

平成22年4月30日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591697
 研究課題名（和文）骨髄間質細胞の神経栄養効果と分化誘導作用
 -そのメカニズムと再生医療への応用-
 研究課題名（英文）Neurotrophic and neuralizing activities of bone marrow stromal cells

研究代表者
 中尾 直之（NAKAO NAOYUKI）
 和歌山県立医科大学・医学部・講師
 研究者番号：30301435

研究成果の概要（和文）：本研究プロジェクトの主要検討課題は骨髄間質細胞が有する（1）神経栄養効果と（2）神経分化誘導作用の検討およびそれらのメカニズム解明である。骨髄間質細胞培養由来の条件培養液は培養ドーパミンニューロンの生存をより高め、胚性細胞のドーパミンニューロンへの分化も促進させた。以上の結果より、骨髄間質細胞由来の神経分化誘導作用は特にドーパミンニューロンへの分化誘導を促進し、将来パーキンソン病の再生医療に応用可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The present study was designed to test the neurotrophic and neuralizing activities of bone marrow stromal cells (BMSC) derived from adult mice. Treatment with conditioned media derived from BMSC cultures significantly prevented the death of dopamine (DA) neurons in *in vitro*. BMSC also facilitated an efficient induction of DA neurons from ES cells. The present study indicates that BMSC may have the neurotrophic and neuralizing activities, and raises the possibility that they can be applied in regenerative cell therapy in Parkinson's disease.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|------|---------|---------|---------|
| 19年度 | 1500000 | 450000 | 1950000 |
| 20年度 | 1300000 | 390000 | 1690000 |
| 21年度 | 700000 | 210000 | 910000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3500000 | 1050000 | 4550000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：再生医療

1. 研究開始当初の背景

骨髄間質細胞 (bone marrow-derived stromal cells, BMSC) が骨・軟骨・脂肪細胞への多分化能を有することは以前より知られており、最近ではBMSCからの神経細胞への分化誘導も報告され、その神経再生医療への応用が期待されている。しかし、誘導される神経細胞は極めて少数であり、現時点ではBMSCを細胞療法に応用することは困難と言わざるを得ない。過去に報告されたこれらの分化誘導の研究は全てBMSC自体の多分化能に注目したものであるが、我々はBMSCが有する1) 神経栄養効果と(2) 神経分化誘導作用に着目し、神経再生医療応用への可能性を模索してきた。特に、パーキンソン病に対する再生・移植療法を目指し、(1) 中脳ドーパミン細胞の保護作用や(2) 胚性幹細胞からの神経細胞への分化誘導作用を、平成16年度基盤研究(C)などを通じて明らかにしてきた(参考文献(1)、(2)、(3))。本研究プロジェクトでは、これまでの研究結果をふまえて、神経栄養効果と神経分化誘導作用のメカニズムの解明とこれらの効果を効率良く引き出す方策を確立し、再生医療応用に向けて一歩近づきたい。

<参考文献>

(1) 新谷亜紀、中尾直之、板倉 徹：骨髄間質細胞からの神経幹細胞の誘導。「脳神経外科学大系 1巻 神経科学」河瀬 武 他編、中山書店、東京、pp 328-335, 2006

(2) 中尾直之、新谷亜紀、垣下浩二、板倉 徹：細胞移植療法。脳神経外科 32: 977-984, 2004

(3) 新谷亜紀、中尾直之、垣下浩二、板倉 徹：骨髄間質細胞の神経再生療法へ

の応用：その神経栄養効果と神経分化誘導作用。再生医療 3: 53-60, 2004

2. 研究の目的

平成16年度基盤研究(C)で明らかにした骨髄間質細胞 (bone marrow-derived stromal cells, BMSC) が有する(1) 神経栄養効果と(2) 神経分化誘導作用の発現メカニズムの解明を試みる。効果発現機序の解明の具体的な方法として、神経栄養効果では骨髄間質細胞由来 growth factor の同定と定量、また神経分化誘導作用では神経発生に重要な役割をになう分子として注目されている **Noggin** の関与について明らかにする。さらに、胚性幹細胞 (ES 細胞) から分化誘導したドーパミン細胞が生物学的な機能を発揮するか否かを検討するために、同細胞のパーキンソン病モデルラットへの移植も行う。

3. 研究の方法

研究プロジェクトの前半(平成19年度～平成20年度)では、培養実験を通じて骨髄間質細胞 (bone marrow-derived stromal cells, BMSC) が有する神経栄養効果と分化誘導作用のメカニズム解明にあてた。成熟ラットもしくはマウスの長幹骨の骨髄から骨髄間質細胞の分離、培養を行った。培養細胞がほぼ **confluent** になった状態で、無血清培地に置き換え24時間放置した。その上清を採取して条件培養液として利用した。

(1) 神経栄養効果メカニズムの解明

① 胎齢14日のラット胎仔ドーパミン細胞を条件培養液で培養し、生存維持効果や神経毒である 6-hydroxydopamine に対する神経保護作用を免疫組織化学による定量

