

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究C

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19591695

研究課題名（和文）脊髄損傷に対する胚性幹（ES）細胞を用いた再生治療

研究課題名（英文）Cell transplantation of Embryonic Stem Cells for Spinal Cord Injury

研究代表者

中瀬 裕之 (NAKASE HIROYUKI)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10217739

研究成果の概要（和文）：

脊髄損傷に対する再生治療において、移植材料としての胚性幹(ES)細胞の有用性を確立することを目的として、未分化なES細胞と骨髄間質細胞を同時移植することによる治療効果およびES細胞による腫瘍形成抑制について検討した。その結果、骨髄間質細胞の同時移植はES移植細胞に残存する未分化ES細胞の分化誘導を促進し、未分化ES細胞由来の腫瘍形成を抑制すると考えられた。ES細胞移植の臨床応用にむけて、神経分化誘導作用のある骨髄間質細胞同時移植は、腫瘍形成に伴う重篤な合併症を回避する有望な治療法の一つと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Embryonic stem (ES) cells are a potential source for treatment of spinal cord injury (SCI). Although one of the main problems of ES cell-based cell therapy is tumor formation, there is no ideal method to suppress tumor development. In this study, we examined whether transplantation with bone marrow stromal cells (BMSCs) prevented tumor formation in SCI model mice that received ES cell-derived grafts containing both undifferentiated ES cells and neural stem cells. Embryoid bodies (EBs) formed in 4-day hanging drop cultures were treated with retinoic acid (RA) at a low concentration of 5×10^{-9} M for 4 days, in order to allow some of the ES cells to remain in an undifferentiated state. RA-treated EBs were enzymatically digested into single cells and used as ES cell-derived graft cells. Mice transplanted with ES cell-derived graft cells alone developed tumors at the grafted site and behavioral improvement ceased after day 21. In contrast, no tumor development was observed in mice cotransplanted with BMSCs, which also showed sustained behavioral improvement. In vitro results demonstrated the disappearance of SSEA-1 expression in cytochemical examinations, as well as attenuated mRNA expressions of the undifferentiated markers Oct3/4, Utf1, Nanog, Sox2, and ERas by RT-PCR in RA-treated EBs cocultured with BMSCs. In addition, MAP2-immunopositive cells appeared in the EBs cocultured with BMSCs. Furthermore, the synthesis of NGF, GDNF, and BDNF was confirmed in cultured BMSCs, while immunohistochemical examinations demonstrated the survival of BMSCs and their maintained ability of neurotrophic factor production at the grafted site for up to 5 weeks after transplantation. These results suggest that BMSCs induce undifferentiated ES cells to differentiate into a neuronal lineage by neurotrophic factor production, resulting in suppression of tumor formation. Cotransplantation of BMSCs with ES cell-derived graft cells may be useful for preventing the development of ES cell-derived tumors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：脳神経外科

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：脊髄損傷・再生治療・胚芽幹細胞・基礎研究・マウス

1. 研究開始当初の背景

近年、脊髄損傷に対する末梢神経や胎児脊髄移植が報告され、脊髄損傷後であっても損傷部に適切な環境が導入されれば損傷軸索の再生がみられることが示された。また、神経栄養因子が損傷軸索の再生を促進することや軸索成長阻害因子の同定など脊髄再生に関する数多くの報告がなされ、損傷脊髄の再生が現実のものとして考えられるようになってきた。しかし、脊髄損傷に対する再生治療は未だ困難で、今後臨床応用されるためには、移植法、移植時期、移植環境（神経機能や脊髄血流など）等、検討されなければならない問題が残っている。再生をさまたげる要因として、例えば脊髄損傷後に損傷局所に出現する scar や空洞の存在が指摘されおり、軸索再生が可能な局所環境を整えることが重要であることが指摘されている。一方、ES細胞を用いた再生医療においては、ES細胞の特長である無限の細胞増殖能が腫瘍形成につながる可能性が指摘されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脊髄損傷に対する再生治療において、移植材料としての胚性幹(ES)細胞の有用性を確立することである。今回は、未分化な ES 細胞と骨髄間質細胞を同時移植することによる治療効果および ES 細胞による腫瘍形成抑制について検討する。

3. 研究の方法

移植細胞として、GFPで標識したマウスES細胞を至適濃度でない低濃度レチノイン酸にて分化誘導し、未分化ES細胞が残存する神経幹細胞群を調整した(ES移植細胞)。またマウスの大腿骨から骨髄間質細胞(BMSC)を

