

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390377

研究課題名 (和文) ヒト骨髄間質細胞を用いた中枢神経再生、臨床応用にむけた新たなテクノロジーの研究

研究課題名 (英文) Human bone marrow stromal cells transplantation to regenerate central nervous system; The translational research with novel technologies.

研究代表者

七戸 秀夫 (SHICHINOHE HIDEO)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：80374479

研究成果の概要 (和文) : ヒト骨髄間質細胞 (BMSC) を利用した中枢神経再生を臨床応用させるため、その効率的な手法の確立と安全性の追求を目指した研究を行い、以下の成果を得た。(1) バイオマトリックスを用いた BMSC 培養に成功した。(2) G-CSF (顆粒球コロニー刺激因子) を培養液中に添加すると、BMSC が活性化された。またヒト PL (血小板溶解物) を添加し、動物由来成分を排除した培養を行いその有用性を示した。(3) フィブリンマトリックスやメビオールジェル® はスキャフォールドとして有用であり、病変部へ BMSC を効果的にデリバリーすることを示した。(4) 移植後のヒト BMSC の挙動を、光イメージング技術や MRI にて非侵襲的、経時的にモニタリングできた。

研究成果の概要 (英文) : This study was aimed to translate the regenerative medicine with human bone marrow stromal cells (BMSC) to the central nervous system disorders. The results were as follows; (1) the BMSC could be cultured with some bio-matrixes. (2) The addition of G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) to the culture medium could stimulate the cellular activity of the BMSC. On the other hand, the addition of human platelet lysate (PL) was useful for the animal serum-free cell culture. (3) The scaffold with fibrin matrix or Mebiol gel® was useful as a cell delivery system to the lesion. (4) The behavior of the transplanted BMSC could be monitored temporally and noninvasively using the optical imaging or MRI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2009 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

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：中枢神経再生医療、骨髄間質細胞、幹細胞移植、脳梗塞、脊髄損傷、サイトカイン、バイオマテリアル、光イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経疾患には様々な病態が存在するが、ひとたび損傷を受けた場合その再生は困難であり、治療法としてリハビリテーション以外有効な手段は存在しなかった。このためブレイクスルーとして期待されているのが、幹細胞移植による中枢神経再生医療である。近年、骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cell; BMSC) が中枢神経再生に有用であることが明らかとなり、患者本人の骨髄を用いた再生医療の可能性が注目されている。自己BMSCを利用することで、腫瘍形成や免疫拒絶反応、生命倫理的問題を回避できることから、この治療法は他の細胞ソースと比べ臨床応用に最も近いと考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究は、ヒトBMSCを利用した中枢神経再生を臨床応用させるため、その効率的な手法の確立と安全性の追求を目的とし計画された。

## 3. 研究の方法

(1) BMSCを培養する際、バイオマテリアルの有用性を検討するために、フィブリンマトリックスおよびメビオールジェル®内でBMSC培養を行ない、細胞増殖能などを検討した。

(2) 効率的で安全なBMSC培養を達成するため、老齢マウスのBMSCをG-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) とともに培養し、その細胞増殖能や機序を検討した。また、その細胞をマウス脳梗塞モデルに移植し治療効果を検討した。さらに、従来のウシ胎仔血清 (FCS) に替えヒト Platelet lysate (PL) をもちいた細胞培養の実験をおこなった。細胞増殖速度、ヒトBMSCの表面マーカー、神経栄養因子などの産生、神経系細胞への分化傾向などを検討した。ま

た、その細胞をマウス脳梗塞モデルに移植し治療効果を検討した。

(3) 中枢神経疾患にBMSCを移植する際、バイオマテリアルをスキャフォールドとしてもちいることが有用であるか検討した。フィブリンマトリックスをスキャフォールドとして用い、ラット脊髄損傷モデルおよびラット脳凍結損傷モデルに対してBMSCを損傷部に移植し、細胞生着や遊走、神経系細胞への分化傾向などを検討した。またメビオールジェル®を用いてラット脳梗塞モデルに対してBMSCを損傷部に移植し、同様に細胞生着や遊走、分化傾向などを検討した。さらに、ラット慢性脳循環低下モデルに対しBMSC移植を行い、治療効果を検討した。

