

平成23年4月11日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591717

研究課題名(和文) 遺伝子組換え骨髄幹細胞の静脈内移植による脊髄損傷治療の基礎的研究

研究課題名(英文) Therapeutic benefits of intravenous administration of genetically-engineering mesenchymal stem cells on spinal cord injury

研究代表者 野中 雅 (NONAKA TADASHI)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60180759

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷モデルラットに対して、骨髄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、遺伝子組換え骨髄幹細胞を投与することで損傷局所のBDNF濃度を上げることで治療効果が更に高まることが判明した。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か月以上経過した亜急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 MSCs derived from bone marrow to study their potential therapeutic effect in a contusive SCI model in the rat. Light microscopic examination revealed that cavitation in the contused spinal cords was less in the MSC-treated rats. Functional outcome was greater in the MSC-treated groups than in sham controls with greatest improvement in the earlier post-contusion infusion times. BDNF-hypersecreting MSC enhanced the therapeutic benefits of MSC on SCI. 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
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：①移植・再生医療②再生医学③神経科学④脳・神経⑤発生・分化

1. 研究開始当初の背景

骨髄幹細胞は、静脈内に投与すると様々な難治性神経疾患に対して治療効果を発揮す

ることが判明していた。その中でも患者数が多く、特に年齢が若く受傷することが多い難治性神経疾患である脊髄損傷への応用が期

待されていた。臨床への実用化へ向けて、脊髄損傷急性期および亜急性期に対する治療効果を多角的に検証する必要がある。また、治療メカニズムを解析することで、更に治療効果を向上させる可能性も検討する必要がある。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周知の事実である。

本研究では、骨髄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、脊髄損傷の急性期から亜急性期に対する、骨髄幹細胞の静脈内投与治療を確立するための基礎研究を主目的とした。

3. 研究の方法

脊髄損傷モデルは、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主に使用した。移植する細胞は、骨髄幹細胞を用いた。また、計画は当初の予定どおり下記のように実施した。

《実験計画および目標》

計画1：NYUインパクトによりラット脊髄損傷モデルを作成し、骨髄幹細胞を静脈内投与することによる効果を評価する

計画2：骨髄幹細胞を脊髄損傷モデルラットへ投与し、局所の再生と対応する大脳皮質運動ニューロンの損傷への影響を解析する。

計画3：脊髄損傷局所におけるサイトカインが、細胞治療によってどのように修飾されるかを解析する。

計画4：脊髄損傷モデルにおける、大脳運動野が、細胞治療によってどのように修飾されるかを解析する。

計画5：サイトカイン遺伝子導入幹細胞の投与により、治療効果の向上を検討する。

《解析方法》

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: ドナー細胞を標識することで、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。

