

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：34441

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10957

研究課題名(和文) 骨髄間質細胞由来因子による神経再生の解析

研究課題名(英文) Neuronal regeneration by trophic factors secreted from bone marrow stromal cells

研究代表者

中野 法彦 (Nakano, Norihiko)

藍野大学・中央研究施設・准教授

研究者番号：40322721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： 脊髄損傷は、我が国に約10万人の患者がいるものの有効な治療法はない。われわれは、骨髄間質細胞移植がラットおよびヒトの脊髄損傷に対して安全かつ有効であることを報告してきた。本研究で、骨髄間質細胞自体を移植しなくてもその培養上清の投与で脊髄損傷ラットの神経再生および行動の回復を促進させることがわかった。また、骨髄間質細胞は複数の神経再生因子を分泌し、これらの因子が協調して神経再生に携わっていると考えられた。

研究成果の概要(英文)： There is no effective treatments for spinal cord injury (SCI), although there are about 100,000 patients with SCI in our country. We have reported that transplantation of bone marrow stromal cells (BMSCs) is safe and effective against SCI in rats and humans. In this study, it was found that injection of the conditioned medium (CM) of BMSCs promotes axonal regeneration and improves locomotor behaviors in spinal cord injured rats without transplanting the BMSCs themselves. In addition, it was revealed that BMSCs secrete some neurotrophic factors to promote neuronal regeneration, and it seems that the combination of these factors secreted by BMSCs cooperate are effective for neuronal regeneration.

研究分野：細胞生物学

キーワード：神経再生 骨髄間質細胞 脊髄損傷

1. 研究開始当初の背景

我が国において、脊髄損傷患者は約 10 万人に上り、毎年約 5,000 人が新たに受傷している。しかし、脊髄損傷に対する根本的な治療法はない。

これまで脊髄をはじめとする中枢神経系は一旦損傷を受けると再生しないと長い間考えられていたが、最近の研究により成人においても神経再生が起こることがわかってきた。現在、中枢神経を再生させる方法として、人工多能性幹 (iPS) 細胞、神経幹細胞、骨髄間質細胞、嗅神経鞘細胞などの移植が注目されている。その中でも、骨髄間質細胞移植は自己細胞を使うために拒絶反応がなく手技的にも容易であることが臨床応用に向けての利点となる。

われわれは、脊髄挫滅損傷ラットに骨髄間質細胞を移植し、形態学および行動学的に著明に回復することを報告し、関西医科大学において 5 例の患者に自家移植の臨床試験を行い、骨髄間質細胞移植が安全かつ有効であることを確かめてきた。

一方、骨髄間質細胞の細胞生物学的あるいは分子生物学な解析は進んでおらず、脊髄再生に関する分子メカニズムは明らかになっていない。移植された骨髄間質細胞は脊髄内で最初は生着するが 2~3 週間後には消失することから、骨髄間質細胞は宿主に組み込まれて効果が発揮するのではなく、細胞から分泌された液性因子によって回復がもたらされると考えられる。そのため、骨髄間質細胞が分泌する因子の解析が必要が高まっている。

2. 研究の目的

骨髄間質細胞の移植が脊髄損傷の回復に有効である機序を解明するため、まず骨髄間質細胞の培養上清を脊髄損傷モデルラットに投与して、その効果を検討する。次に、骨髄間質細胞が分泌する神経再生因子を明らかにするため、骨髄間質細胞の培養上清を網羅的に解析し、その有効因子の分子特性や作用機序を解明する。これらにより脊髄損傷への細胞移植あるいは有効因子投与による有効な治療方法を開発し、中枢神経に対する再生医療の道を切り拓くことを目的とする。

3. 研究の方法

4 週齢 Sprague-Dawley (SD) ラットの大腿骨および脛骨の骨髄液から採取した骨髄間質細胞および市販されているヒト骨髄間質細胞を継代培養し、無血清培養上清を回収した。

脊髄損傷モデルラットを圧挫損傷により作成し、骨髄間質細胞の培養上清を側脳室経由で損傷直後から 2 週間に渡って浸透圧ポンプを用いて持続的に投与した。コントロール群には培地のみを同様に投与した。両群について、損傷後 4 週間に渡って行動学的評価 (BBB score) を行った後、損傷脊髄の組織学的解析を行った。

次に、神経細胞の突起伸長能を指標にして、骨髄間質細胞の培養上清から、液体クロマトグラフィーを組み合わせ、神経再生因子の分離精製を行い、得られた精製標品は質量分析計を用いて同定を行った。そして、得られた因子について生物学的特性を解析した。