評価により検討した。

② 条件培養液中に含有される各種神経栄養因子 (GDNF, BDNF, FGF 等) を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)により定量した。

(2) 神経分化誘導のメカニズムの解明
胚性幹細胞 (ES 細胞) の神経分化誘導の条件を骨髄間質細胞(BMSC)と共培養と BMSC 培養由来条件培養液によるインキュベーションの二つの条件を設定した。それぞれの条件下に sonic hedgehog と FGF8 を添加して、以下の項目を検討した。

① 分化誘導中の ES 細胞における Noggin の mRNA の経時的発現変化を RT-PCR 法で評価し、またそれらの発現量をリアルタイム PCR 法で測定した。

② 神経分化誘導に対する BMP-4 処置の影響を検討した。分化誘導の程度の評価法として、PCR 法や免疫組織化学による発現分子の定量評価や分化誘導された神経細胞数やドーパミン細胞数の算定を行った。

(3) 分化誘導神経細胞の脳内移植
胚性幹細胞 (ES 細胞) から分化誘導したドーパミン細胞が生物学的な機能を発揮するか否かを検討するために、同細胞のパーキンソン病モデルラットへの移植も行った。神経毒である 6-hydroxydopamine を脳内に注入して作成したパーキンソン病モデルラットの線条体へ骨髄間質細胞を用いて分化誘導したドーパミン細胞を移植した。移植後、同モデルラットに認められるアンフェタミンによって誘発される異常回転運動を定量評価した。さらに、移植後5週目にはラットを安楽死させて、脳の組織学的検査を行い、移植細胞の生着状態を調べた。

4. 研究成果

(1) 神経栄養効果メカニズムの解明

骨髄間質細胞の条件培養液は次の効果を発揮した。すなわち、(1) ドーパミン細胞の無血清培養下での細胞死を有意に軽減し、(2) 神経毒性である 6-hydroxydopamine のドーパミン細胞に対する障害を有意に減弱させた。さらに、骨髄間質細胞の条件培養液は、これらの (1) (2) のような神経細胞の生存を促進するという効果のみならず、神経細胞の形態にも変化をもたらした。すなわち、培養ドーパミン細胞の形態についてデジタルイメージング解析を行った結果、骨髄間質細胞 (BMSC) の条件培養液で処置した培養ドーパミン細胞は対照に比べて有意に神経突起を伸長・分枝することが判明した。また、条件培養液は GDNF, BDNF, FGF などの神経栄養因子を含有することを ELISA により証明した。

(2) 神経分化誘導のメカニズムの解明

骨髄間質細胞の条件培養液により胚性幹細胞(ES 細胞)の神経分化誘導を促進させることができた。また、神経分化誘導させた後、ソニックヘッジホッグと FGF8 を作用させることによりドーパミン細胞にも高率に分化誘導させることができた。また、このような分化誘導中に ES 細胞において Noggin の経時的に増加を認めた。さらに、神経分化誘導に対する BMP-4 の影響を検討した結果、BMP-4 は骨髄間質細胞による神経分化誘導効果を有意に抑制した。これらの結果から、骨髄間質細胞による神経分化誘導は神経発生に重要な役割をになう分子である Noggin の発現を伴い、その機序として BMP 少なくとも一部 BMP-4 の抑制の関与が示唆された。

(3) 分化誘導神経細胞の脳内移植

骨髄間質細胞由来の分化誘導活性により ES 細胞から分化したドーパミンニューロンは培養液中に多量のドーパミンを分泌しうることを高速液体クロマトグラフィーによ

り確認した。次に、これらドーパミンニューロンを高率に含有した分化神経細胞をパーキンソン病モデルラットの線条体に移植した。移植後、パーキンソン病モデルラットの異常行動（アンフェタミンによって誘発される異常回転）は有意に改善した。さらに、移植して5週間後に行った組織学検査では脳内に多数のドーパミン細胞の生着を認めた。

以上の結果より、骨髄間質細胞は神経保護効果および神経分化誘導作用が明らかとなった。特にドーパミンニューロンに対する効果は著明であり、骨髄間質細胞が将来パーキンソン病の再生医療に応用可能であることが示唆された。

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) 垣下浩二、新谷亜紀、中尾直之、他、再生療法 神経幹細胞、日本臨床、67巻、2009、435-439.
- (2) Shintani A, Nakao N, et al, Generation of dopamine neurons from embryonic stem cells in the presence of the neuralizing activity of bone marrow stromal cells derived from adult mice, Journal of Neuroscience Research, 査読あり, Vol 86, 2009, 2829-2838.
- (3) Shintani A, Nakao N, et al, Protection of dopamine neurons by bone marrow stromal cells, Brain Research, 査読あり, Vol 1186, 2008, 48-55.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 直之 (NAKAO NAOYUKI)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：30301435

(2) 研究分担者

板倉 徹 (ITAKURA TORU)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40100995

(3) 連携研究者

該当者なし