

平成 22 年 6 月 9 日現在

研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2008 ～ 2009
課題番号：	20791019
研究課題名(和文)	骨髄間質幹細胞を用いた錐体神経細胞分化誘導と、脳梗塞に対する移植再生治療法の開発
研究課題名(英文)	Induction of pyramidal neuronal cells from bone marrow stromal stem cells and application for autologous transplantation against the cerebral infarction.
研究代表者	
	野々口 直助 ( Nonoguchi Naosuke )
	大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：	70388263

研究成果の概要(和文)：浮遊培養にて sphere を形成させることで濃縮分離した骨髄間葉系幹細胞に Notch 細胞内ドメインおよび下垂体アデニレートサイクラーゼ活性化タンパクを遺伝子導入により一過性に発現させた上で、FGF-2 等のサイトカインカクテルで刺激すると、明らかな形態変化と共に成熟神経細胞のマーカーを発現する細胞が分化誘導され、一部の細胞には錐体神経細胞の特徴である EAC1 (グルタミン酸輸送蛋白) の発現が確認された。この BMSC から分化転換させた神経系細胞をラット脳梗塞モデルの脳内へ移植したところ、移植後 1 ヶ月の時点において移植細胞の一部は脳虚血巣辺縁部に生着し、シナプスの形成を示唆する蛋白(スナプトフィジン等)の発現が観察された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated the way to induce the EAC1(glutamate transporter)-positive pyramidal neuron-like cells from rat bone marrow stromal stem cells (BMSC). Transient hypoxia and cytokines stimulation following the genes transfection of Notch intracellular domain (NICD) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) promoted the transdifferentiation of BMSCs into the multipolar neuron-like cells. One month after the transplantation of these cells into the infarcted brain, some of recipient cells had survived in the peri-ischemic area of host brain and expressed the synapse-associated proteins.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：骨髄幹細胞、神経分化、分化転換、神経再生、幹細胞移植、脳梗塞、錐体神経細胞

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄間葉系細胞は骨髄細胞の約1割程度を占める minor population ではあるが、血液細胞の分化・増殖や血液幹細胞の維持するための骨髄微小環境の形成に重要な役割を果たしている。この population の中に多分化能を有する骨髄間葉系幹細胞（以下 BMSC）が存在することが見出され再生医療への応用が期待されている。骨髄細胞の利点としては、自家移植が可能のため感染症の危険性や倫理的障壁が少ないこと、ES 細胞・iPS 細胞などの万能性幹細胞と比較して teratoma を形成する率が低いことなどが上げられる。

BMSC は mesenchymal stem cell の範疇に分類されているが、この幹細胞の特徴の一つとして移植した臓器に特異的な細胞形質を分化によって獲得するという pluripotent な性質が挙げられる。実際 BMSC を脳内に移植すると、報告により差はあるものの生着した細胞の約1%前後が neuron または glia のマーカーが陽性の細胞へと分化することが知られている。その一方で、脳内で神経細胞へと分化した BMSC が、host の neuron とシナプスを形成して機能的ネットワークの再構築に寄与したことを証明した報告は未だ存在しない。

従って BMSC を中枢神経再生医療に応用するためには、移植する BMSC に高効率に神経系の細胞形質を獲得させる方法、および移植した BMSC が host 脳内で機能的な神経細胞へと成熟させるための方法論の確立が必要である。

## 2. 研究の目的

ラット骨髄より BMSC を採取し、以下の2つの研究目的を設定して実験を行った。

- (1) これまでのところ全能性幹細胞（iPS 細胞・ES 細胞）と神経組織幹細胞だけで成功している pyramidal neuron の分化誘導が、BMSC から可能であることを明らかにする。
- (2) ラット脳梗塞モデルに対する BMSC 由来神経系細胞の移植治療実験（経静脈内移植・脳内直接移植）を行い、BMSC の中枢神経再生医療細胞ソースとしての可能性を検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) BMSC の *in vitro* における神経分化誘導

