

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17946

研究課題名（和文）脊髄損傷由来幹細胞を用いた神経再生療法の開発

研究課題名（英文）Development of regeneration therapy using stem cells derived from spinal cord injury

研究代表者

藏本 要二（Kuramoto, Yoji）

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：10604275

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脳虚血から誘導性される脳虚血性多能性幹細胞を研究してきたが、脳虚血という傷害のみでおこるのか？そして、大脳・小脳以外の中枢神経系から誘導性されないかという学問的問いに対して、今回脊髄損傷という外傷性の障害から誘導されるか？また、脊髄という脳以外の組織からの誘導を試み、マウスモデルを用いて脳虚血性多能性幹細胞と同様な細胞を分離することに成功した。これは虚血・外傷など損傷の種類に関わらず、傷害部位に多能性幹細胞が誘導されることを示した。今後ヒトでの動態を調べる上で、臨床的に脊髄損傷部位は摘出されることがほとんどないため、似たモデルとしてヒト脳出血部からの分離培養を現在試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経系において、様々な疾患・部位でダメージを受けた際にその修復や保護のため、多能性幹細胞を誘導されていることを証明した。一方、間葉系幹細胞を投与することにより、その傷害が軽減することが知られている。我々が発見した傷害誘導性多能性幹細胞は少なくとも様々な分化能を有しており、損傷部位で賦活化ができれば、症状軽減につながる可能性がある。いまのところは特異的な表面マーカーを複数発見できたため、これを元にさらなる解析が期待される。

研究成果の概要（英文）：We have been studying cerebral ischemic pluripotent stem cells induced by cerebral ischemia. And, in response to the academic question of whether they can be induced from central nervous systems other than the cerebrum and cerebellum, we have now asked whether they can be induced from a traumatic injury such as spinal cord injury. In this study, we attempted to induce the pluripotent stem cells from the spinal cord, a tissue other than the brain, and succeeded in isolating cells similar to cerebral ischemic pluripotent stem cells using a mouse model. This demonstrated that pluripotent stem cells can be induced at the site of injury regardless of the type of injury, such as ischemia or trauma. In order to investigate the dynamics of pluripotent stem cells in humans, we are currently attempting to isolate and culture cells from human cerebral hemorrhage sites as a similar model, since spinal cord injury sites are rarely removed in clinical settings.

研究分野：Neurosurgery

キーワード：脊髄損傷 傷害誘導性多能性幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は脳血管障害の急性期疾患の診療に従事し、基礎研究では間葉系幹細胞を用いたマウス脳卒中モデルや脊髄損傷モデルへの治療効果を検証してきた。間葉系幹細胞は基本、他家移植での応用が主流であり、自家移植を考える上で、損傷部位からの幹細胞に着目した。脊髄損傷を受けると患者は感覚障害や麻痺による神経機能障害だけでなく、痙縮や耐え難い疼痛による精神的苦痛を強いられることも少なくない。これまでは、このような患者に対し、リハビリテーションを継続する以外に対処法がなかったが、近年、脊髄損傷モデルに対して神経幹細胞や iPS 細胞(induced pluripotent stem cells)を用いた細胞移植療法の基礎研究が行われ、その有効性が示唆されている[Cell Res. 23, 1, 70-80, 2013]。脳では脳室下帯や海馬歯状回顆粒細胞での内因性神経幹細胞が発見され、損傷時での役割等が明らかとなりつつあるが、脊髄傷害部位における内因性の神経幹細胞に関する検討は未だ、なされていない。一方、我々は兵庫医科大学先端医学研究所(神経再生研究部門)と共同で、脳梗塞時に誘導される新たなタイプの内因性神経幹細胞(脳傷害誘導性神経幹細胞、(Brain ischemic induced-Neural Stem/Progenitor Cells: B-iSCs) [Eur J Neurosci, 29, 1842-1852, 2009] を基盤とした脳梗塞の細胞治療に関する研究を行っている。B-iSCs は脳障害後の髄膜を起源とした血管周皮細胞由来であることから [Stem Cells Dev, 2011, 2012]、損傷脊髄の髄膜からも産生されることは容易に想像される。