(4) BMSC移植後に脳内での細胞の挙動を追跡するため、近赤外線領域の蛍光を発するナノ粒子を用いた光イメージング技術や、Super-paramagnetic iron oxide (SPIO) 粒子を用いたMRIによって細胞追跡をおこなった。

## 4. 研究成果

(1) BMSCはフィブリンマトリックス内で培養を行なうと、長期間生存が可能であることを示した。この結果を受け、バイオマテリアルとしてメビオールジェル®を用いた実験を行ったところ、フィブリンマトリックスに比較して良好な細胞生存を示した。

(2) 老齢マウスのBMSCを、G-CSFとともに培養することで細胞増殖能が亢進することが示された。さらに、その細胞をマウス脳梗塞モデルに移植すると神経症状の改善がより顕著になり、治療効果を増強することができることを証明した。また、ヒトPLをもちいてBMSCを培養すると、その細胞増殖速度は、従来のFCSで培養する方法とほぼ同等であった。

表面マーカーや、神経栄養因子などの産生、神経系細胞への分化傾向に差はなかった。これらの細胞をマウス脳梗塞モデルに移植した場合も、細胞生着、病変部への遊走、分化傾向、神経症状改善などに有意差は認めず、PLを用いることで動物血清を使用せず安全にヒトBMSCを培養できることを明らかにした。

(3) フィブリンマトリックスをスキャフォールドとして用い、ラット脊髄損傷モデルおよびラット脳凍結損傷モデルに対してBMSCを損傷部に移植すると、細胞単独移植に比べ、移植後の細胞生着や病変深部への遊走、神経系細胞への分化傾向などで良好な結果を示した。

またメビオールジェル®を用いてラット脳梗塞モデルに対してBMSCを損傷部に移植すると、同様に細胞単独移植に比べ細胞生着や遊走、分化傾向などで良好な結果を示した。さらにラット慢性脳循環低下モデルでは、BMSC移植により認知機能の低下や虚血性白質障害の進行を防ぐといった治療効果を示した。

(4) 近赤外線領域の蛍光を発するナノ粒子によりBMSCを標識し、光イメージング技術を用いることで、無侵襲に移植後に遊走する細胞を画像化することができた。またSuper-paramagnetic iron oxide(SPIO)粒子を用いてBMSCを標識すると、MRIにより脳内での移植細胞の挙動を追跡することが可能となった。

#### 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) 以下は全て査読有り

1) Sugiyama T, Kuroda S, Takeda Y, Nishio M, Ito M, Shichinohe H, Koike T. Therapeutic Impact of Human Bone Marrow Stromal Cells (hBMSC) Expanded by Animal

Serum-Free Medium for Cerebral Infarct in Rats. Neurosurg. 2011 (in press)

2) Sugiyama T, Kuroda S, Osanai T, Shichinohe H, Kuge Y, Ito M, Kawabori M, Iwasaki Y. Near-infrared fluorescence labeling allows non-invasive tracking of bone marrow stromal cells transplanted into rat infarct brain. Neurosurg. 2011 (in press)

3) Kuroda S, Shichinohe H, Houkin K, Iwasaki Y. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for central nervous system disorders - Recent progress and perspective for clinical application. J Stem Cell Regen Med 2011; 7: 1-12

4) Shichinohe H, Kuroda S, Sugiyama T, Ito M, Kawabori M. Bone marrow stromal cell transplantation attenuates cognitive dysfunction due to chronic cerebral ischemia in rats. Dement Geriatr Cogn Disord. 2010; 30: 293-301

5) Osanai T, Kuroda S, Yasuda H, Chiba Y, Maruichi K, Hokari M, Sugiyama T, Shichinohe H, Iwasaki Y. Noninvasive transplantation of bone marrow stromal cells for ischemic stroke: preliminary study with a thermoreversible gelation polymer hydrogel. Neurosurg. 2010; 66: 1140-7

6) Chiba Y, Kuroda S, Shichinohe H, Hokari M, Osanai T, Maruichi K, Yano S, Hida K, Iwasaki Y. Synergistic effects of bone marrow stromal cells and a Rho kinase (ROCK) inhibitor, fasudil on axon regeneration in rat spinal cord injury. Neuropathol. 2010; 30: 241-50