#### ① 骨髄間葉系幹細胞の回収・初期培養

骨髄間葉系細胞は発現する細胞表面マーカーの異なる hetero な細胞の集団であることが知られる。Side-population 法等をはじめとして BMSC の分離には種々の方法が報告されているが、本研究では幹細胞への刺激を極力少なくすることを優先して、以下の手順で分化誘導実験に用いる BMSC の分離・濃縮を行った。

i) SD ラットの大腿骨および上腕骨より骨髄細胞を回収し、L-glutamine/4%FBS 入りの MEM 培地を用いて接着培養条件で培養。非接着系の細胞を除去した。

ii) デッシュに生着している細胞の中で colony 様細胞集落を形成している径が小さく形の丸い細胞群を pick-up し、非接着培養条件へと移し浮遊培養環境で形成された spheroid（以下 BMSC-sphere）を sorting し回収した。

#### ② 遺伝子導入を用いない神経分化誘導法の検証

これまでに BMSC に対する神経細胞系形質誘導作用があることが報告されている chemical agents を検証することを目的として、BMSC-sphere より単離培養した細胞に対し以下のものを培地に加えて分化誘導実験を行った。: 5-azacytidine、 $\beta$ -mercaptoethanol、Dimethyl sulfoxide、Valproic acid、Forskolin

#### ③ BMSC に対する遺伝子導入

*NICD* (Notch intracellular domain) の cDNA (pCl-neo-NICD) および *PACAP* (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide) の cDNA

(pCl-hygro-PACAP) を、回収した BMSC に Amaxa 社の Nucleofector システムを用いて遺伝子導入し、NICD および PACAP を一過性に高発現する BMSC-sphere を作成した。

#### ④ NICD/PACAP-BMSC に対する分化誘導

上記③のステップで作成した NICD/PACAP-BMSC に種々のサイトカイン (FGF-2、EGF、PDGF、NGF、HGF、VEGF、CNTF、BDNF、Erythropoietin) を作用させて神経細胞系への trans-differentiation を試みた。

#### ⑤ 神経細胞分化転換の評価

分化誘導に伴う BMSC の神経系細胞への形質転換については、1) 形態学的変化、2) 神経系分化に関わると思われる遺伝子の mRNA レベルでの発現評価 (RT-PCR)、3) 神経特異的タンパクに対する免疫染色を行うことで評価した。

## (2) BMSC 由来神経細胞の脳梗塞モデルへの移植治療実験

### ①疾患モデル

移植治療実験を行うための脳梗塞動物モデルは6週齢の雌の SD rat (移植骨髄を採取するのと同じ strain) を用いて以下の2種類の脳梗塞モデル A)、B) を作成した。

A) 「4血管閉塞モデル (両側総頸・椎骨動脈を6分間閉塞させることにより脳内の虚血脆弱位の神経細胞に選択的に apoptosis を誘導するモデル)」

B) 「中大脳動脈閉塞モデル (片側の中大脳動脈を閉塞させることにより同血管の支配領域の広範囲に脳梗塞を誘導するモデル)」

### ②移植治療用細胞

雄の GFP-transgenic SD rat より採取した BMSC (以下 GFP-BMSC) に、Notch 細胞内ドメイン遺伝子及び PACAP 遺伝子を導入し、neomycin および hygromycin 入りの medium 内で両者の遺伝子が導入された NICD/PACAP-GFP-BMSC を選択培養した。移植治療コントロール群として遺伝子導入を行っていない GFP-BMSC を用意した。これらの細胞を EGF+FGF-2 存在下に MEM/F12 培養液で非接着培養し colony sphere を形成させた。

### ③移植治療実験 (脳内移植)

全脳虚血モデル(A)は作成から3日後に、中大脳動脈閉塞モデル(B)は作成から2時間後の時点で基底核領域に定位的に細胞移植治療を実施した。治療群として“Notch+PACAP-GFP-BMSC 移植群”、“GFP-BMSC 移植群”、“PBS 注入群”の3群を設定した。(移植細胞数:  $5 \times 10^3$  cells/rat)

### ④ 脳梗塞モデル動物の神経症状の評価

SD ラット全脳虚血モデル(A)では実験動物の高次脳機能の評価する目的で、移植治療から1ヶ月後に Water maze test 並びに明暗室を使った Passive avoidance test を行い、各群における両検査の latency を測定した。

SD ラット中大脳動脈閉塞モデル(B)に対しては rat modified neurological severity score : mNSS (比較的広く用いられる神経症状評価スコア) を用いて経時的な神経脱落症状の評価を行った。