採取し培養した。マウス脊髄圧挫傷モデルを3群にわけ、phosphate-buffered saline(PBS)を移植するPBS-Group、ES移植細胞のみを移植するES-Group、ES移植細胞および骨髄間質細胞を同時移植するES/BMSC-Groupとした。移植後の運動機能評価、移植部位での免疫組織染色を行った。*in vitro*で骨髄間質細胞の分化誘導能を調べ、ES移植細胞と骨髄間質細胞を共培養し未分化および神経系マーカーをRT-PCR、免疫染色にて検討した。上記検討のために以下の2つの実験を行った。

実験-1: 胚性幹(ES)細胞を用いた脊髄損傷に対する移植治療効果の再評価

(1) 移植細胞の準備 - 神経細胞への分化誘導

Stage 1; 白血病抑制因子を含んだ培地であつ、ゼラチンコートした培地に129/SvJ mouse由来の未分化胚性幹細胞を培養して増殖。

Stage 2; 0.05%trypsin, 0.04% EDTA in PBSで細胞をはがし、hanging drop法で胚性幹細胞を凝集させて胚様体(embryoid body)を作成。culture dishに移し、さらに24時間培養する。

Stage 3; ITSFn培地上で胚性体から6-10日間かけてnestin陽性細胞

(神経-グリア前駆細胞)を選択。Insulin/Transferrin/Selenium/Fibronectin (ITSFn) ITS(X100)100 μ l, fibronectin (1mg/ml) 50 μ lを10ml mediumに加える。

Stage4; 0.05%trypsin, 0.04% EDTA in PBSで細胞をはがし、10ng/ml bFGF, 1 μ g/ml lamininを含んだN2培地上で6日間nestin陽性細胞を増殖。以上の方法で神経幹細胞を誘導。

(2) 脊髄損傷モデル作成と運動機能評価
8-10週齢の129/SvJ male mouseを用いて脊髄損傷モデルを作成。まず、吸入麻酔を行い、顕微鏡下にTh9-13まで正中皮膚切開を加える。Th10の椎弓切除術を行い、硬膜は温存した。Pneumatic impact device (Impact velocity: 3m/s (40psi))にて、脊髄損傷を作成する。脊髄損傷直後(外傷直後移植群)、7日(7日後移植群)および14日後(14日後移植群)に、神経幹細胞を損傷部位に移植し、非移植群との運動機能の相違を比較検討した。behavioral functionの評価法としては、motor score, toe spread, pain withdrawal, platform hang, wire mesh descent rope walk, hind foot bar grab testsを用いた。

(3) 脊髄損傷部位の組織学的検討
さらに、移植28日後(あるいはさらに長期間の後)に脊髄損傷部位の組織学的検討を行い、非移植群と移植群との損傷部位での組織学的変化の相違を比較検討。組織学的検討としては、上記に加え、抗GFP抗体で移植したES細胞由来のdonor細胞を免疫染色し、非移植群でのdonor細胞とhostの組織との関係の評価した。

実験-2: ES細胞と骨髄間質細胞の同時移植による移植治療効果と腫瘍形成抑制効果の検討。

方法としては、マウス脊髄損傷モデルを作成し、未分化なES細胞を移植することにより腫瘍形成を確認し、一方未分化なES細胞と骨髄間質細胞を同時移植することにより、ES細胞による腫瘍形成が抑制されるかを検討した。

(1) マウス由来ES細胞(GFP標識)を、胚様体形成した後レチノイン酸処理することにより神経系細胞へ分化誘導を行い、これを移植細胞とした。

(2) 骨髄間質細胞はマウスの大腿骨から分離、培養を行う。一方、Th10の椎弓切除を施したC57BL6マウスにcontusion modelを作製。

(3) 第1群はレチノイン酸処理したES細胞を 1.5×10^4 個移植、第2群にはES細胞と同数の骨髄間質細胞を同時移植。

(4) 損傷10日後に移植を行い、経時的な行動学的観察、及び移植後の組織学的評価。

(5) 脊髄損傷部位の組織学的検討:さらに、第2群において移植28日後に脊髄損傷部位の組織学的検討を行い、非移植群、ES細胞移植群および(ES細胞と骨髄間質細胞の)同時移植群との損傷部位での組織学的変化の相違を比較検討する。組織学的検討としては、上記に加え、抗GFP抗体で移植したES細胞由来のdonor細胞を免疫染色し、非移植群でのdonor細胞とhostの組織との関係の評価。

