

機関番号 : 34441
研究種目 : 基盤研究 (B)
研究期間 : 2008~2010
課題番号 : 20300122
研究課題名 (和文) 脊髄再生に対する細胞移植の効果とそのメカニズム
—形態学的解明と有効因子の解析—
研究課題名 (英文) Cell transplantation for the treatment of spinal cord injury in rats
— morphological study and search for humoral effective factors —
研究代表者
井出 千束 (IDE Chizuka)
藍野大学・医療保健学部・教授
研究者番号 : 70010080

研究成果の概要 (和文) :

(1) 骨髄間質細胞の移植

- a. 脊髄損傷部内への直接移植: 細胞移植ラットは、BBB10ポイント前後まで回復した。再生軸索がコラーゲン線維を含むマトリクス内を伸び、損傷部を架橋した。移植細胞は2週前後で消失した。
- b. 髄液経路による間接移植: 細胞を第四脳室より注入した。BBB は10~13で、所見は上記と同様であった。

骨髄間質細胞は髄液経路投与で、亜急性・慢性期のいずれも有効である。移植効果は骨髄間質細胞が分泌する液性因子による。

(2) 培養上清に含まれる有効因子

培養上清には、IGF-1, HGF, VEGF, TGF- β 1 が含まれている。また培養上清には未知の成長因子が含まれることを示した。

研究成果の概要 (英文) :

(1) Transplantation of bone marrow stromal cells (BMSCs)

(a) Direct injection of BMSCs into the spinal cord lesion

BMSCs (5×10^5) were injected into the spinal cord lesion 2 weeks after injury, and rats were observed for 4 weeks post-transplantation. Locomotion of rats was recovered up to about 10 points of BBB scale, with the control points of 4-5. Numerous regenerating axons extended through the lesion from the rostral to distal border. Electron microscopy showed that regenerating axons were surrounded by Schwann cells in the collagen fibril matrices. BMSCs disappeared within 2 weeks post transplantation, indicating that they were never incorporated into the spinal cord.

(b) Transplantation through the cerebrospinal fluid (CSF)

BMSCs (5×10^5) were injected into the 4th ventricle 1, 2, and 4 weeks after spinal cord injury.

Locomotion of cell-injected rats was recovered up to 10-13 points of BBB scale, while those of control remained at 0-4. Regenerating axons extended in bundles bridging the lesion between the rostral and distal margin. Regenerating axons extended through the collagen fibril matrices and were surrounded by Schwann cells. This shows that regenerating axons are in the same environment as peripheral nerves. Injected BMSCs disappeared from the spinal cord 2 weeks after injection, indicating that BMSCs exert their effects not by integration into the spinal cord, but probably by secreting some trophic factors in to the CSF.

(2) Effective factors contained in the conditioned medium of BMSCs

It was demonstrated that the conditioned medium (CM) contained IGF-1, HGF, VEGF, and TGF- β 1. Cultured hippocampal neurons had receptors of IGF-1 and TGF- β 1. They showed no changes in density by the treatment of CM. These trophic factors, when they were used single or in combination of 2, 3 and 4 factors to treat cultured hippocampal neurons in vitro, did not show the same effect level of cell viability and neurite extension as the case of CM. This suggests that the CM may contain some unidentified trophic factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：総合領域

科研費の分科：神経科学

細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経再生、移植・再生医療、脊髄再生、再生医学、栄養因子、骨髄間質細胞

1. 研究開始当初の背景

(a) これ迄の研究成果

研究代表者は急性期脊髄損傷に対して、骨髄間質細胞の髄液内投与が効果的であることを明らかにした (Ohta et al. 2004, *Exp Neurol* 187: 266-278)。これを基に、厳密なプロトコルの下で臨床応用を行うまでに進めた (Saito et al. 2007, *J Trauma*, 申請当時 in press)。これは脊髄損傷に対する細胞移植の臨床例として日本の最初であり、国際的にも先駆的である。さらに、骨髄間質細胞を含む骨髄単核球を

分離して培養せずに直接移植しても、同じ効果が得られることを明らかにした (Yoshihara et al. 2007, *J Neurotrauma* 24: 1026-1036)。