### ⑤免疫組織学的検討

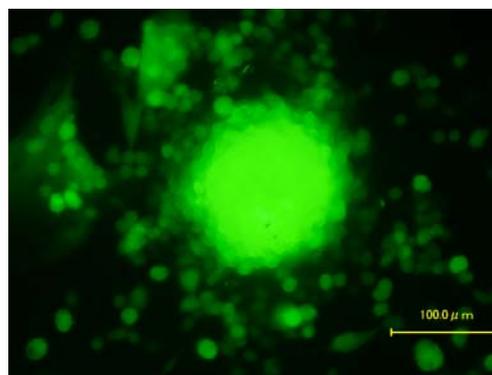
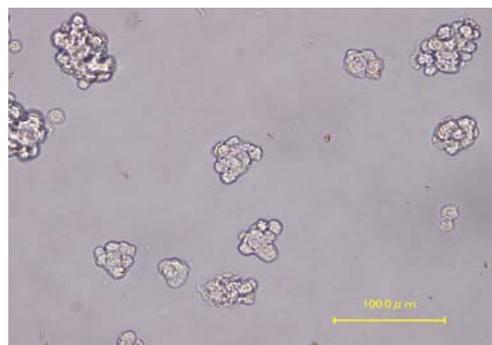
神経症状評価後に動物を sacrifice して脳の病理組織切片を作製し、移植部位をはじめ脳内各所における GFP 陽性細胞 (survive した移植治療細胞) の分布から移植細胞の生着率と脳内での migration の様子について評価を行なった。また Nestin、Tuj-1、MAP2、GFAP、NG2、Olig-1 の免疫染色を行い、GFP 陽性移植細胞の脳内での分化状態について検討するとともに、神経細胞マーカーを発現している移植細胞にシナプスの形成が認められるかどうかを Synaptophysin および synaptobrevin に対する免疫染色を行い検討した。

## 4. 研究成果

\* 論文投稿中のため研究データの主要なもののうち要点を記す。

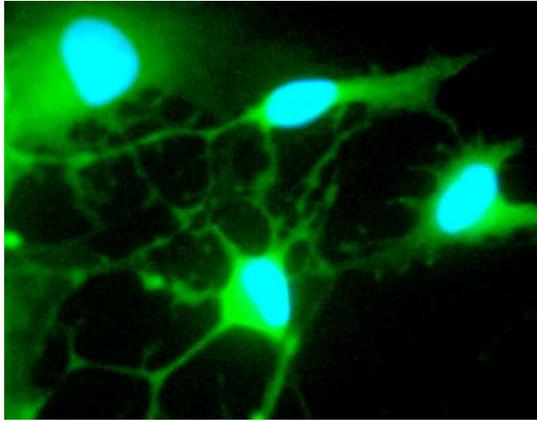
### (1) BMSC の *in vitro* における神経分化誘導について

#### ① BMSC-sphere の形成 : <写真>



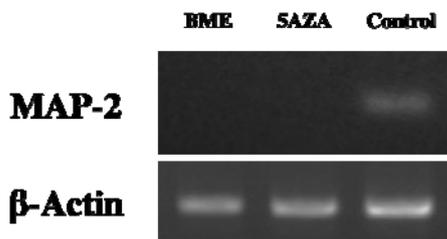
②遺伝子導入を用いない神経分化誘導法の検証

5-azacytidine および  $\beta$ -mercaptoethanol には明らかな細胞骨格の変化を伴う形態学変化を誘導する作用を認めたが、RT-PCRにて成熟神経細胞のマーカーである MAP-2 の発現増加は確認されなかった。