4. 研究成果

研究結果として、(1) 運動機能評価ではES-Groupでは移植後2週以降で運動機能は低下し、ES/BMSC-Groupでは徐々に運動機能は改善した。(2) 組織学的検討ではES-Groupでは移植部位に腫瘍形成を認めたが、ES/BMSC-Groupでは腫瘍形成はみられず、免疫組織染色にてES細胞はNestin, MAP2陽性細胞への分化を認めた。BrdU標識した骨髄間質細胞は移植部位に生着し移植6週後もnerve growth factorを産生していた。(3) In vitroでの非接着性共培養ではES細胞の未分化マーカーの消失を認め、MAP2陽性神経細胞の発現を認めた。骨髄間質細胞より分泌される神経栄養因子の神経分化誘導が示唆された。

つまり、実験-1において未分化なES細胞由来の神経幹細胞は骨髄間質細胞により未分化性を脱し、より成熟した神経系細胞への分化誘導を認めた。実験-2において、骨髄間

質細胞同時移植群では、マウス脊髄損傷モデルに移植した未分化成分を含む神経幹細胞は、対照群のような腫瘍形成を認めず、nestin、MAP2 陽性の神経細胞へと分化誘導を認めた。つまり、骨髄間質細胞は脊髄損傷部位で、未分化な細胞の分化誘導を行い、未分化細胞の腫瘍形成を抑制しているとの結果が得られた。

本研究の結果として、骨髄間質細胞の同時移植は ES 移植細胞に残存する未分化 ES 細胞の分化誘導を促進し、未分化 ES 細胞由来の腫瘍形成を抑制すると考えられた。ES 細胞移植の臨床応用にむけて、神経分化誘導作用のある骨髄間質細胞同時移植は、腫瘍形成に伴う重篤な合併症を回避する有望な治療法の一つと考えられた。

しかし、本研究は未だ preliminary なもので、実際の治療にむけてはさらなる実験成績の積み重ねが必要である。骨髄間質細胞が分泌する多彩な神経栄養因子の中でも、どの因子が最も分化誘導に関与しているのか、移植された ES 細胞はどのような機序で運動機能を改善するのかなど残された課題は多くある。また、ES 細胞は受精卵から分離精製されるため、倫理的な側面は解決されるべき大きな問題である。iPS 細胞は、万能細胞を自己組織から遺伝子導入により作成することができる。今後、ES 細胞研究から得た膨大な知見は、iPS 細胞にも応用が可能であると考えられる。しかし、ES 細胞も iPS 細胞も豊富な自己増殖能を有することにはかわりなく、iPS 細胞に研究においてもその腫瘍形成は克服せねばならない問題である。引き続き、神経再生にむけて、さまざまな角度からアプローチを行い、臨床応用へむけた研究を行ってみたいと考えている。

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 3 件)

- ① Toriumi H, Yoshikawa M, Matsuda R, Nishimura F, Yamada S, Hirabayashi H, Nakase H, Nonaka J, O uji Y, Ishizaka S, Sakaki T :
Treatment of Parkinson's disease model mice with allogeneic embryonic stem cells: necessity of immunosuppressive treatment for sustained improvement
Neurol Res, 31 220-227. 2009
- ② Matsuda R, Yoshikawa M, Kimura H, O uji Y, Nakase H, Nishimura F, Nonaka J, Toriumi H, Yamada S, Nishiofuku M, Moriya K, Ishizaka S, Nakamura M, Sakaki T :
Cotransplantation of mouse embryonic stem cells and bone marrow stromal cells following spinal cord injury suppresses tumor development
Cell Transplant, 18 39-54. 2009
- ③ Tei R, Nakase H, Sakaki T:
Protective effect of Cl esterase inhibitor on acute traumatic spinal cord injury in rat.
Neurol Res, 30(7):761-7. 2008

[学会発表] (計 1 件)

①Matsuda R, Yoshikawa M, Kimura H,
Ouji Y, Nakase H, Ishizaka S, Sakaki
T:Co-transplantation of ES cells and
bone marrow stromal cells following
spinal cord injury suppresses
tumordevelopment

2007 Shanghai International
Symposium on Stem Cell Research
2007.11.7 Shanghai

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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

6. 研究組織

(1)研究代表者

中瀬裕之 (NAKASE HIROYUKI)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10217739

(2)研究分担者

西村文彦 (NISHIMURA FUMIHIKO)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：70433331

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：