この効果は、骨髄間質細胞から放出される液性因子によって、ニューロンやグリア細胞の変性が阻止された結果であると考えられた。本研究の目的の一つは、骨髄間質細胞の分泌する成分を分析し、特定の有効分子を同定することである。

一方、慢性期脊髄損傷では世界的に細胞移植が研究されている。本研究では、急性期の成果を基に、慢性期脊髄損傷に対して、これ

らの移植細胞が歩行の改善と組織学的な修復をもたらすかを調べる。

(b) 国内外の状況

細胞移植では、嗅神経鞘細胞、マクロファージ、骨髄間質細胞、胎児組織、などの移植が試みられている

胎児由来神経幹細胞、ES細胞、及び胎児組織は、倫理的に、「再生研究」には適さない。

骨髄間質細胞は、自家移植が可能であることと、幹細胞、体細胞いずれも含まれるが、自己の細胞であることから、最も安全な細胞である。

2. 研究の目的

◇ 骨髄間質細胞の培養液に含まれるニューロン生存および突起伸長促進因子の同定。

急性期には、細胞移植よりは有効液性因子の投与が優れた治療方法と考えられる。骨髄間質細胞の効果は単独の栄養因子によるものではなく複合的なものと考えられる。また新しい栄養因子が含まれる可能性がある。

◇ 慢性期脊髄損傷において、細胞の移植によって、歩行運動の改善及び組織学的な修復と軸索伸張効果を調べる。移植する細胞は骨髄間質細胞、成体由来神経幹細胞、および脈絡叢上皮細胞である。

骨髄間質細胞は自家移植が可能である点で最も注目される細胞である。慢性損傷脊髄の空洞内への移植（神経系の細胞に分化するしないは別として）による効果を調べる。次に、神経幹細胞の移植効果を調べる。神経幹細胞には胎児から採る細胞と成人脳から採る細胞がある。ES細胞を含めて、胎児由来の細胞は倫理的な制約が多い。「再生研究」を標榜する限

り、実際に人に応用される可能性のある細胞の研究をするべきである。成体ラットの脳から、或は成体の死後間もなくの脳から神経幹細胞が採れることは我々の研究で既に示されている (Xu et al. 2003 *Neurosci Res*, 74: 533-540)。さらに、脈絡叢上皮細胞の移植効果を調べる。脈絡叢上皮細胞が *in vitro* でニューロン生存と突起伸長作用があり (Watanabe et al. 2005, *Neurosci Lett* 379: 158-163)、脈絡叢上皮細胞を切断脊髄内への移植によって、無数の再生軸索が移植片に入る。

本研究では、慢性期損傷脊髄に対する脈絡叢上皮細胞の移植効果を調べる。また、これらの細胞を組み合わせることで一緒に移植（共移植）することによる相乗効果を検討する。

◇ 骨髄間質細胞は予め分化させて移植する場合の効果も調べる。

連携研究者の出沢真理京都大学准教授(当時)の方法によって、骨髄間質細胞をシュワン細胞あるいは神経前駆細胞にまで分化させて移植をする事で、より効果を高められるかを調べる。

◇ 細胞移植には、人工マトリクスであるアミノ酸ゲルと細胞との混合体による移植効果も調べる。

細胞移植には、移植細胞が流出する問題がある。連携研究者の鈴木義久北野病院部長はこれまで生体用の人工マトリクスを開発して来たが (Ishikawa et al 2007, *J Biomed Mater Res A* 83:33-40)、最近開発したアミノ酸ゲルが細胞保持に優れている。この材料で移植細胞が有効に局所で作用するかを調べる。

◇ 従来の脊髄再生研究は、組織学的な検索がおろそかであった。正確かつ詳しい組織学的検索は効果の評価に最も重要である。免疫組織学と電子顕微鏡によって、詳しく検索する。また、GFPラットをドナーとして、