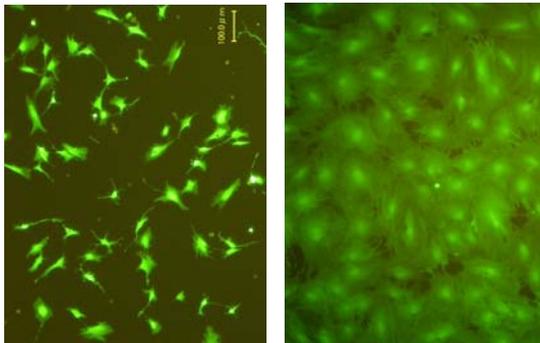


<写真： $\beta$ -mercaptoethanol 処理 24 時間後の BMSC-GFP の細胞形態変化。核染色 Hoechst >

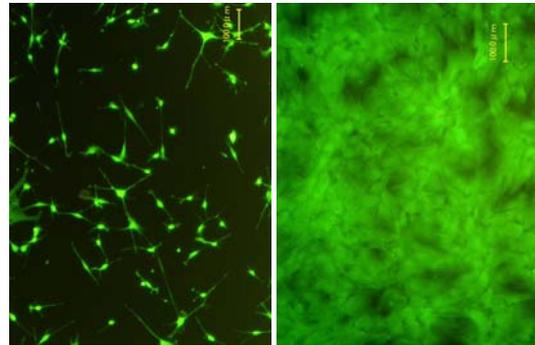
・ MAP-2 mRNA 発現の定性評価 (RT-PCR : 下図)



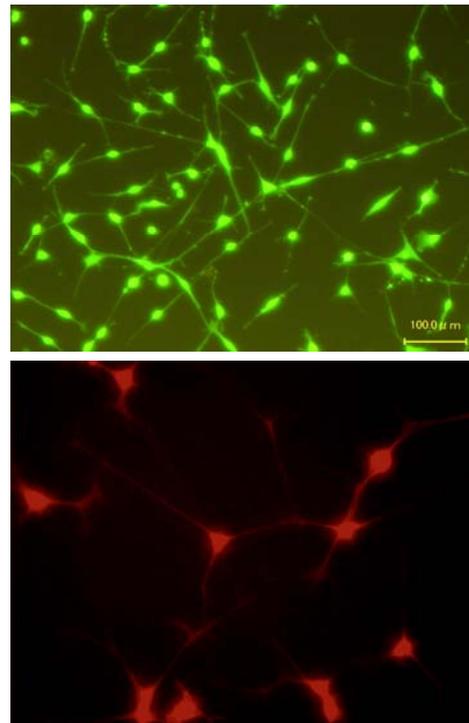
③④ BMSC-sphere を分離し接着培養環境に置き、分化誘導刺激のためのサイトカインカクテルを培地に加えてから 48 時間後の形態変化の様子。:NICD/PACAP を導入した BMSC (写真左) と遺伝子導入をしていない BMSC (写真右) とでその形態に明らかな差が見られる。



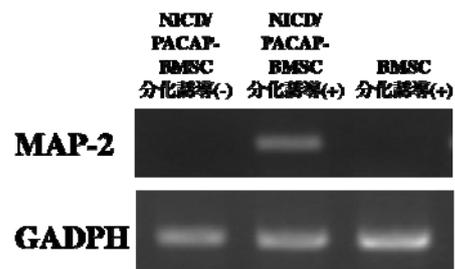
・ 分化誘導開始より 7 日後の形態変化の様子。:NICD/PACAP を導入した BMSC (写真左) では神経細胞様の形態変化に伴い細胞の増殖がほぼ停止している。一方、遺伝子導入をしていない BMSC (写真右) では形態変化はほとんど見られないまま細胞は増殖を続け confluent になっている。



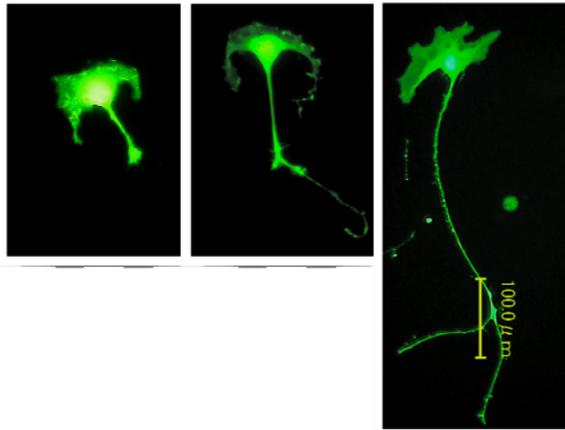
・ 分化誘導開始より 14 日後の NICD/PACAP を導入した BMSC (写真上) と MAP-2 免疫染色 (写真下)



