

令和元年6月12日現在

機関番号：34441

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11390

研究課題名(和文) 無細胞液性因子による損傷脊髄の再生の促進 臨床応用を目指して

研究課題名(英文) Promoted regeneration of injured spinal cord by acellular humoral factors, aiming at clinical applications

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：In vitroで、astrocyteの分泌するneuregulin-2が培養ニューロンの生存と突起伸長を促進した。

In vivoで、骨髄間質細胞の培養上清の投与が、脊髄損傷ラットの歩行機能の著明な改善および損傷部組織の顕著な修復をもたらした。培養上清に含まれる骨髄間質細胞由来の液性因子が主要な働きをしていることを明らかにした。また、無培養骨髄単核細胞の髄液経由による複数回移植の効果を明らかにした。これらの結果によって、液性因子の臨床応用の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、脊髄損傷の治療には、細胞移植が主流である。移植細胞は脊髄組織内に組み込まれて再生軸索の伸長やグリア細胞の再生などを促進して、脊髄損傷の治療をもたらすというのが基本的な概念である。しかし実際には、移植細胞は2-3週後に消失するにも拘らず、再生軸索は伸び、機能的改善も見られる。これは移植細胞から分泌される液性有効因子の効果と考えられる。有効因子の本体は不明だが、培養上清が強い効果を持っていることから、培養上清に含まれる複数の因子が複合的に作用していると考えられる。液性有効因子は髄液経由の投与で、患者に苦痛を与える事なく複数回の投与が可能であるので、臨床的には有利な方法である。

研究成果の概要(英文)：Neuregulin2 released from astrocytes promoted the survival and neurite extension of rat hippocampus-derived neurons in vitro. The injection of the supernatant of cultured rat bone marrow stromal cells through the cerebrospinal fluid markedly improved locomotive behaviors of spinal cord injured (SCI) rats, and, at the same time, promoted tissue-repairing, including axonal outgrowth, at the epicenter of the spinal cord lesion. This indicated that the humoral factors released from bone marrow stromal cells have a crucial role in promoting behavioral activities of SCI rats, and facilitated histological repairing of the spinal cord lesion of SCI rats. In addition, multiple transplantations of non-cultured mononuclear cells obtained from the rat bone marrow were efficient in locomotor improvement and tissue repair of SCI rats. These findings indicated that humoral factors released from the bone marrow stromal cells have a crucial role in regeneration of injured spinal cord.

研究分野：神経再生、脊髄損傷、神経解剖学、細胞移植

キーワード：脊髄損傷 液性有効因子 骨髄間質細胞 培養上清 歩行運動 再生軸索 免疫組織化学 電子顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は体性幹細胞を移植に用いて脊髄損傷の治療方法の開発を研究をしてきた。これまで移植に用いた主な細胞は脈絡叢上皮細胞と骨髄間質細胞である。これらの培養細胞をラットの脊髄損傷部位に移植して、歩行運動の改善、損傷脊髄の組織学的な修復、および再生軸索の伸長を指標として、細胞移植の効果を評価してきた。その結果、上のどの細胞を移植に用いてもこれらの指標は有意に改善し、有効であることが明らかとなった。しかし、これらの移植細胞は移植2週間後には消失して、宿主脊髄内に生着・組み込まれることはなかった。つまり移植された細胞が宿主組織内に組み込まれて効果を発揮しているのではなく、細胞から出る液性成分が働いて内因的な再生を促進しているものと考えられた。本研究では、まず骨髄間質細胞の培養上清を投与することで、その効果を調べた。この研究の直前には、アストロサイトから分泌される neuregulin2 が培養ニューロンの突起伸長を促進することを見出している。

2. 研究の目的

骨髄間質細胞の培養上清を投与することで、脊髄損傷ラットの歩行運動の改善が促進されるか、損傷部における再生軸索の伸長が促進されるかを調べる。

3. 研究の方法

ラットの脊髄に挫滅損傷を加え、直後から骨髄間質細胞の培養上清を投与した。投与方法は、Alzet-osmotic pump に培養上清を満たして、2週間、髄液経由で連続的に注入した。歩行運動は BBB (Basso, Beattie, Bresnahan) のスコアで毎週評価した。投与4週まで調べた。

4. 研究成果

歩行運動は、対照群の BBB スコアが、4週で 2.5 前後であったが、実験群は 5.5 前後であった。始めは、通常程度の脊髄損傷ラットを用いていたが、歩行の改善が顕著であったためにより重篤な脊髄損傷ラット用いたため BBB スコアは全体に低い値となった。また神経軸索は、損傷部に形成されるコラーゲンマトリックスを通して多数の再生軸索が伸長していた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

Ide C, Nakano N, Kanekiyo K. Cell transplantation for the treatment of spinal cord injury - bone marrow stromal cells and choroid plexus epithelial cells. **Neural Regeneration Research**, 11:1385-1388, 2016. doi :10.4103/1673-5374.191198 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 via ErbB3. **Neuroscience Letters**. 622: 88-94. 2016. doi: 10.1016/j.neulet.2016.04.050 査読有

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

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. **Journal of Neurotrauma** 34:3003-3011. 2017. doi:10.1089/neu.2016.4841 査読有