本研究では脳以外の脊髄から、虚血でない外傷性損傷から内因性神経幹細胞抽出の経験を持っている我々にしかできない試みであると考えている。本研究により脊髄損傷の治療につながる内因性神経幹細胞を用いた新たな再生医療という新規分野の開拓をもたらし、将来的な臨床研究および治療法の開発につながることを期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、マウスの脊髄損傷モデルを作成し、損傷部位から spinal cord injury induced-Neural Stem cell(SC-iSCs)の単離し、その特性を検討することである。この成果は、将来的な内因性神経幹細胞を基盤とした脊髄再生療法の実現に繋がると期待される。

### 3. 研究の方法

マウスの脊髄損傷モデルを作成し、脊髄損傷部位からの内因性神経幹細胞の単離・抽出を試みた。以前他のマウスを用い、インパクトを用いた圧挫傷脊髄損傷モデルを作成したが、個体生存が難しく、採取した損傷脊髄細胞から細胞分離が困難であった。そこで手技の簡便化、術後の生存率の改善という観点から脊髄損傷をセッシン圧迫法へ変更し、マウス種に関しても再検討し、同様のサイズでより抵抗力が強く、椎弓切除に特別な器具が必要でない C57BL/6 を用いたところ、脊髄損傷後の生存率が高く、また圧迫時間で両下肢の麻痺症状の出現がある程度調整でき、かつ、再現性が高いことが確認できた。またインパクトより狭い術野で作成できるため、作成時間が短縮でき、作成費用も抑制することが可能となった。脊髄損傷作成 3 日後に損傷部位を摘出し、注射針を段階的に補足することで、細胞を分離する簡便な方法で、細胞を分離し作成し、EGF、FGF、N2、2-10%血清を添加した DMEM/F12 培養液を用いて、培養プレートに播種する。数日でプラスチック接着能を持つ細胞が増殖を始め、4-6 週間後で細胞を 0.25%トリプシンで剥がし継代する。

継代培養して数を確保したのち、増殖能試験、細胞染色、フローサイトメトリーでの表面マーカーでの特性確認、RNA マイクロアレイによる細胞解析を行なった。

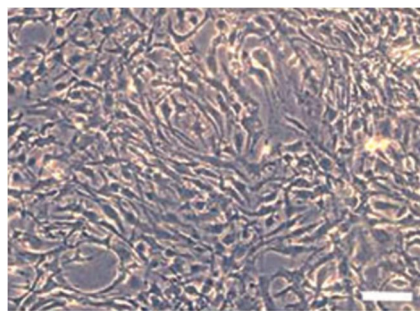


図 1 初期培養写真

### 4. 研究成果

脊髄損傷作成後 3 日後損傷脊髄を採取し、B iSCs と同様の方法で分離培養を行った。脊髄損傷 3 日後の組織を上記条件で培養したところ、増殖する細胞群を得た(図 1)。脊髄損傷後の培養により、増殖細胞の分離が再現性良く確認できている。

分離培養した細胞は脊髄傷害誘導性幹細胞のであるか否か、蛍光法を用いた細胞免疫染色を用いて検討を行った。神経幹細胞マーカーである Nest in, Sox2 を強く発現し、その他神経マーカーである Tuj1 や幹細胞マーカーである Sox2 の発現も一部認められ、ペリサイトマーカーである PDGFR /NG2 は



図 2 分離培養した細胞の PCR

Nestin と共発現を認めた。細胞を PCR すると、山中因子のうち 3 つは陽性であった (図 2)。この細胞群についてマイクロアレイによる DNA 解析を元にした主成分解析で B-iSCs に非常に似た遺伝子背景を持つことを確認した (図 3)。これは従来の間葉系幹細胞 (MSCs) と異なる遺伝子プロファイルを有していることを確認した。FACS でも SC-iSCs は体性組織幹細胞マーカーである SCA-1 を発現がするが MSC マーカーが一部陰影であることから MSCs とは異なる体性幹細胞を持っていると考えられた (図 4)。