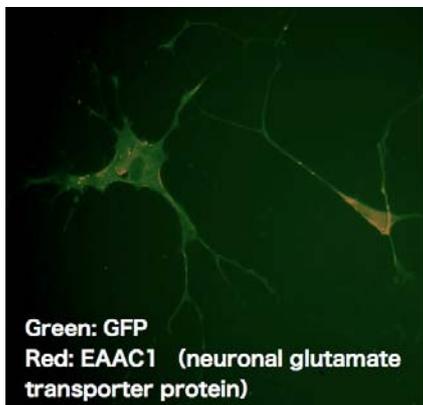
・ MAP-2 mRNA 発現の定性評価 (RT-PCR : 下図)



- 分化誘導開始後の経時的形態変化の様子 (Time lapse images)

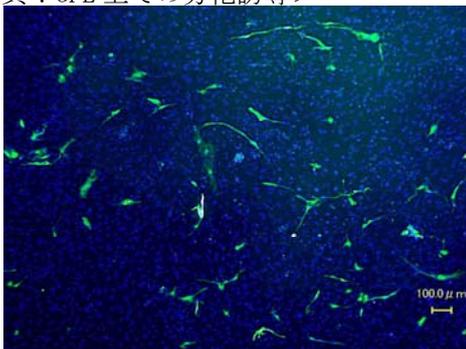


- EACC1 免疫染色陽性細胞 (写真)



- 錐体神経細胞 (ERCC1 陽性細胞) を効率良く誘導するための分化条件について、1) 低酸素負荷の有無、2) サイトカインカクテルの組み合わせ、3) 正常グリア細胞 feeder layer 使用の有無について検討を行った。その結果、ERCC1 陽性細胞の分化誘導率は 0.2%~6% の幅で違いが見られた。低酸素環境への暴露については短時間の負荷は分化誘導効率を上昇させる傾向が見られたが、長時間の負荷は逆にコントロールと比べ分化誘導効率が低下した。また glial feeder layer (GFL) の使用は GAD 陽性、TH 陽性の細胞への誘導率が上昇した。

<写真：GFL 上での分化誘導>



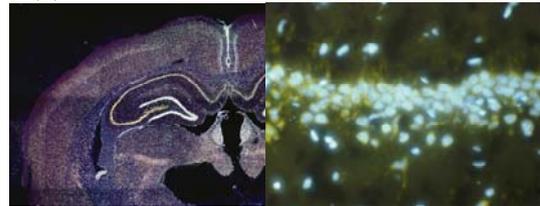
- 尚、同週齢のラットでも回収した骨髄間葉系細胞の BMSC-sphere 形成能には少なからぬ個体差が認められることが判明した。また低酸素負荷が神経細胞分化誘導に与える影響についても同一個体から得られた BMSC-sphere においては再現性があるものの個体差が認められた。

## (2) BMSC 由来神経細胞の脳梗塞モデルへの移植治療実験

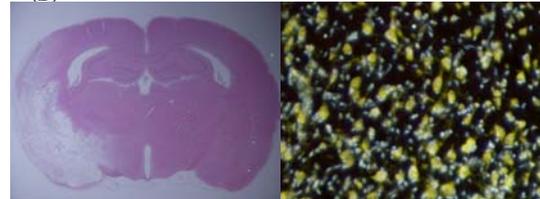
### ① 疾患モデル

- (A) 一過性全脳虚血モデルと (B) 中大脳動脈閉塞モデル

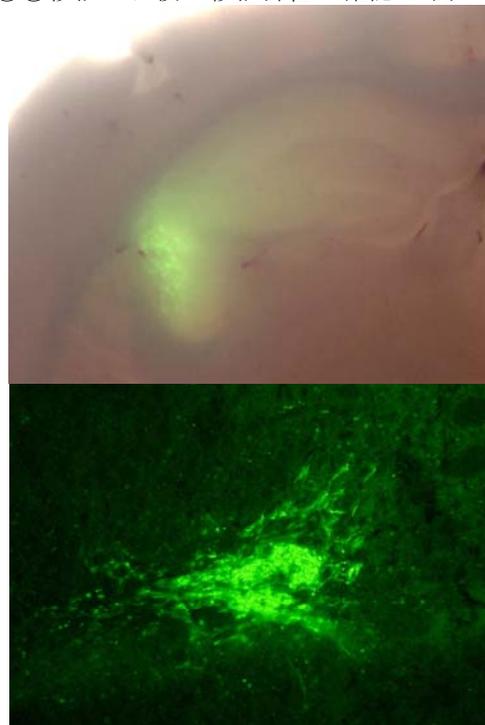
(A)



