

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (A)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19689031
 研究課題名 (和文)
 内在性神経幹細胞および自己修復能に着目した脊髄損傷の新規治療法開発
 研究課題名 (英文)
 Remedy for spinal cord injury focused on stem cells and self-repairing
 研究代表者
 岡田 誠司 (OKADA SEIJI)
 九州大学大学院・医学研究院・その他
 研究者番号：30448435

研究成果の概要 (和文)：成体脊髄は一度損傷を受けると再生しないと考えられているが、我々は反応性アストロサイトが損傷後の組織修復と機能回復に重要であることを見いだした。この修復機構と神経幹細胞の関連を解析するため、反応性アストロサイトを選択的に採取する方法を確立し、neurosphere 法により培養したところ幹細胞能を有していたが、組織中に於いては神経細胞への分化は確認されなかったため、神経細胞の補充による組織修復機構ではないことが示唆された。この脊髄組織からセルソーターを用いて目的の細胞分画のみを採取する本手法は、神経研究にとって今後強力なツールとなり得ると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：Although reactive astrocytes form a glial scar and are considered a physical barrier to prevent axonal regeneration, we found that reactive astrocytes play a crucial role in wound healing and functional recovery after spinal cord injury. To examine their cellular property, we utilized cell sorter and isolated them from injured spinal cord. We confirmed their property as neural stem/progenitors *in vitro* but no neuronal contribution *in vivo*. The method of flow cytometric sorting for neural cells could be a powerful tool for neuroscience research.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2008 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2009 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	17,100,000	5,130,000	22,230,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：脳脊髄、脊髄損傷、再生医療

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類成体の中枢神経は再生能に乏しく、ひとたび損傷を受けると二度と再生しないと考えられている。確かに、脳梗塞や脊髄損傷後の

四肢麻痺は慢性期に入ると殆ど回復しないが、急性期であれば完全麻痺の患者を除き、殆ど全ての患者に麻痺の回復が認められる。脊髄損傷の場合、spinal shock からの離脱という曖昧な

概念で説明されるが、この損傷後亜急性期に於ける機能回復のメカニズムについては殆ど解明されていない。

(2)我々は、マウス脊髄損傷モデルを用いて機能回復と病理組織学的の相関解析の結果から、損傷部に形成される反応性アストロサイトがこの機能回復に重要であることを見いだした。これまで、反応性アストロサイトは損傷後の軸索再生を物理的・化学的に阻害し中枢神経外傷後で再生が起こらない大きな原因と見なされていたが、損傷亜急性期に於いては組織修復を促進させ、麻痺の機能回復にも重要な役割を果たすことを明らかにした。しかし、反応性アストロサイトの定義や細胞特性は殆ど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、この反応性アストロサイトの細胞特性を同定し、反応性アストロサイトによる組織修復メカニズムを明らかにすることである。また、反応性アストロサイトを選択的に解析する手法が必須であるため、目的細胞の選択的採取法確立を試みた。

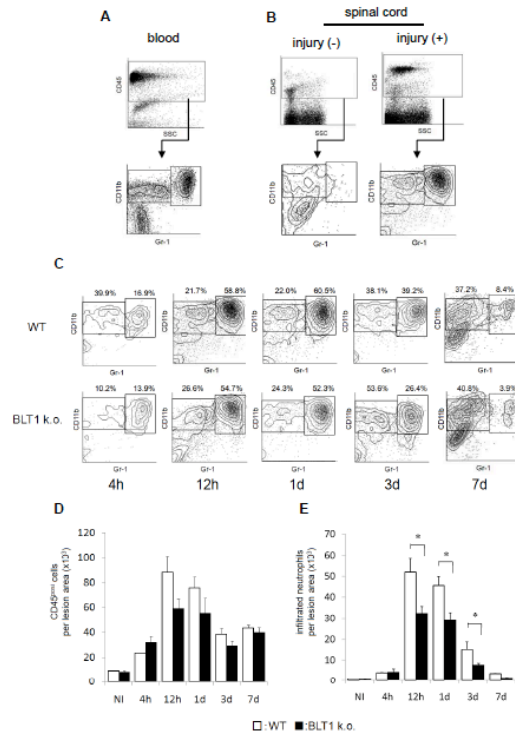
3. 研究の方法

これまで、中枢神経系に於いて特定の細胞分画のみを選択的に解析する手法は極めて限定されていた。組織全体での解析か、あるいは組織切片での免疫組織学的染色による解析、*in situ* hybridizationなどが中心である。しかし、これらの方法では大規模な発現解析が不可能であるため、細胞特性が十分に解明できないという欠点が存在した。そこで、マウス中枢神経組織を用いて、目的とする特定の細胞や、細胞の“核”のみをセルソーターにて選択的に抽出し、経時的な細胞増殖の推移や発現遺伝子の解析を試みた。また、脊髄損傷後に浸潤する炎症細胞にも焦点を当て解析した。

