

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390400

研究課題名（和文） ヒト骨髄幹細胞による神経再生療法の包括的戦略研究

研究課題名（英文） Comprehensive strategy for neuronal regenerative medicine with human bone marrow stromal cells (BMSC) transplantation

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：ヒト骨髄間質細胞(BMSC)移植による中枢神経の再生医療に関して研究を行い、以下の成果を得た。(1) 老齢ラット BMSC に G-CSF(顆粒球コロニー刺激因子)を添加すると、細胞増殖速度や治療効果が増強することを示した。(2) ヒト PL(血小板溶解物)を添加し、動物由来成分を排除した BMSC 培養を可能とした。(3) フィブリンや TGP ハイドロゲルはスキャフォールドとして有用であることを示した。(4) ナノ粒子を用いた光イメージングと、superparamagnetic iron oxide (SPIO)で細胞をラベリングした MRI により、ラット脳に移植された BMSC を画像化した。(5) 小動物用 PET/SPECT をもちいて、BMSC 移植によって神経機能がどのように改善したのかを画像化した。

研究成果の概要（英文）： In our present research, we 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) When the old rat BMSC were cultured with G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor), the cellular activity could be stimulated. (2) The addition of human platelet lysate (PL) was useful for the animal serum-free cell culture. (3) The scaffold with fibrin matrix or TGP hydrogel 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. (5) The nuclear medicine imaging was useful to evaluate the neural repair after cell transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

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：骨髄間質細胞、移植、脳梗塞、脊髄損傷、脳挫傷、分化、再生医療、機能回復

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経疾患には、脳梗塞、脊髄損傷、脳挫傷、脱髄・炎症性疾患など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、治療法としてもリハビリテーション以外にはほとんど有効な手段は存在しなかった。このため、幹細胞移植による中枢神経再生医療が期待されている。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

本研究の目的は、ヒトBMSCを使用した中枢神経再生の臨床応用を前提とした、トランスレーショナルな前臨床的研究を行うことである。

## 3. 研究の方法

(1) 効率的で安全なBMSC培養を達成するため、マウスや老齢ラットの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やラット脳挫傷モデルに移植し治療効果を検討した。

(2) 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や、病変部への遊走能、神経系細胞への分化傾向などを検討した。

(3) 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TGPハイドロゲル (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。中枢神経疾患にBMSCを移植する際、バイオマテリアルの使用がスキャフォールドとして有用か検討するため、フィブリンマトリックスを用い、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を損傷部に移植した。またTGPハイドロゲルを用いてラット脳梗塞モデルに対してBMSCを損傷部に移植した。いずれも細胞生着や遊走、分化傾向などを検討した。

(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 (QD800) でBMSCをラベリングし、ラット梗塞脳に移植した後、IVIS200という光イメージング器械を用いて経時的な細胞追跡を行った。また、Super-paramagnetic iron oxide (SPIO) 粒子を細胞標識に用いて、小動物用MRIによって細胞追跡をおこなった。また臨床用3T-MRIをもちいて、ファントム内に注入したSPIO標識細胞を撮像した。

(5) BMSC移植によって神経機能がどのように改善したのかを画像化するため、ラット脳梗塞/BMSC移植モデルに対しFDG-PETもしくはIomazenil-SPECTをもちいて、核医学的評価を行った。

## 4. 研究成果

(1) 老齢ラットの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、その細胞をラット脳挫傷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。

(2) 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) 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。フィブリンマトリックスをスキヤ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。この結果を受け、バイオマテリアルとしてTGPハイドロゲ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。またTGPハイドロゲ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、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。

(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、8週のあいだ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、小動物用MRIによりラット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。臨床用3T-MRIでも、ファントム内に注入したSPIOで標識されたBMSCは、明瞭に描出されることが示された。

(5) 小動物用PET/SPECTをもちいて、BMSC移植によって神経機能がどのように改善したのかを画像化した。ラット脳梗塞/BMSC移植モデルでは、移植後に脳梗塞周辺部で組織糖代謝の改善や、ベンゾジアゼピンレセプター機能の改善が生じることが明らかとなった。

#### 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)

- 1) Shichinohe H, Kuroda S, Kudo K, Ito M, Kawabori M, Miyamoto M, Nakanishi M, Terae S, Houkin K. Visualization of the superparamagnetic iron oxide (SPIO)-labeled bone marrow stromal cells using a 3.0-T MRI—a pilot study for clinical testing of neurotransplantation. *Transl. Stroke Res.* 2012 Mar; 3(1):99-106 (査読あり)
- 2) Osanai T, Kuroda S, Sugiyama T, Kawabori M, Ito M, Shichinohe H, Kuge Y, Houkin K, Tamaki N, Iwasaki Y. Therapeutic effects of intra-arterial delivery of bone marrow stromal cells in traumatic brain injury of rats--in vivo cell tracking study by near-infrared fluorescence imaging. *Neurosurgery.* 2012 Feb;70(2):435-44 (査読あり)
- 3) Chiba Y, Kuroda S, Osanai T, Shichinohe H, Houkin K, Iwasaki Y. Impact of ageing on biological features of bone marrow stromal cells (BMSC) in cell transplantation therapy for CNS disorders: Functional enhancement by granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). *Neuropathology.* 2011 Oct 10. [Epub ahead of print] (査読あり)
- 4) Kawabori M, Kuroda S, Sugiyama T, Ito

- M, Shichinohe H, Houkin K, Kuge Y, Tamaki N. Intracerebral, but not intravenous, transplantation of bone marrow stromal cells enhances functional recovery in rat cerebral infarct: An optical imaging study. *Neuropathology*. 2011 Oct 18. [Epub ahead of print] (査読あり)
- 5) Shichinohe H, Kuroda S, Sugiyama T, Ito M, Kawabori M, Nishio M, Takeda Y, Koike T, Houkin K. Biological features of human bone marrow stromal cells (hBMSC) cultured with animal protein-free medium—safety and efficacy of clinical use for neurotransplantation. *Transl. Stroke Res*. 2011 Sep; 2(3):307–315 (査読あり)
- 6) Masaki I, Kuroda S, Sugiyama T, Shichinohe H, Takeda Y, Nishio M, Koike T, Houkin K. Validity of Bone Marrow Stromal Cell Expansion by Animal Serum-Free Medium for Cell Transplantation Therapy of Cerebral Infarct in Rats—A Serial MRI Study *Transl. Stroke Res*. 2011 Sep; 2(3):294–306 (査読あり)
- 7) 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; 68: 1733–1742 (査読あり)
- 8) 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; 68: 1036–1047 (査読あり)
- 9) 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 (査読あり)
- 10) 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 (査読あり)
- 11) 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 (査読あり)
- 12) 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 (査読あり)
- 13) 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 (査読あり)
- 14) 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 (査読あり)
- 15) 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 (査読あり)
- 16) 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 (査読あり)
- 17) 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 (査読あり)
- 18) 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 (査読あり)
- 19) 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 (査読あり)
- [学会発表] (計 45 件)
- 1) Shichinohe H, Steps to the Clinical Testing of Cell Transplantation for Stroke - Bone Marrow Stromal Cell Culture with Animal Protein-free Medium and Bio-imaging Using Clinical 3.0-Tesla MR. 国際脳卒中会議 2012、2012 年 2 月 1 日、ニューオーリンズ、USA
- 2) 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、USA
- 3) 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
- 4) 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、岩手県民会館、盛岡
- 5) 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、USA

[その他]

ホームページ等

<http://www.neurosurgery-hokudai.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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

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

### (3) 連携研究者

なし