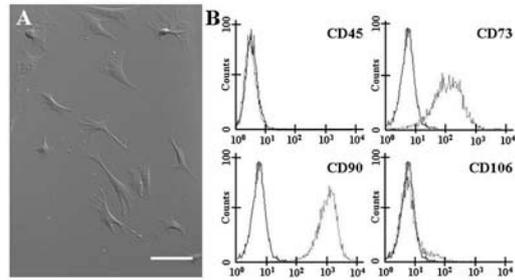
4: ELISA法により、組織のBDNFレベルを測定した。

5: 脊髄組織を固定した後、様々な染色を行い、組織学的に解析した。

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

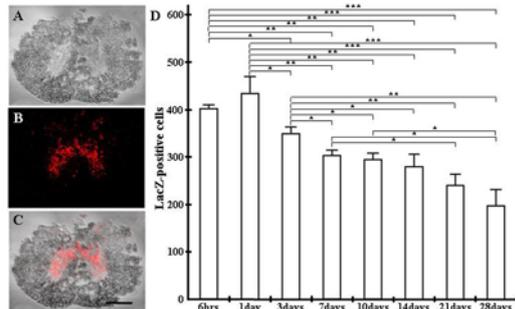
4. 研究成果

ラット骨髄幹細胞を培養・増殖し、本研究に必要な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。

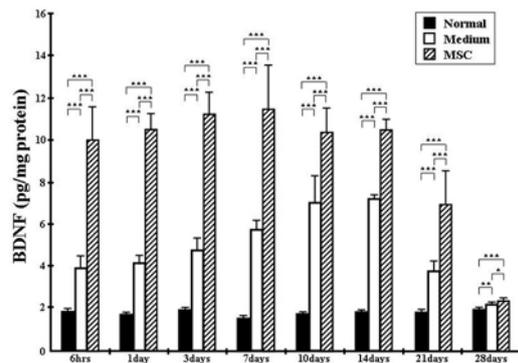


脊髄損傷モデルとして、NYUインパクトを主に用い、胸髄(Th10レベル)に直接損傷を加えるモデルを確立し、骨髄幹細胞を静脈内に投与した。

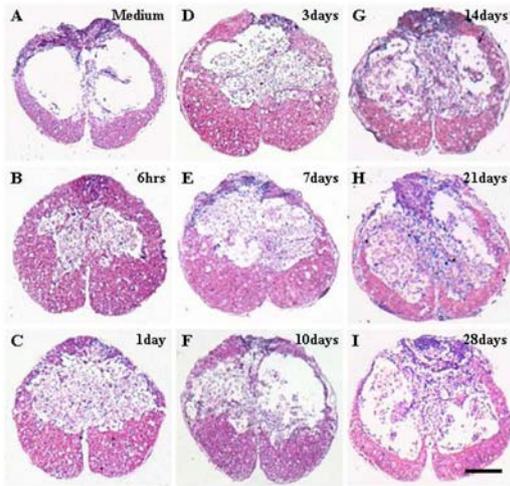
移植後、損傷脊髄を組織学的に解析した結果、LacZでマークした骨髄幹細胞は、静脈内に投与されたにも関わらず、損傷部位に多量に集積することが判明した。また、その集積の程度は、急性期に最高となるものの、1ヶ月以上経過した亜急性期においても、治療効果を発揮するのに十分な細胞量が集積しているのが認められた。



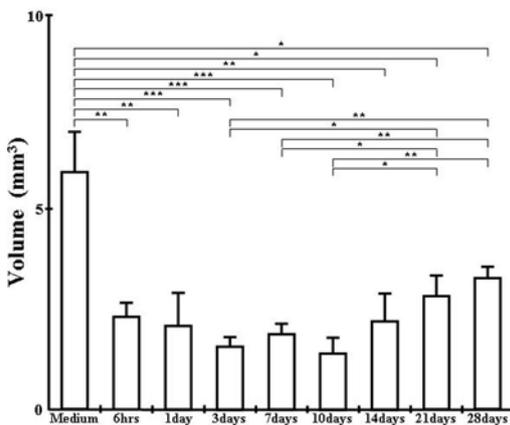
さらに、局所のBDNF濃度が細胞移植により著明に上昇することが判明したことより、治療メカニズムにBDNFを介する神経保護作用が多量に関与していることが判明した。また、これらの細胞治療によるBDNF上昇は、脊髄損傷発症後の超急性期に治療した場合のみならず、1か月以上経過した亜急性期に治療を行っても効果が認められたことより、“Therapeutic time window”は比較的広いことが分かった。



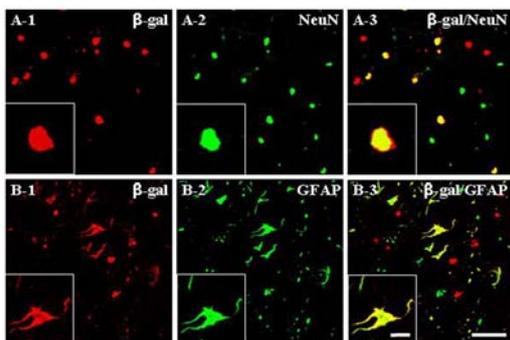
組織学的には、細胞移植により損傷範囲の減少と、その後起こる空洞形成が抑制されることが判明した。すなわち、脊髄損傷後は空洞形成が起こることが広く知られているが、細胞治療による抑制的に作用することが判明した。



