

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591691
 研究課題名（和文）脊髄損傷に対する間葉系幹細胞移植におけるジアシルグリセロールの神経再生への関与
 研究課題名（英文）Therapeutic benefits of intravenous administration of mesenchymal stem cells on spinal cord injury Contribution of Diacylglycerol to neurogenesis -
 研究代表者
 村上 友宏（MURAKAMI TOMOHIRO）
 札幌医科大学・医学部・助教
 研究者番号：40438007

研究成果の概要（日本語）： 脊髄損傷モデルラットに対して、骨髄間葉系幹細胞を静脈内に移植すると、著明な治療効果が認められることが、画像診断学的、組織学的、および行動学的に確認された。また、治療メカニズムには、BDNFを介した神経保護作用が強く関与しており、また、神経再生作用も一部関与していることが判明した。さらに、これらの細胞治療による効果は、脊髄損傷発症後の超急性期に治療した場合のみならず、1か月以上経過した慢性期に治療を行っても効果が認められたことより、“Therapeutic time window”は比較的広いことが判明した。

研究成果の概要（英文）： Local injection of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from bone marrow has been shown to improve functional outcome in spinal cord injury (SCI). Systemic delivery of MSCs results in therapeutic benefits in a number of central nervous system disorders. In the present study we intravenously administered rat MSCs derived from bone marrow to study their potential therapeutic effect in a contusive SCI model in the rat. MSCs were systemically delivered at varied time points (6 hours to 28 days after SCI). The spinal cords were examined histologically six weeks after SCI. Stereological quantification was performed on the spinal cords to determine donor cell (MSCs transduced with the LacZ gene) density in the lesions. Light microscopic examination revealed that cavitation in the contused spinal cords was less in the MSC-treated rats. A limited number of cells derived from MSCs (LacZ+) in the injury site expressed neural or glial markers. Functional outcome measurements using the Basso-Beattie-Bresnehan (BBB) score were performed periodically up to 6 weeks post-SCI. Locomotor recovery improvement was greater in the MSC-treated groups than in sham controls with greatest improvement in the earlier post-contusion infusion times. The availability of autologous MSCs in large number and the potential for systemically delivering cells to target lesion areas without neurosurgical intervention suggests the potential utility of intravenous cell delivery as a prospective therapeutic approach in SCI.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：移植・再生医療、再生医学、神経科学、脳・神経、発生・分化

1. 研究開始当初の背景

近年、脊髄損傷に対する細胞療法が注目されており、当初の予備実験結果では、ラット脊髄損傷モデル（NYUモデルを使用）の損傷部位に間葉系幹細胞を移植した場合、良好な治療効果は得られることが判明していた。また、局所の神経再生と軸索の有髄化が、組織学的および電気生理学的に確認されていた。しかし、静脈内投与の有効性、および、病態生理および神経再生メカニズムは、ほとんど解明されていない状況にあった。

神経再生において、その再生の先端部は Growth cone（成長円錐）と呼ばれ、neuronal path findingに重要な役割を果たしているが、その際、成長円錐が適切なターゲットに神経突起を伸長させる為には、“filopodia”と“lamellipodia”が重要である。

Diacylglycerol kinase(DGK) は Diacylglycerol (DG) をリン酸化して phosphatidic acid(PA)を生成する酵素であり、DGとPAは細胞内のsecond messengerとして幅広い機能を有する。DGK は細胞骨格系と結合し、Cdc42のpositive effectorとして、また同時にRac1のnegative regulatorとして機能し、これらのバランスを調節することによりfilopodiaやlamellipodiaの形成を制御する。

多くの細胞において、細胞刺激の初期に活性型 Cdc42 により糸状仮足が形成され、その後葉状仮足が形成されるという時間的な関係が認められる。Cdc42 が PAK を介して Rac1 を活性化する活性化経路と、Cdc42 が DGK

を介して Rac1 を制御する不活性化経路の両者のバランスが filopodia を維持するか、あるいは速やかに lamellipodia の形成へ移行するかを調節する。

このような背景から、本研究を実施するに至った。

2. 研究の目的

現在までのところ、難治性神経疾患である脊髄損傷に対する有効な治療法は無いと言って良いのは既知の事実である。

本研究では、骨髄間葉系幹細胞を用いた脊髄損傷に対する細胞治療について詳細に検討すると同時に、治療メカニズムを解析し、また、その一部に DGK が関与しているかどうかを検討することを主目的としていた。

3. 研究の方法

脊髄損傷モデルは、NYUインパクターを用い、胸髄（Th10レベル）に直接損傷を加えるモデルを使用した。移植する細胞は、間葉系骨髄幹細胞を用いた。また、効果判定は、下記のように解析した。

