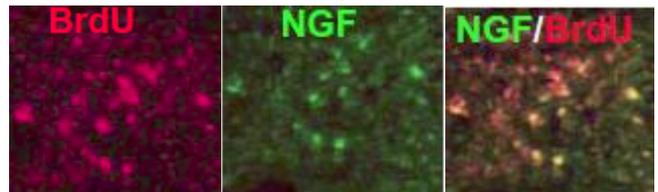


(4) 組織学的評価

① ES 細胞由来神経およびグリア細胞の生着
血腫腔の組織充填は生じていなかったため腔側壁脳を組織学的観察した。ES 細胞に由来する GFP 陽性の神経 (MAP2 陽性) 細胞およびアストロサイト (GFAP 陽性) を認めた。



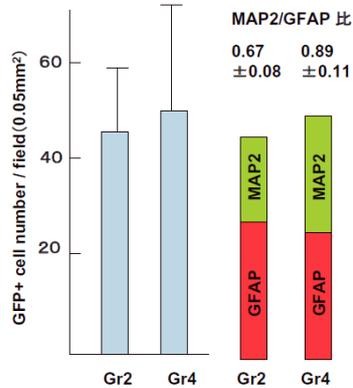
一方、BM-MSC 由来 (BrdU 陽性) の神経系細胞は認めなかったが、BM-MSC は生着し、神経栄養因子 NGF を産生が認められた。



オリゴグリアマーカー陽性を示す細胞への分化は認めなかった。また、腫瘍形成は肉眼および顕微鏡下観察でも認めなかった。

② ES 細胞由来神経細胞優位の誘導

ES-NSC 移植群 (Gr2) および共移植群 (Gr4) において、最大径を示す血腫腔の側壁の一定深部 (0-250um) 実質における ES 細胞由来 GFP 陽性細胞数および MAP2 陽性神経あるいは GFAP 陽性アストログリア細胞数をカウント (200um x 250um 顕微鏡 20 視野) した。両群において ES 細胞由来神経系細胞細胞数 (MAP2 あるいは GFAP 陽性の細胞数の和) に有意差は認めなかったが、共移植群 (Gr4) においては GFAP 陽性細胞に対する MAP2 陽性神経細胞の分化比率が高かった。



(5) その他の成績

- ① 第1研究年度 (2007) には、4 日目胚様体 (EBs) を神経分化最適濃度の 100-1000 倍 $5 \times 10^{-8} M$ (神経分化最適濃度の 1/1000-1/100) のレチノイン酸にて 4 日間処理した未分化 ES 細胞を含む EBs を BM-SMC と共培養し、未分化指標の消失を観察した。
- ② 第2研究年度 (2008) には、B6 マウスの右大脳にコラゲナーゼを注入し、マウス脳出血モデルを作成し、共同移植実験を行った。行動学的改善を期待したが、ラットモデルと同様に共同移植において有意な改善効果は認められなかった。しかし、血腫腔の側壁脳の組織学的観察では、GFP 陽性でかつ MAP2 あるいは GFAP 陽性細胞の存在を認め、共移植では MAP2 陽性細胞比が高かった。
- ③ ラット (およびマウス) 脳出血モデル移植針刺入ルートに GFP 陽性細胞を認め、それらは MAP2 あるいは GFAP 陽性であった。
- ④ 脳室壁 (移植側) にも GFP 陽性細胞の付着を認め、それらは nestin あるいは MAP2 陽性であった。

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 2 件)

- ① Matsuda Ryosuke, Yoshikawa Masahide, Nishimura Fumihiko, 他 11 名
Cotransplantation of Mouse Embryonic Stem Cells and Bone Marrow Stromal Cells

Following Spinal Cord Injury Suppresses Tumor Development.

Cell Transplantation 18:39-54, 2009
査読有

- ② Toriumi Hayato, Yoshikawa Masahide, Nishimura Fumihiko, 他 7 名

Treatment of Parkinson's disease model mice with allogeneic embryonic stem cells: necessity of immunosuppressive treatment for sustained improvement.

Neurol Res. 31:220-227, 2009
査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Matsuda Ryosuke, Yoshikawa Masahide, 他 5 名。

Co-transplantation of ES Cells and Bone Marrow Stromal Cells for Spinal Cord Injury Suppresses Tumor Development
2007 Shanghai International Symposium on Stem Cell Research
(2007.11.6 Shanghai, Republic of China)

- ② 松田良介、中瀬裕之、木村 新、西村文彦、吉川正英、榊 寿右
脊髄損傷に対するES細胞移植治療の問題点
第23回日本脊髄外科学会
(H20年6月12日 宮城県宮城郡松島町 ホテル松島大観荘)

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 正英 (YOSHIKAWA MASAHIDE)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 50230701

(2) 研究分担者

西村 文彦 (NISHIMURA FUMIHIKO)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 70433331
和中 明生 (WANAKA AKIO)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 90210989

(3) 連携研究者

無