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

Hayashibe M, Homma T, Fujimoto K, Oi T, Yagi N, Kashihara M, Nishikawa N, Ishizumi Y, Abe S, Hashimoto H, Kanekiyo K, Ide C, Morioka S. Locomotor improvement of spinal cord-injured rats through body weight support treadmill training by plantar placement of hind paws on the floor. **Spinal Cord**, 54:521-529, 2016. doi: 10.1038/sec.186, 査読有

Kanekiyo K, Homma T, Nakano N, Yamada Y, Tamachi M, Suzuki Y, Fukushima M, Saito F, Ide C. Effects of intrathecal injection of the conditioned medium of bone marrow stromal cells on the spinal cord injury of rats. **Journal of Neurotrauma** 35 : 521-532, 2018. doi :10.1089/neu.2017.5201 査読有

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*, 2017;32(10): 82-86. 査読有

Nakano N, Kanekiyo K, Yamada Y, Tamachi M, Suzuki Y, Fukushima M, Saito F, Abe S, Tsukagoshi C, Miyamoto C, Ide C. Structures of filum terminale and characteristics of ependymal cells of its central canal in rats. **Brain Research** 1707 : 206-215, 2018. doi: 10.1016/j.brainres.2018.11.038 査読有

[学会発表](計 15 件)

Kanekiyo K, Nakano N, Noda T, and Ide C., “Transplantation of choroid plexus epithelial cells promotes axon regeneration in spinal cord injury” 第39回日本神経科学大会, 横浜, 7月20-22日(2016). ポスター

Ide C, Kanekiyo K, Nakano N, “Cell transplantation for the treatment of spinal cord injury-bone marrow stromal cells and choroid plexus epithelial cells” 2016 International Neural Regeneration Symposium (INRS 2016) & 10th Asia Pacific Symposium on Neural Regeneration (APSNR 2016), Yinchuan (China), July (2016) Invited lecture
Kanekiyo K, Nakano N, Ide C ” Cell transplantation for the treatment of spinal cord injury” 2016 International Neural Regeneration Symposium (INRS 2016) & 10th Asia Pacific Symposium on Neural Regeneration (APSNR 2016), Yinchuan (China), July29-31 (2016) Invited poster

中野法彦、兼清健志、中川孝俊、朝日通雄、井出千束, “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, 仙台, 9月25-27日(2016). ポスター

兼清健志、中野法彦、鈴木義久、井出千束 “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 (2017.3.7-9)、仙台国際センター、仙台、3月7日-9日、ポスター・ショートトーク

兼清健志、中野法彦、鈴木義久、井出千束 “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、長崎(長崎市)、3月28-30日(2017) ポスター

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.” 第40回日本神経科学大会, 幕張メッセ(千葉), 7月20-23日, 2017(ポスター)

Kanekiyo K, Nakano N, Suzuki Y, and Ide C “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, 幕張メッセ(千葉), 7月20-23日, 2017(ポスター)

Sakuda K, Kitazume S, Kanekiyo K, et. al. “Analysis of astrocytes with brain specific branched O-mannosyl glycans in demyelination” Consortium of Biological Sciences 2017, Kobe Port Island, Dec. 6-9, 2017 (Oral and Poster)

Kanekiyo K, Nakano N, and Ide C “Therapeutic effect of multiple-injection of bone

marrow-derived mononuclear cells on rat spinal cord injury” Consortium of Biological Sciences 2017, Kobe Port Island, Dec. 6-9, 2017 (Poster)

兼清健志, 中野法彦, 安部征哉, 塚越千尋, 宮本陳敏, 井出千束 “ 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, パシフィコ横浜 (横浜), 3 月 21-33 日, 2018 (Poster and Short talk)

Kanekiyo K, Nakano N, Abe S, Tsukagoshi S, Miyamoto C, and Ide C “ Effects of Conditioned Medium from Bone Marrow Stromal Cells on Rat Spinal Cord Injury ” 第 41 回日本神経科学大会, 神戸国際会議場・展示場 (神戸), 7 月 26-29 日, 2018 (Poster)

兼清健志, 中野法彦, 安部征哉, 塚越千尋, 宮本陳敏, 井出千束 “ 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, 日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学 (東京), 3 月 28-30 日, 2018 (Poster)

Nakano N, Kanekiyo K, Kunii S, Morimoto K, Omae K, and Ide C “ Analysis of neuronal cells induced by low adhesive scaffold collagen ” 第 91 回日本生化学会大会, 京都国際会館 (京都), 9 月 24-26 日, 2018 (Poster)

中野 法彦, 兼清 健志, 國井 沙織, 森本 康一, 尾前 薫, 井出 千束 “ 細胞低接着性コラーゲンを足場とした神経系細胞 ” 第 59 回組織細胞化学会総会・学術集会, 宮崎市民プラザ (宮崎), 9 月 29-30 日, 2018 (Poster)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中野 法彦

ローマ字氏名：NAKANO Norihiko

所属研究機関名：藍野大学

部局名：中央研究施設

職名：准教授

研究者番号 (8 桁): 40322721

研究分担者氏名：兼清 健志

ローマ字氏名：KANEKIYO Kenji

所属研究機関名：藍野大学

部局名：中央研究施設

職名：講師

研究者番号 (8 桁): 20525399

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。