組織学的結果を画像解析ソフトを用いて定量的に解析した結果も細胞治療の効果を裏付けた。

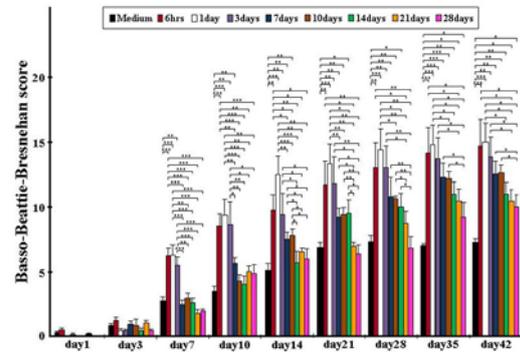


また、移植細胞は脊髄損傷部の局所において神経細胞やグリア細胞へと分化することが判明した。これらのことから、治療メカニズムに再生作用が関与していることが判明した。

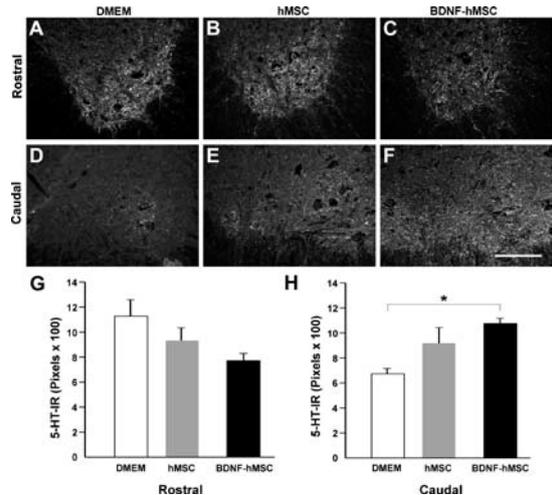


行動学的解析でも治療群で運動機能の回

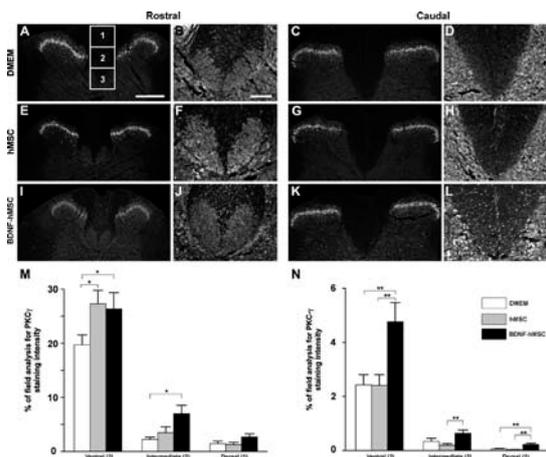
復が顕著に認められた。すなわち、治療効果は脊髄損傷直後に移植すると最大であり、その後、時間の経過とともに治療効果は弱まってくるものの、損傷後1ヶ月を経過しても、移植治療効果が少なからず見られた。



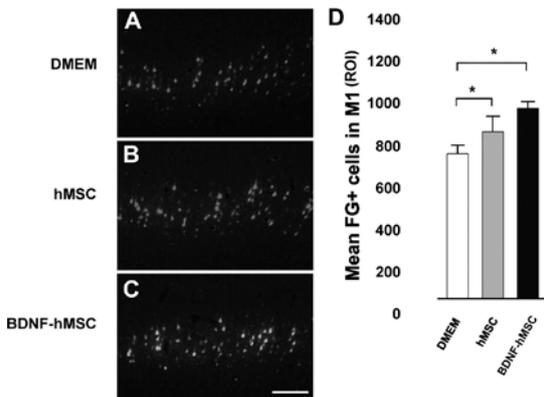
さらに、移植細胞が損傷部局所において再生作用を發揮しているのかも解析した結果、5-HT陽性神経細胞数が局所で増加していることが判明した。しかも、この効果は、遺伝子組換え骨髄幹細胞 (BDNF-hypersecreting stem cell) を移植し、損傷局所組織内でBDNF濃度を上げることで、効果が増強されることが判明した。



また、神経軸索の”Sprouting”も促進することで神経再生作用を増強することも判明した。しかも、この効果は、遺伝子組換え骨髄幹細胞 (BDNF-hypersecreting stem cell) を移植し、損傷局所組織内でBDNF濃度を上げることで、効果が増強されることが判明した。



一方、脊髄における神経軸策の大元である脳皮質の神経細胞死も、細胞治療により抑制されることが判明した。しかも、この効果は、遺伝子組換え骨髄幹細胞 (BDNF-hypersecreting stem cell) を移植し、損傷局所組織内で BDNF 濃度を上げることで、効果が増強されることが判明した。



これらのことより、実用化への期待が益々高まった。このように、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

[論文] (計 2 件)

- ① Osaka M, Honmou O, Murakami T, Nonaka T, Houkin K, Hamada H, Kocsis J.D.: Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. *Brain Res.* 1334: 226-235, 2010. 査読あり
- ② Sasaki M, Radtke C, Tan A.M. Zhao P, Hamada H, Houkin K, Honmou O, Kocsis J.D.: HBDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote

functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience* 29(47):14932-14941, 2009. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

- ① 本望 修 脊髄損傷に対する培養骨髄幹細胞の静脈内投与 社団法人 日本脳神経外科学会 第 69 回学術集会 2010.10.28 福岡
- ② 大阪美鈴ら 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. 10.14 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野中 雅 (NONAKA TADASHI)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：60180759

(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
(H20, H21)

(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