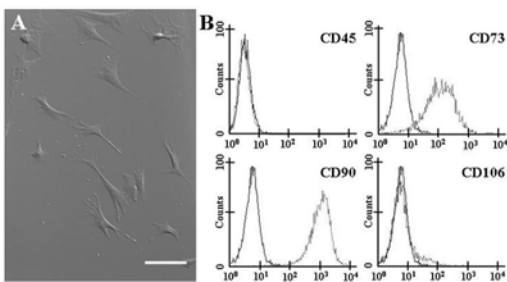
- (1) 培養細胞の形質は、細胞表面の CD 抗原をマーカーとして同定した。
- (2) ドナー細胞に LacZ 遺伝子を導入し、移植後の動向を追跡した。
- (3) 免疫染色法を用いて、発現蛋白を解析した。
- (4) ELISA 法により、損傷部位の BDNF レベルを測定した。
- (5) 脊髄組織をパラフィンで固定した後、

H - E 染色を行い、組織学的に解析した。

(6) 行動学的検査は BBB スコアを用いて、治療による神経症状の定量的評価を行った。

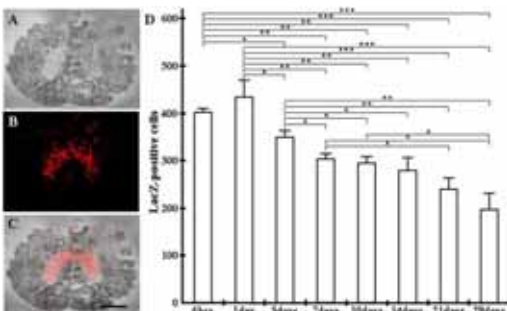
4. 研究成果

ラット骨髄間葉系幹細胞を培養・増殖し、本研究に必要程度の量まで増殖させた後、細胞表面マーカーにより細胞の形質を解析した。



脊髄損傷モデルとして、NYU インパクトを用い、胸髄 (Th10 レベル) に直接損傷を加えるモデルを確立し、間葉系骨髄幹細胞を静脈内に投与した。

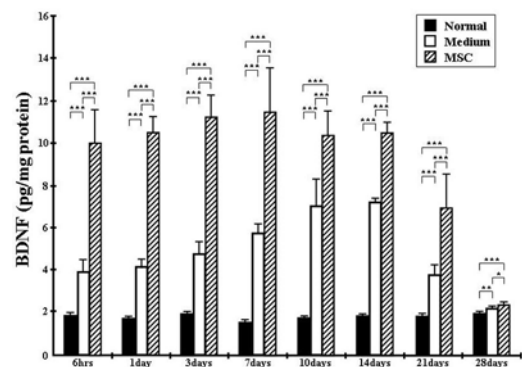
移植後、損傷脊髄を組織学的に解析した結果、LacZ でマークした骨髄間葉系幹細胞は、静脈内に投与されたにも関わらず、損傷部位に多量に集積することが判明した。また、その集積の程度は、急性期に最高となるものの、1ヶ月以上経過した慢性期においても、治療効果を発揮するのに十分な細胞量が集積しているのが認められた。