GFP 標識された移植細胞の移動、分化、および宿主組織との相互関係等を調べる。

3. 研究の方法

本研究は、骨髄間質細胞の培養上清に含まれるニューロン生存・突起伸長因子の分析の *in vitro* 実験と、損傷脊髄への細胞移植による *in vivo* 実験の2つの柱からなる。移植細胞としては、骨髄間質細胞、成体脳由来神経幹細胞、および脈絡叢上皮細胞について移植効果を調べた。移植のドナーには GFP ラットを用い、移植細胞の追跡を可能にし、組織学的な詳しい検索を行った。

4. 研究成果

(1) 亜急性・慢性脊髄損傷ラットに対する骨髄間質細胞の移植

(a) 脊髄損傷部内への細胞移植の場合

ラットの脊髄に控滅損傷を与え、2週間後に、培養骨髄間質細胞を脊髄損傷部に移植し、移植後4週間まで観察した。ラットで損傷後2週という期間は、人では亜急性～慢性期の移行期に相当すると考えられる。細胞は損傷部中心部と、その近位および遠位の宿主脊髄組織内の3か所に、それぞれ $10 \mu\text{l}$ 注入した。総細胞数は 5×10^5 である。ラットの行動はオープンフィールドで毎週観察し、ビデオに撮って、3人の観察者によって BBB スケールで数値化した。(Ide et al. 2010 Brain Res 1332: 32-47 ; Nakai et al. in press, Bone Marrow Transplantation)

この実験によって、次の結果が得られた。

- ラットの行動は顕著に回復した。BBB ポイントは、対照群4～5に対して、移植群10前後であった。
- 再生軸索は束となって損傷部内を

伸びて、損傷部の近位と遠位を橋渡していた。

- 再生軸索はシュワン細胞に包まれ、周りはコラーゲン線維を含む細胞外マトリックスが形成されていた。
- 移植した細胞は損傷部に留まることなく、2週間以内には消失するようである。

(b) 髄液経路による細胞の移植の場合

骨髄間質細胞を損傷部内ではなく髄液内に注入する方法を用いた。これは人で腰椎穿刺によって移植できる可能性があることを示すもので、結果が注目された。この実験では、ラット脊髄の控滅損傷後1、2、4週間の後に細胞移植を行った。この損傷後の期間は、人では亜急性期から慢性期に当たると考えられる。細胞は第4脳室から脳定装置で、PBS $30 \mu\text{l}$ に 5×10^5 の細胞を注入した。

ラットは、上記と同様に、毎週オープンフィールドで歩行の観察を行い、BBB スケールで判定した。組織は、神経線維、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、などを免疫組織化学で染めた。また電子顕微鏡で損傷部組織を調べた。

その結果、下に列記するように、細胞を直接損傷部に移植したと同様の、あるいはそれよりも良好な結果が得られた。

- 歩行は、対照が BBB で 0-4 ポイントに対して、移植群では 11-13 ポイントであった。損傷部直接移植より反って良好であった。
- 移植細胞は移植後1週間までは脊髄の周辺部に散見されたがその後は消失した。
- 移植1週後に観察した限りでは、損傷部内にホーミングする細胞は見られなかった。
- 再生軸索はやはり損創部内を束になっ

て近位から遠位の間を架橋するように伸びていた。

- 再生軸索は、シュワン細胞に囲まれ、細胞外マトリックス内を伸びていた。
- 脊髄の空洞形成は抑えられた。

これらの結果は、以下の様な重要なことを示している。

まず、脊髄内の再生軸索は細胞外マトリックス内をのびるという結果は注目されるべきである。これまでの常識は、脊髄内では、移植細胞が再生軸索の支持体となる、あるいはそれと並行して、アストロサイトやオリゴデンドロサイトが再生軸索を支持して、再生が惹起されると考えられていた。しかし、そのような所見はない。無数の再生軸索が伸びるが、それは新たに形成された細胞外マトリックス内を伸びる、つまり末梢神経と同様な再生様式である。

移植細胞が初期に消失することは予想しなかった。しかし、移植細胞が消失しても移植効果があるということは、恐らく移植初期に細胞から分泌される何らかの因子が働いているものと考えられる。この有効因子は、脊髄損傷部内のマトリックス形成を促進し、同時に、再生軸索の伸長を促進しているものと考えられる。それに加えて、変性していく運命にある神経系細胞（ニューロンやグリア細胞）の生存維持にも寄与していると考えられる。