4. 研究成果

反応性アストロサイトのマーカーの一つである Nestin あるいは GLAST 遺伝子制御下に GFP を発現させたレポーターマウスを用いて、この細胞の選択的回収ならびに解析を試みた。まず、損傷後の GFP 発現細胞の局在や GFAP 及び Nestin との二重免疫染色の結果から、反応性アストロサイト選択的に GFP が発現していることを確認した。次に脱核剤とホモジナイザーを併用した物理的・化学的刺激により、脊髄組織から高純度に細胞核のみを抽出することに成功した。蛍光顕微鏡下で確認したところ、一部の細胞核は GFP 陽性であり、flow cytometry により GFP 陽性核のみを選択的に回収することが可能であった。この方法は、従来の細胞骨格マーカーや細胞形態からのニューロン・グリア分類ではなく、核内発現蛋白や遺伝子を指標として分類する点に特徴があり、ニューロンマーカー Hu やオリゴデンドロサイトマーカー

Olig2 抗体を用いても核のセレクションが可能であることを確認した。一方で、GFP 陽性核を採取しても、核移行シグナル(NLS)が欠損した状態では核膜孔から GFP の漏出が起こり回収が不安定であることが判明し、定量解析には不適であることが確認された。そのため、脊髄組織のホモジナイズ条件を検討し、損傷脊髄中から GFP 陽性細胞のみをセルソーターで回収することを試みた。ホモジナイズの条件を検討した結果、由来が血球系の細胞および周囲の組織との結合が比較的緩い細胞は回収できることが判明し、とくに脊髄損傷後の浸潤炎症細胞は全てプロファイル解析が可能であった。下図に示す如く、正常脊髄組織中には全く浸潤好中球を認めないが、損傷脊髄中には 12 時間をピークとして多数の浸潤好中球を認めた(下図 A,B)。また、主要な好中球走化因子である leukotriene B4 の受容体欠損マウスでは脊髄損傷後の浸潤好中球が有意に抑制され(下図 C-E)、二次的損傷の拡大が減少した結果、良好な機能回復が確認された。



これまで、外傷後の浸潤プロファイルは好中球が損傷数日でピークに達し、続いて単球/マクロファージの浸潤が起こるとされていたが、flow cytometry 解析の結果は全て損傷後 12 時間をピークとしていた。さらに、浸潤した炎症細胞を回収し、末血中の非活性化状態との発現遺伝子を比較したが、浸潤細胞では有意に炎症性サイトカイン、ケモカイン、アポトーシス誘導因子の発現が上昇していた。これまで、中枢神経系に於いて浸潤マクロファージとマイクログリアの区別は困難であったが flow cytometry 解析では CD45 の発現強度により明確に分画化

可能であることが分かった。一方、反応性アストロサイトは損傷後亜急性期に損傷中心部へ向け移動する細胞であり、Stat3シグナルの制御のもとに細胞間結合が解除されていることが分かっている。そこで、組織ホモジナイズとflow cytometry解析を行ったところ、損傷後4日から7日の脊髄組織から十分量回収できることが分かった。回収した反応性アストロサイトは培養系に於いては増殖因子存在下で自己増殖能を示し、分化誘導条件ではニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの多分化能も確認されたため、内在性神経幹細胞としての可能性が示唆された。しかし、BrdU投与実験で新生細胞をラベルし、GFP陽性細胞の分化プロファイルを詳細に解析したが、*in vivo*の環境に於いてこれらが神経細胞へと分化することは確認されなかった。このことは、反応性アストロサイトによる組織修復ならびに機能回復メカニズムは、幹細胞能を利用した細胞補充機構ではないことを示していると考えられた。採取した反応性アストロサイトに於ける発現遺伝子を解析した結果、マイクログリア同様、様々な神経栄養因子の発現が確認された。今後は採取した細胞を用いて次世代シーケンサーによる網羅的発現遺伝子の解析を行い、経時的な細胞プロファイルを明らかにする予定である。以上の研究で確立した手法は、多種多様な神経細胞がネットワークを構築して機能する中枢神経形の研究に於いて有用な解析法になり得ると考えられた。

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 19 件)

