

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15533

研究課題名(和文) 脊髄損傷後の内因性神経幹細胞単離・抽出の試み

研究課題名(英文) Isolation of endogenous neural stem cell from spinal cord injury

研究代表者

陰山 博人 (KAGEYAMA, HIROTO)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：60461068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：セッシン圧迫法で作成した脊髄損傷の3日後から細胞を分離培養したところ、蛍光法を用いた細胞免疫染色やRNAを用いた解析では脳傷害誘導性多能性幹細胞(injury-induced multipotent stem cells: iSCs)や血管周皮細胞と似た性質を有し、多能性幹細胞の可能性が示唆された。)および血管周皮細胞に近い遺伝子背景を有していることが確認できた。今後、分化能や幹細胞マーカーの発現の解析を予定としている。また、脊髄損傷時、神経線維延長を阻害する一つとして癭痕形成(Scar formation)部にペリサイトが集積していることは報告されており、それらとの相違も検討する。

研究成果の概要(英文)：Cells were isolated and cultured 3 days after the spinal cord injury prepared by the cessation compression method, and as a result, cell immunity staining using fluorescence method In analysis using color or RNA, brain injury-induced pluripotent stem cells (injury-induced multipotent stem cells: iSCs) and vascular pericytes, suggesting the possibility of pluripotent stem cells.) As well as a genetic background close to vascular pericytes. We plan to analyze the differentiation potential and the expression of stem cell marker in the future. Also, When medullary injury, as one of the inhibitors of nerve fiber prolongation, pericite is present in the Scar formation part. It is reported that they are accumulating, and we also consider the difference with them.

研究分野：脊髄・脊椎の外科的治療

キーワード：Mesenchymal stem cell spinal cord injury

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまで一貫して脊椎脊髄疾患の診療に従事し、脊髄損傷による重度後遺症患者の診療経験から、現状の治療の無効性を痛感してきた。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について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、これまでに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、脳傷害(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、injury induced-Neural Stem/Progenitor Cells: iNSPCs) [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。iNSPCs 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。脊髄損傷においては様々な要因が髄鞘再生を拒んでいることは周知の事実であるが、本研究は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。予想される結果としては脊髄髄膜より単離された iNSPCs はニューロンをはじめアストロサイトやオリゴデンドロサイトに分化することが予想される。本研究により脊髄損傷の治療法として、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す、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、マウスまたはラットの脊髄損傷モデルを作成し、損傷部位から iNSPCs の単離を試みると共に、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

マウスまたはラット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・抽出を試みる。  
平成27年度はCB-17/1cr-+/+Jcl 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り、予定通りの研究が遂行できなかった。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クション圧迫法へ変更し、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、再現性が高いことを確認することができた。またインパクトより狭い術野で作成できるようになり、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。

### 4. 研究成果

脊髄損傷作成後3日後と7日後に損傷脊髄を採取し、iNSPCs と同様の方法で分離培養を行った。具体的には順次細い針に細胞を通し、細胞を分離し、EGF、FGF、N2、2%血清を添加した DMEM/F12 培養液を用いて、接着因子のない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。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は培養開始後30日後の通常写真であるが、紡錘形の細胞が増殖しているのが確認できた。一方で、椎弓切除のみの偽手術群の脊髄組織からは、増殖する細胞の培養はできなかった。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 Nestin 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 は Nestin と共発現を認めた(図2)。この細胞群についてマイクロアレイによるDNA解析で iNSPCs に非常に似た遺伝子背景を持つことを確認した。FACS でも SCA-1 の発現が確認され、体性幹細胞の可能性を持っていると考えられた(図3)。

今後 RT-PCR での発現確認、幹細胞円錐の形成、分化試験を行い、幹細胞もしくは神経前駆細胞であるか確認する予定である。この段階まで遂行できれば論文として取りまとめ、英文雑誌への投稿を予定している。得られた細胞が幹細胞であることが確定できれば、神経管周囲に存在するとされている神経幹細胞と傷害誘導性幹細胞の区別のためにペリサイトマーカーなどを用いて検討を加える予定としている。

一方脊髄損傷時、神経線維延長を阻害する一つとして癒痕形成(Scar formation)部にペリサイトが集積していることは報告されており、脊髄損傷時の癒痕形成メカニズムとの関連性について今後検討したい。

図1 初期培養写真  
プラスチック接着性の細胞が増殖している。

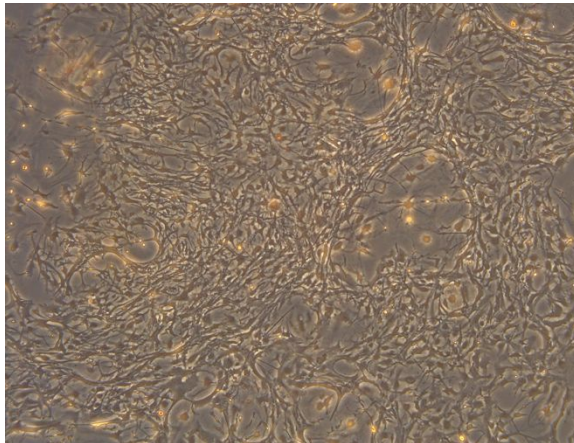


図2 細胞免疫学的染色  
赤が Nestin、緑が PDGFR、青が DAPI

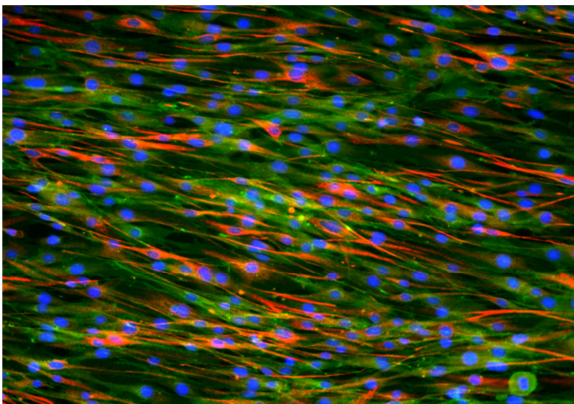
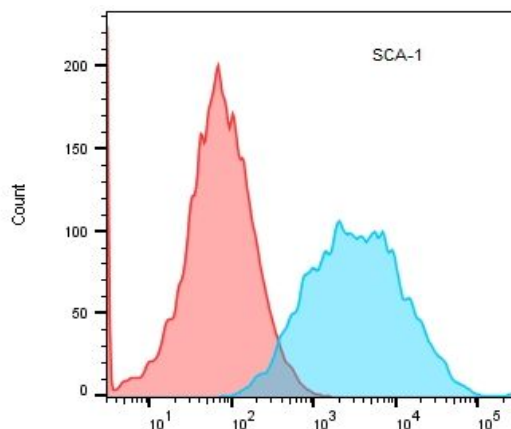


図3 フローサイトメトリー SCA-1  
青 抗体あり 赤 コントロール  
脊髄損傷後分離培養した細胞には SCA-1 が高発現している。



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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

陰山 博人 (Kageyama, Hiroto)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60461068

(2)研究分担者

吉村 紳一 (YOSHIMURA, SHINICHI)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40240353

高木 俊範 (TAKAGI, TOSHINORI)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号：452152

松山 知弘 (MATSUYAMA, TOMOHIRO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10219529

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

中込 隆之 (MATSUYAMA, TOMOHIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：80434950

蔵本 要二 (KURAMOTO, YOJI)

兵庫医科大学・大学院生

研究者番号：10604275

別府 幹也 (BEPPU, MIKIYA)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：00728983