7) Shichinohe H, Kuroda S, Maruichi K, Osanai T, Sugiyama T, Chiba Y, Yamaguchi

A, Iwasaki Y. Bone marrow stromal cells and bone marrow-derived mononuclear cells: which are suitable as cell source of transplantation for mice infarct brain? Neuropathol. 2010; 30: 113-22

8) Yasuda H, Kuroda S, Shichinohe H, Kamei S, Kawamura R, Iwasaki Y. Effect of biodegradable fibrin scaffold on survival, migration, and differentiation of transplanted bone marrow stromal cells after cortical injury in rats. J Neurosurg. 2010; 112: 336-44

9) Chiba Y, Kuroda S, Maruichi K, Osanai T, Hokari M, Yano S, Shichinohe H, Hida K, Iwasaki Y. Transplanted bone marrow stromal cells promote axonal regeneration and improve motor function in a rat spinal cord injury model. Neurosurg. 2009; 64: 991-9

10) Hokari M, Kuroda S, Chiba Y, Maruichi K, Iwasaki Y. Synergistic effects of granulocyte-colony stimulating factor on bone marrow stromal cell transplantation for mice cerebral infarct. Cytokine. 2009; 46: 260-6

11) Maruichi K, Kuroda S, Chiba Y, Hokari M, Shichinohe H, Hida K, Iwasaki Y. Transplanted bone marrow stromal cells improves cognitive dysfunction due to diffuse axonal injury in rats. Neuropathol. 2009; 29: 422-32

12) Itosaka H, Kuroda S, Shichinohe H, Yasuda H, Yano S, Kamei S, Kawamura R, Hida K, Iwasaki Y. Fibrin matrix provides a suitable scaffold for bone marrow stromal cells transplanted into injured spinal cord: A novel material

for CNS tissue engineering. Neuropathol. 2009; 29: 248-57

13) Maruichi K, Kuroda S, Chiba Y, Hokari M, Shichinohe H, Hida K, Iwasaki Y. Graded model of diffuse axonal injury for studying head injury-induced cognitive dysfunction in rats. Neuropathol. 2009; 29: 132-9

14) Shichinohe H, Kuroda S, Tsuji S, Yamaguchi S, Yano S, Lee JB, Kobayashi H, Kikuchi S, Hida K, Iwasaki Y. Bone marrow stromal cells promote neurite extension in organotypic spinal cord slice: significance for cell transplantation therapy. Neurorehabil Neural Repair. 2008; 22: 447-57

[学会発表] (計 35 件)

1) Shichinohe H, Bone marrow stromal cell transplantation attenuates cognitive dysfunction due to chronic cerebral ischemia in rats. 国際脳卒中会議 2011、2011年2月9日、ロサンゼルス

2) Kuroda S, Transplantation of autologous bone marrow stromal cells (BMSC) for CNS disorders - Strategy and tactics for clinical application. 第5回日印再生医療研究会、2010年9月25日、チェンナイ、インド

3) 黒田 敏、脳卒中に対する骨髄間質細胞移植研究の現状と課題、第35回日本脳卒中学会総会、2010年4月15日、盛岡

4) Shichinohe H, Bone marrow stromal cells and bone marrow-derived mononuclear cells: which are suitable as cell source of transplantation for mice infarct brain? 国際脳卒中会議 2010、2010年2月25日、サンアントニオ

5) Shichinohe H, Bone marrow stromal

cell transplantation for cerebral stroke - lab to bedside. 第35回北米神経科学大会、2008年11月19日、ワシントンDC

[その他]  
ホームページ  
<http://www.neurosurgery-hokudai.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

七戸 秀夫 (SHICHINOHE HIDEO)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号：80374479

### (2) 研究分担者

黒田 敏 (KURODA SATOSHI)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号：10301904

岩崎 喜信 (IWASAKI YOSHINOBU)  
北海道大学・大学院医学研究科・名誉教授  
研究者番号：00113522

飛驒 一利 (HIDA KAZUTOSHI)  
北海道大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：10238305

小林 浩之 (KOBAYASHI HIROYUKI)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号：70374478

### (3) 連携研究者

なし