1. Harada A, Okada S, Odawara J, Kumamaru H, Saiwai H, Aoki M, Nakamura M, Nishiyama Y, Ohkawa Y. 査読有. Production of a rat monoclonal antibody specific for Myf5. *Hybridoma*. 29:59-62, 2010.
2. Saiwai H, Ohkawa Y, Yamada H, Kumamaru H, Harada A, Okano H, Yokomizo T, Iwamoto Y, Okada S. 査読有. The LTB4-BLT1 axis mediates neutrophils infiltration and secondary injury in experimental spinal cord injury. *American Journal of Pathology*. In press, 2010.
3. Okada S, Nakamura M, Saiwai H, Kumamaru H, Toyama Y, Iwamoto Y, Okano H. 査読有. Physiological significance of astrogliosis after CNS injury. *Inflammation and Regeneration*. 29:35-39, 2009
4. Okada S, Maeda T, Ohkawa Y, Harimaya K, Saiwai H, Kumamaru H, Matsumoto Y, Doi T, Ueta T, Shiba K, Iwamoto Y. 査読有. Does ossification of the posterior longitudinal ligament affect the neurological outcome following traumatic cervical cord injury? *Spine*. 34:1148-52, 2009
5. Okada S, Harada A, Saiwai H, Nakamura M, Ohkawa Y. 査読有. Generation of a rat monoclonal antibody specific for Brm. *Hybridoma*. 28:455-8, 2009
6. Harada A, Okada S, Saiwai H, Aoki M, Nakamura M, Ohkawa Y. 査読有. Generation of a rat monoclonal antibody specific for Pax7. *Hybridoma*. 28:451-3, 2009
7. Oyamada A, Ikebe H, Itsumi M, Saiwai H, Okada S, Shimoda K, Iwakura Y, Nakayama K, Iwamoto Y, Yoshikai Y, Yamada H. 査読有. Tyrosine kinase 2 plays critical roles in the pathogenic CD4 T cell responses for the development of autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology*. 183:7539-46, 2009
8. Kumagai G, Okada Y, Yamane J, Nagoshi N, Kitamura K, Mukaino M, Tsuji O, Fujiyoshi K, Okada S, Shibata S, Matsuzaki Y, Toh S, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. 査読有. Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury. *Plos One*. 4(11):e7706, 2009
9. Fujiyoshi K, Yamada M, Nakamura M, Yamane J, Kato H, Kitamura K, Kawai K, Okada S, Momoshima S, Toyama Y, Okano H. 査読有. Diffusion tensor tractography of injured spinal cord in non-human primates. *J Neurosci*. 27:11991-8, 2007
10. Renault-Mihara F, Okada S, Shibata S, Nakamura M, Toyama Y, Okano H. 査読有. Emerging beneficial role of reactive astrocytes points them as potential therapeutic targets. *Int. Journal of Biochem & Cell Biol*. 40: 1649-1653, 2008
11. Okada S, Nakamura M, Renault-Mihara F, Mukaino M, Saiwai H, Toyama Y, Iwamoto Y, Okano H. 査読有. Role of cytokine signaling in pathophysiology for spinal cord injury. *Inflammation and Regeneration*. 28:440-446, 2008
12. Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, Morikawa

- S, Okada Y, Mabuchi Y, Katoh H, Okada S, Fukuda K, Suda T, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H. 査読有. Ontogeny and Multipotency of neural crest-derived stem cells in bone marrow, dorsal root ganglia and whisker pad of adult rodents. *Cell Stem Cell*. 2:392-403, 2008.
13. 整形外科医と研究. 岡田誠司. 査読有. 日本整形外科学会会誌 82(5):18-20, 2008
 14. 移植細胞のバイオイメージング. 岡田誠司, 石井賢, 中村雅也, 戸山芳昭, 岩本幸英. 査読有. 日本整形外科学会会誌 82(11):3-8, 2008
 15. 抗 IL-6 受容体抗体による神経修復・炎症制御と神経再生. 向野雅彦, 中村雅也, 岡田誠司, 戸山芳昭, 里宇明元, 岡野栄之. 査読有. 日本臨床免疫学会会誌 31(2):93-98, 2008
 16. Yamada M, Tanemura K, Okada S, Iwanami A, Nakamura M, Mizuno H, Ozawa M, Ohyama R, Kitamura N, Kawano M, Takeuchi K, Ishitsuka C, Nagai A, Miyawaki A, Takashima A, Ogawa M, Toyama Y, Okano H, and Kondo T. 査読有. Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells. *Stem cell*. 25:562-, 2007
 17. Okano H, Kaneko SJ, Okada S, Iwanami A, Nakamura M, Toyama Y. 査読有. Regeneration-based therapies for spinal cord injuries. *Neurochem Int*. 51:68-, 2007.
 18. 脊髄損傷における反応性 astrocyte の役割. 山田理, 岡田誠司 他 3 名. 査読有. *脳* 21. 10(2):127-138, 2007.
 19. 神経の分子イメージング. 辻収彦, 中村雅也, 岡田誠司 他 6 名. 査読有. 遺伝子医学 MOOK. 9:197-203, 2007.