(B)



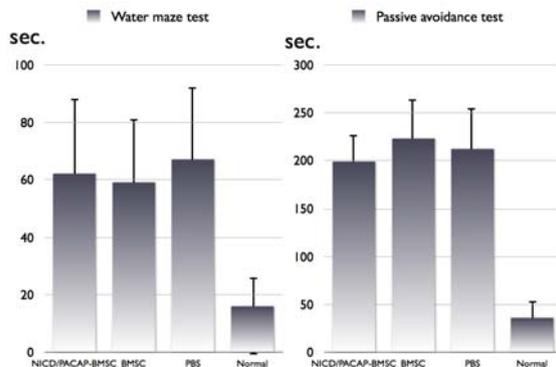
### ②③ 移植 7 日後の移植部位の確認：(A)



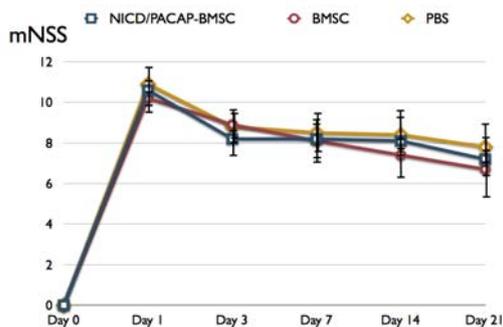
Green: 移植された BMSC の host 脳内における分布が GFP 陽性細胞として確認できる。

#### ④脳梗塞モデル動物の神経症状の評価

- ・ラット全脳虚血モデル(A)における虚血作成後1ヶ月後の神経学的機能評価(水迷路試験および受動回避試験)。

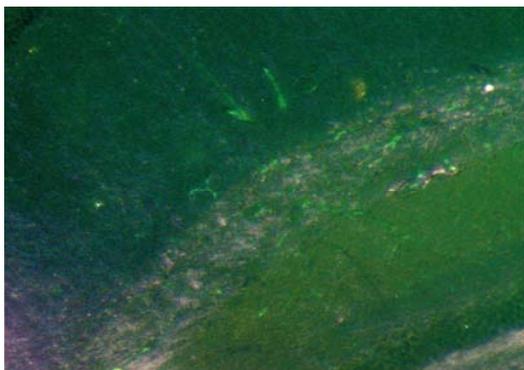


- ・ラット中大脳動脈閉塞モデル(B)における脳梗塞作成後3週間の神経症状の推移。(Modified neurological severity score: mNSS)



→ いずれの脳虚血モデルにおいても細胞移植治療群はPBS投与群として有意な神経症状の改善効果は見られなかった。

- ⑤ 移植3ヶ月後における移植細胞の生着。全脳虚血モデル(A): NICD/PACAP-BMSC投与群。(Green: GFP/Red: synaptophysin/bright field/Merge)



- ・移植後1ヶ月の時点で移植した細胞の2~3%程度が生着していることが確認され、その一部は軸索様の突起を伸ばしMAP-2およびsynaptophysinに対する免疫染色で陽性を示す細胞が確認された。

このことは移植した骨髄間葉系幹細胞がhostの神経ネットワークの一部に組み込まれた可能性を示唆する結果であると考えている。

#### <考察>

- ・脳梗塞モデルを用いた移植治療においてBMSC由来の移植細胞は残念ながら神経症状の改善に寄与しなかった。ただし今回のnegative dataは使用した細胞数が $5 \times 10^3$  cells/ratと少なかったことに起因する可能性もある。移植する細胞数を増やして今後in vivoでの治療効果を検討する必要があると考えている。
- ・また移植後の細胞生着率を向上させるための移植方法に関する工夫も必要であると思われた。

## 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)

[学会発表] (計2件)

野々口直助「骨髄間葉系幹細胞の神経細胞分化誘導における酸素濃度およびグルコース濃度が与える影響」2009年日本脳神経外科学会総会 東京

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

野々口 直助 (Nonoguchi Naosuke)  
大阪医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号: 70388263