4. 研究成果

骨髄間質細胞が分泌する液性因子の神経細胞に対する効果を見るために、ラットおよびヒト由来の骨髄間質細胞の培養上清を新生仔ラットの海馬由来神経細胞に添加したところ、神経細胞の生存維持能および突起伸長能の亢進がみられた(図1)。

次に、移植した骨髄間質細胞自身ではなく骨髄間質細胞の分泌した液性因子の効果を検討するために、脊髄損傷モデルラットに骨髄間質細胞培養上清を側脳室経路で損傷直後から2週間に渡って持続的に投与した。その結果、培養上清投与群では投与開始1週間後から行動学的評価において顕著な回復がみられた。また、損傷部での神経の再生を評価するために損傷脊髄の

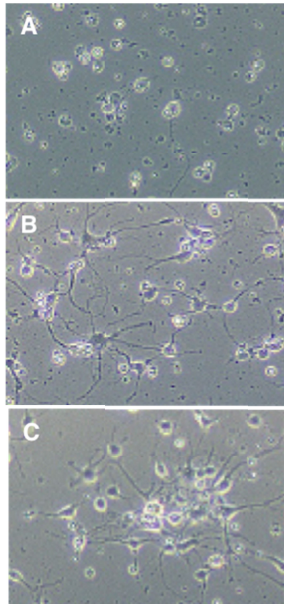


図1 神経細胞への効果

- A: コントロール培地
神経細胞は死んでいる。
- B: 骨髄間質細胞培養上清
神経細胞は生存し、神経突起の伸長がみられる。
- C: 分画フラクション
クロマトグラフィーによる分離で強い活性を得られた。

免疫組織化学的解析を行ったところ、培養上清投与群ではコントロール群に比べて損傷部における軸索密度が有意に高くなっていた。さらに詳細な解析を行ったところ、損傷部には1型および4型コラーゲンやラミニンを含む細胞外マトリックス成分が発現しており、その中をシュワン細胞に覆われた再生軸索が多数、それらの細胞外マトリックスに沿って伸びていることがわかった。

そこで、骨髄間質細胞が分泌する、神経再生に関わる因子を明らかにするために、培養上清の解析を行った。骨髄間質細胞の培養上清を、ヘパリンアフィニティー、イオン交換、ゲルろ過、逆相などの液体クロマトグラフィーを組み合わせ、神経突起伸長活性の有する分画の分離精製を行った。一連のカラムワークにより得られた精製標品は、質量分析計を用いて同定を行った。その結果、インスリン様増殖因子-1 (IGF-1)、トランスフォーミング増殖因子- β 1 (TGF- β 1)や肝細胞増殖因子(HGF)

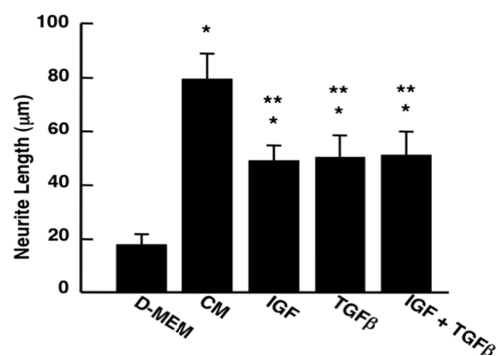


図2 神経突起伸長能の解析

骨髄間質細胞培養上清 (CM) は強く神経突起伸長能を示した。培養上清に検出されたIGF-1およびTGF- β は突起伸長能を示すものの、培養上清の活性の半分程であった。

* $p < 0.01$ vs. control, ** $p < 0.01$ vs. CM

などを骨髄間質細胞が分泌していることがわかった。これらの解析を通して、骨髄間質細胞は複数の神経再生因子を分泌し、これらの因子が協調して損傷した神経の再生に携わっていると考えられた(図2)。

したがって、本研究により骨髄間質細胞自体を移植しなくてもその培養上清の投与で脊髄損傷ラットの神経再生および行動の回復を促進させることがわかった。そして、骨髄間質細胞を用いた神経再生における分子メカニズムの一部が明らかになり、脊髄損傷に対して有効性と安全性の高い新たな治療法の開発の礎が切り拓かれたと考えている。

5. 主な発表論文等 [雑誌論文](計9件)

Ide C, Nakano N, Kanekiyo K, Yamada Y, Homma T, Tamachi M, Abe S, Miyamoto C, Tsukagoshi C. Effects of trophic factors on the treatment of spinal cord injury in rats. *Aino Journal*. (in press) 査読有.

Kanekiyo K, Wakabayashi T, **Nakano N,** Yamada Y, Tamachi M, **Suzuki Y,** Fukushima M, Saito F, Abe S, Tsukagoshi C, Miyamoto C, and **Ide C.** Effects of intrathecal injection of the conditioned medium from bone marrow stromal cells on spinal cord injury of rats. *J Neurotraume*, 35:521-532, 2018. 査読有. doi: 10.1089/neu.2017.5201.