[学会発表] (計 21 件)

1. Okada S, Saiwai H, Kumamaru H, Okano H, Iwamoto Y. Bioluminescent imaging and isolation of engrafted neural stem/progenitor cells from injured spinal cord. The 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Oct 18-21, 2009, Chicago, USA)
2. Okada S. Stem cells for Spinal Cord Repair. 3rd Global-COE International

- Symposium: Stem Cells and Regenerative Medicine (Feb.15-16, 2009, Singapore)
3. Saiwai H, Ohkawa Y, Kumamaru H, Iwamoto Y, Okada S. The physiological role of infiltrated leukocytes after spinal cord injury. The 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Oct 18-21, 2009, Chicago, USA)
 4. 岡田誠司, 幸博和, 熊丸浩仁, 岩本幸英. 脊髄損傷修復に関する反応性アストロサイトの選択的解析. 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会. (2009. 11. 5-6 横浜)
 5. 幸博和, 岡田誠司, 熊丸浩仁, 松本嘉寛, 播播広勝三, 土井俊郎, 岩本幸英. 脊髄損傷に於ける炎症細胞浸潤の意義. 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会. (2009. 11. 5-6 横浜)
 6. 熊丸浩仁, 岡田誠司, 幸博和, 松本嘉寛, 播播広勝三, 土井俊郎, 岩本幸英. 損傷脊髄に生着した神経幹細胞の機能解析第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2009. 11. 5-6 横浜)
 7. 池上健, 岩波明生, 加藤裕幸, 岡田誠司, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也. マウス脊髄損傷における glycogen synthase kinase-3 β の抑制は軸索再生と運動機能の改善を促進する. 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2009. 11. 5-6 横浜)
 8. 岡田誠司. 基礎研究による脊髄損傷の病態解明. 第 320 回 Monthly Orthopaedic Conference. (2009. 10. 26 福岡) (日整会教育研修講演)
 9. Saiwai H, Okada S, Harada A, Ohkawa Y. Epigenetic regulation of muscle regeneration and differentiation. The 23rd Naito Conference-Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells (Nov 11-14, 2008, Kanagawa)
 10. Saiwai H, Iwamoto Y, Okada S. The physiological role of infiltrated neutrophils after spinal cord injury. The 39st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (July 10, 2008, Tokyo)
 11. Okada S. Conditional ablation of Stat3

or Socs3 discloses the dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. The Joint Symposium of the 3rd International Symposium of Institutes Network and Hot Spring Harbor Global-COE Symposium (Feb. 1-2, 2008, Beppu, Jpn)

12. 幸博和、岡田誠司、播播広勝三、土井俊郎、岩本幸英. 脊髄損傷に於ける浸潤好中球の生理的意義. 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2008. 10. 23-4 京都)
13. 岡田誠司、中村雅也、岡野栄之、芝啓一郎、戸山芳昭、岩本幸英. 脊髄損傷に於ける反応性アストログリアの新しい役割. 第 81 回日本整形外科学術集会 (2008. 5. 22-24 札幌)
14. 岡田誠司、前田健、植田尊善、芝啓一郎、岩本幸英. 後縦靭帯骨化はせき損の麻痺に影響を与えるか? -非骨傷性頸髄損傷患者に於ける検討-. 第81回日本整形外科学術集会 (2008. 5. 22-24 札幌)
15. 岡田誠司. 基礎研究による脊髄損傷の病態解析 -炎症から修復機転まで-. 第8回九州ミエロパチー研究会 (2008. 2. 15)
16. 岡田誠司. 脊髄損傷に対する基礎的研究の現状と展望. 佐世保整形外科医会 (2008. 11. 21 佐世保)
17. 岡田誠司. 移植細胞の *in vivo* イメージング. 第 4 回福岡再生医療研究会 (2007. 5. 30 福岡)
18. 岡田誠司. 若手整形外科医は何を考えているか - 臨床と研究の両立. 第80回日本整形外科学会 (2007. 5. 24-27 神戸)
19. 岡田誠司、岡野栄之、中村雅也、戸山芳昭、岩本幸英. 光技術の整形外科領域への応用: 移植細胞のバイオイメージング. 第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2007. 10. 25-26 浜松)
20. 岡田誠司、中村雅也、戸山芳昭、岩本幸英、岡野栄之. 中枢神経外傷とサイトカインシグナル. 第 28 回日本炎症再生医学会 (2007. 8. 2-3 東京)
21. Okada S, Masaya Nakamura, Yoshiaki Toyama, Yukihide Iwamoto, Hideyuki Okano. Roles of Astrocytes in the Brain

Function and its Maintenance - A dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. Neuro2007 (第30回日本神経科学大会、第50回日本神経化学大会、第17回日本神経回路学会大会 合同国際学会) (2007. 9. 10-12 Yokohama)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 誠司 (OKADA SEIJI)
九州大学・医学研究院・特別准教授
研究者番号: 30448435

(2) 研究分担者 なし