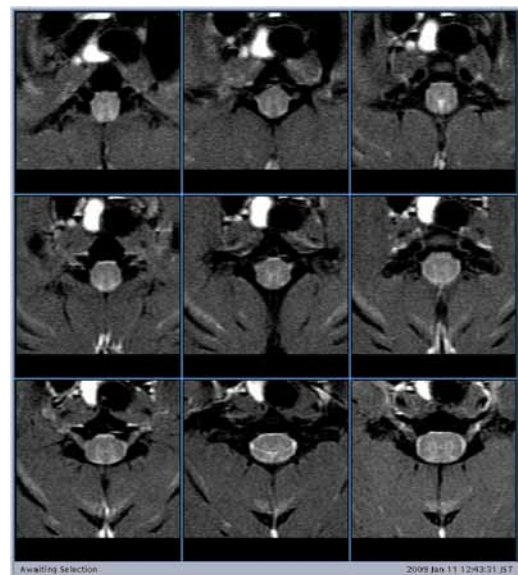
さらに、局所の BDNF 濃度が細胞移植によ

り著名に上昇することが判明したことより、治療メカニズムに BDNF を介する神経保護作用が多量に関与していることが判明した。

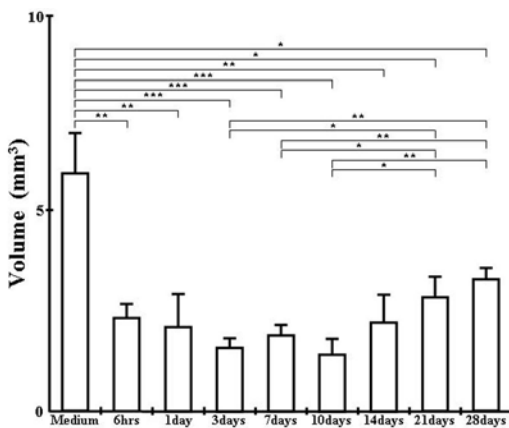
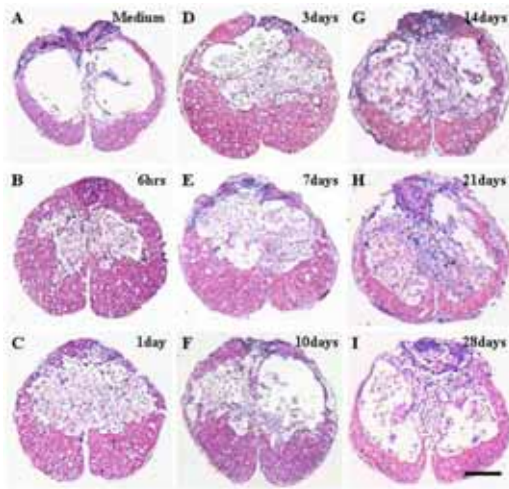
これらの細胞治療による効果は、脊髄損傷発症後の超急性期に治療した場合のみならず、1ヶ月以上経過した慢性期に治療を行っても効果が認められたことより、"Therapeutic time window" は比較的広いことが分かった。



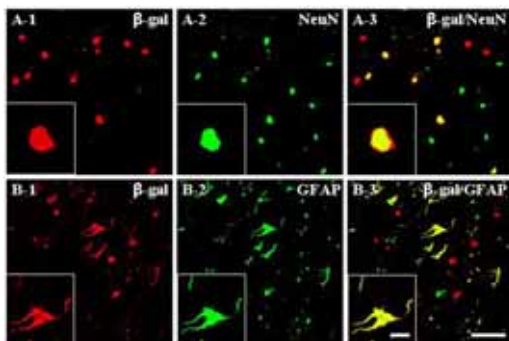
動物実験用高磁場 MRI を用いた画像診断学的解析では、治療により損傷部位が縮小していくことが確認された。



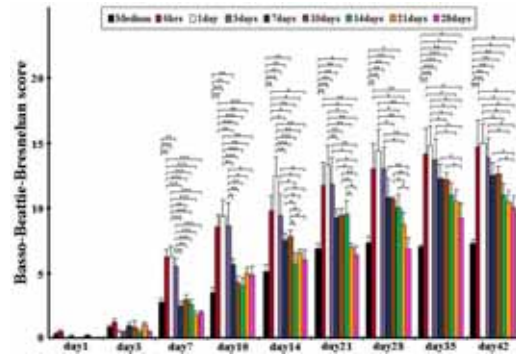
組織学的には、細胞移植により損傷範囲の減少と、その後起こる空洞形成が抑制されることが判明した。



また、移植細胞は脊髄損傷部の局所において神経細胞やグリア細胞へと分化するばかりでなく、生き残った軸索の sprouting も促進することが判明した。これらのことから、治療メカニズムに再生作用が関与していることが判明した。そこで、治療メカニズムに Diacylglycerol kinase が関与しているかどうか検証したが、発現量が極めて少ないため有意差は認められなかった。



行動学的解析でも治療群で運動機能の回復が顕著に認められた。



以上より、間葉系骨髄幹細胞の静脈内投与療法は極めて有望な治療方法であり、今後の更なる基礎研究と実用化へ向けた研究開発が強く望まれるところである。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) Osaka M, Honmou O, Murakami T, Nonaka T, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD.:

Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. Brain Research, 2010, in press. (査読有り)

(2) Sasaki M, Radtke C, Tan AM, Zhao P, Hamada H, Houkin K, Honmou O, Kocsis JD.:

BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury. Journal of Neuroscience, 25; 29(47): 14932-14941, 2009. (査読有り)

〔学会発表〕(計1件)

(1) 大阪美鈴、本望 修、村上友宏、宝金清博. 脊髄損傷における骨髄幹細胞の移植による機能回復. 日本脳神経外科学会学術総会.

2009年10月14日・東京・

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 友宏 (MURAKAMI TOMOHIRO)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：40438007

(2) 研究分担者

寶金 清博 (HOUKIN KIYOHIRO)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：90229146

(3) 連携研究者

本望 修 (HONMOU OSAMU)

札幌医科大学・神経再生医学講座・

特任教授

研究者番号：90285007