Kanekiyo K, Nakano N, Homma T, Yamada Y, Tamachi M, **Suzuki Y,** Fukushima M, Saito F, and **Ide C.** Effects of multiple injection of bone

marrow mononuclear cells on spinal cord injury of rats. *J Neurotraume*, 34:3003-3011, 2017. 査読有. doi: 10.1089/neu.2016.4841.

中野法彦、兼清健志、井出千束: 骨髄間質細胞由来因子による神経再生、*BIO Clinica*, 32、82-86、2017. 査読なし.

Nakano N, Kanekiyo K, and **Ide C.** The characteristics and functions of NTAK/Neuregulin-2. *Aino Journal* 15:81-87, 2016. 査読有.

Ide C, Nakano N, and **Kanekiyo K.** Cell transplantation for the treatment of spinal cord injury – bone marrow stromal cells and choroid plexus epithelial cells. *Neural Regener Res*, 11(9):1385-8, 2016. 査読有.

Nakano N, Kanekiyo K, Nakagawa T, Asahi M, and **Ide C.** NTAK/Neuregulin-2 secreted by astrocytes promotes survival and neurite outgrowth of neurons via ErbB3. *Neurosci Lett*, 622, 88-94, 2016. 査読有. doi: 10.1016/j.neulet.2016.04.050.

Kanekiyo K, Nakano N, Noda T, Yamada Y, **Suzuki Y,** Ohta M, Yokota A, Fukushima M, and **Ide C.** Transplantation of choroid plexus epithelial cells into contusion-injured spinal cord of rats. *Restor Neurol Neurosci*, 34, 347-366, 2016. 査読有. doi: 10.3233/RNN-150546.

Kanekiyo K, Nakano N, Yamada Y, Tamachi M, Ohta M, **Suzuki Y,** and **Ide C** Commentary: Are the long-term survival, proliferation, and differentiation of transplanted cells desirable in clinical application for spinal cord injury? *Aino Journal* 14 :69-76, 2015. 査読有.

[学会発表](計11件)

兼清健志、脊髄損傷モデルラットに対する骨髄間質細胞培養上清の効果、第123回日本解剖学会総会・全国学術集会、2018年。

兼清健志、脊髄損傷モデルラットに対する骨髄間質細胞培養上清の脳室内投与の効果、第17回日本再生医療学会総会、2018年。

Kanekiyo K., Therapeutic effect of multiple-injection of bone marrow-derived mononuclear cells on rat spinal cord injury, Consortium of Biological Sciences 2017、2017年。

Kanekiyo K., Therapeutic potential of choroid plexus epithelial cells for spinal cord injury. International Symposium, Systems glycobiology and beyond, —Toward a bridge between fundamental research and applied science—, 2017年。

Kanekiyo K., Effects of multiple-injection of bone marrow-derived mononuclear cells on spinal cord injury of rats. 第40回日本神経科学大会、2017年。

Nakano N., NTAK/Neuregulin-2 secreted by astrocytes promotes survival and neurite outgrowth of neurons via ErbB3、第40回日本神経科学大会、2017年。

兼清健志、脊髄損傷モデルラットに対する骨髄由来単核細胞の複数回移植効果、第122回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017年。

兼清健志、骨髄由来単核細胞の脊髄損傷モデルラットへの複数回移植効果の検討、第16回日本再生医療学会総会、2017年。

中野法彦、アストロサイト由来のNTAK/Neuregulin-2のニューロンに対する

作用、第89回日本生化学会大会、2016年。

Ide C., Cell transplantation for the treatment of spinal cord injury — bone marrow stromal cells and choroid plexus epithelia cells —, Joint Symposium of 5th International Neural Regeneration Symposium and 10th Asia Pacific Symposium on Neural Regeneration, 2016年。

Kanekiyo K., Cell transplantation for the treatment of spinal cord injury. Joint Symposium of 5th International Neural Regeneration Symposium and 10th Asia Pacific Symposium on Neural Regeneration, 2016年。

6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 法彦 (NAKANO, Norihiko)
藍野大学・中央研究施設・准教授
研究者番号：40322721

(2)研究分担者

井出 千束 (IDE, Chizuka)
藍野大学・医療保健学部/中央研究施設・教授
研究者番号：70010080

(3)連携研究者

鈴木 義久 (SUZUKI, Yoshihisa)
公益財団法人田附興風会・医学研究所・研究員
研究者番号：30243025

兼清 健志 (KANEKIYO, Kenji)
藍野大学・中央研究施設・講師
研究者番号：20525399