SC-iSCs を臨床応用することを考えると臨床的に脊髄損傷部位を摘出することはほとんどない。よって、ヒト脊髄損傷患者からの自家移植は現状困難である。よって、脳虚血以外でヒト脳出血部から同様の細胞が分離培養できるのであれば、脊髄損傷部位の血腫を取り出し、応用が可能となる。よって、マウス・ヒトの脳出血から同様の細胞が取れるかを現在検討している。

また、内因性に SC-iSCs を賦活化する方法として、新規薬剤を探索中であるが現時点で有効な薬剤・物質は見つかっていない。マウスの脊髄損傷に間葉系幹細胞の静脈投与が効果を認めるため、現在脊髄損傷部位での間葉系幹細胞と SC-iSCs との相互作用がないか検討中である。

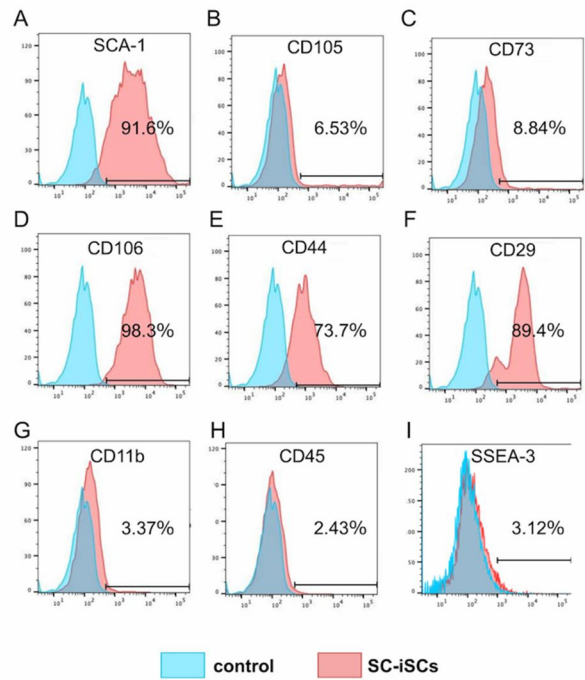


図 4 細胞表面マーカーの FACS 解析

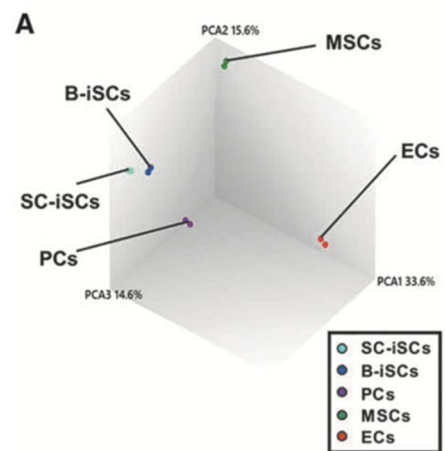


図 4 細胞 DNA マイクロアレイ解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kuramoto Yoji, Takagi Toshinori, Takeda Yuki, Rajbhandari Saujanya, Yoshida Yasunori, Nakagomi Takayuki, Yoshimura Shinichi	4. 巻 31
2. 論文標題 Identification of Novel Multipotent Stem Cells in Mouse Spinal Cord Following Traumatic Injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cells and Development	6. 最初と最後の頁 555 ~ 568
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/scd.2021.0297	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藏本要二, 高木俊範, 陰山博人, 中込隆之, 吉村紳一,
2. 発表標題 脊髄損傷部から障害誘導性多能性幹細胞が発生する
3. 学会等名 日本脊髄外科学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中込 隆之  (Nakagome Takayuki)  (80434950)	兵庫医科大学・医学部・教授	
研究協力者	武田 由紀  (Takeda Yuki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------