(2) 培養上清に含まれる有効因子の探索

in vivo の移植結果から、骨髄間質細胞が何等かの有効因子を分泌していると考えられた。それを確かめるべく、*in vitro* の実験を行い、骨髄間質細胞の培養上清には、ニューロンの生存維持と突起伸長促進作用があることが明らかとなった。培養上清に含まれる栄養因子の分析で、培養上清には *insulin-like*

growth factor (IGF-1), *hepatocyte growth factor* (HGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *transforming growth factor* (TGF)- β 1 が含まれていることが明らかとなった。また、ニューロン表面には、IGF-1 と TGF- β 1 の受容体が発現されている。しかし、培養上清を作用させてもその発現量には変化がなかった。上記の成長因子をそれぞれ単独で、あるいは組み合わせてニューロンに作用させるバイオアッセイを行ったが、培養上清そのもの作用と同程度の効果は得られなかった。

このことは、上記の同定された成長因子の他に未知の有効因子が含まれていることを示唆している (Nakano et al. *Neurosci Lett* 483: 57-61, 2010)。その後の研究から、有効因子は一定範囲内の分子量をもつ分子であることが分かった。我々は現在この分子の同定を進めている。

(なお、研究目的に掲げた、脈絡叢上皮細胞、成体由来神経幹細胞、骨髄間質細胞由来シュワン細胞、および人口マトリックスを用いた移植実験についてはまだ結果が出ていない。)

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)

学術雑誌

- ① Nakano N, Nakai Y, Seo TB, Yamada Y, Ohno O, Yamanaka A, Nagai Y, Fukushima M, Suzuki Y, Nakatani N and Ide C : Characterization of conditioned medium of cultured bone marrow stromal cells. *Neurosci Lett* 483: 57-61, 2010
- ② Ide C, Nakai Y, Nakano N, Seo TB, Yamada Y, Endo K, Noda T, Saito F, Suzuki Y, Fukushima M and Nakatani T : Bone Marrow Stromal Cell Transplantation for Treatment of Sub-acute Spinal Cord Injury in the Rat. *Brain Res* 1332: 32-47, 2010

③ Matsumoto N, Taguchi A, Kitayama H, Watanabe Y, Ohta M, Yoshihara T, Itokazu Y, Dezawa M, Suzuki Y, Sugimoto H, Noda M and Ide C: Transplantation of cultured choroid plexus epithelial cells via cerebrospinal fluid shows prominent neuroprotective effects against acute ischemic brain injury in the rat.

Neurosci Lett 469: 283-288, 2010

④ Nishida H, Nakayama M, Tanaka H, Kitamura M, Hatoya S, Sugiura K, Suzuki Y, Ide C and Inaba T :

Locomotor improvement after autologous bone marrow stromal cell intrathecal delivery in dogs with chronic spinal cord injury.

American Journal of Veterinary Research

(in press)

⑤ Nakai Y, Nakano N, Seo TB, Yamada Y, Noda T and Ide C :

Bone marrow stromal cell transplantation in spinal cord injury. in

Bone Marrow Transplantation: Indications, Procedures and Outcomes

(Nova Science Publishes, N Y, USA).

(in press)

他 1 5 件

〔学会発表〕

17 件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井出 千束 (IDE Chizuka)
藍野大学 医療保健学部・教授
(藍野再生医療研究所)
研究者番号 : 70010080

(2) 研究分担者

中野 法彦 (NAKANO Norihiko)
藍野大学 医療保健学部・准教授
(藍野再生医療研究所)
研究者番号 : 40322721

山田 義博 (YAMADA Yoshihiro)
藍野大学 医療保健学部・教授
研究者番号 : 30252464

(3) 連携研究者

鈴木義久 (SUZUKI Yoshihisa)
田附興風会 北野病院形成外科部長
研究者番号 : 30243025

出沢真理 (DEZAWA Mari)
京都大学医学研究科准教授
研究者番号 : 50272323

谷口直之 (TAGUCHI Naoyuki)
大阪大学微生物研究所教授
研究者番号 : 90002188