

## 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 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791342

研究課題名（和文） 脊髄損傷に対する自己嗅粘膜由来多種細胞移植の検討

研究課題名（英文） Transplantation of multiple type of the cells derived from olfactory mucosa for the recovery of spinal cord injury

## 研究代表者

石原 正浩（ISHIHARA MASAHIRO）

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：00533803

研究成果の概要（和文）：嗅粘膜由来は神経幹細胞および嗅神経鞘細胞を含んだ細胞である。この細胞腫はどちらも神経再生に有用であることが知られている。この嗅粘膜由来細胞を 3 次元軸索伸長評価系で評価すると有意に神経軸索の伸長を認めた。これら軸索伸長の原因として、嗅粘膜由来細胞が NT-3 という神経栄養因子を分泌することを確認し、抗神経栄養因子抗体カクテルを投与すると、効果が減弱することを認めた。また、軸索の伸長は嗅神経鞘細胞神経鞘細胞表面を伸展することを突き止めた。また、これら嗅粘膜由来細胞に約 14%の神経細胞を含有することからこの細胞による新たな神経軸索ネットワーク構築の可能性も示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The olfactory mucosal cells (OMCs) contain neural progenitor cells (NPCs) and olfactory ensheathing cells (OECs), both of which have been reported to be effective in neuronal and axonal regeneration. We measured neurotrophins production of OMCs and revealed OMCs mainly produced NT-3 in this system. Because anti-neurotrophin antibody cocktail drastically reduced axon-promoting effects of the OMCs, NT-3 production is the key factor of axon-promoting effects of OMCs. Extending axons from cortex were mainly observed in OECs. Another possibility is that NPC in the OMCs matured to neurons. Neural cells constituted 14% of OMCs. We are now examining to identify the interaction between neurons from cortex and from OMCs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：ライフサイエンス(共通基礎研究)

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：神経再生、脊髄損傷、神経前駆細胞、嗅神経鞘細胞

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は障害者本人のQOLが大きく損なわれるのみならず、社会的負担も多大であり、毎年約5,000人の新規重症患者が発生することから、脊髄損傷後の有効な神経再生治療が求められている。近年、脊髄損傷に対してさまざまな細胞による神経再生が報告されているが、単細胞移植では効果が限定的である。一方、多種細胞移植の臨床応用に関しては、発ガン性や細胞採取における侵襲性をはじめとして、技術面・倫理面で克服すべき諸問題がある。そこで、多種細胞移植による相乗効果と自己由来による安全性を同時に満たす移植法として、自己嗅粘膜由来の嗅神経鞘細胞・神経前駆細胞など複数細胞種移植による神経機能改善の可能性を明らかにするための実験を行った。

## 2. 研究の目的

本研究は脊髄損傷後の有効な神経再生治療をめざすもので、多種細胞移植による相乗効果と自己由来による安全性を同時に満たす移植法として、自己嗅粘膜由来の嗅神経鞘細胞・神経前駆細胞など複数細胞種移植による神経機能改善の可能性を3次元ゲル培養系を用いて明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 三次元共培養系の作成

成体ラット嗅粘膜より細胞分画を単離し、マトリゲルに播種して、cell culture insert上に3次元培養系を作製した。コントロールとして、呼吸粘膜(respiratory mucosa:RM)

由来細胞を播種したマトリゲルを用いた。3日間培養したマトリゲルに、新生ラット由来の大脳皮質スライス(厚さ400 $\mu$ m)を接触させ、共培養系とした。大脳皮質からマトリゲル中に伸長してくる軸索の長さと本数を培養7日目に計測した。軸索は抗neurofilament抗体で染色した。

### (2) 細胞種の同定

免疫組織化学法により、OM由来の各種細胞を同定した。p75 and/or GFAP陽性細胞を嗅神経鞘細胞(OEC)、Tuj1陽性細胞を神経細胞、CD90陽性細胞をfibroblast、CK14陽性細胞をhorizontal basal cell、CK18陽性細胞をsustentacular cellと判定した。

### (3) 神経栄養因子の定量

培養液中に遊離される神経栄養因子(NGF, BDNF, NT4/5, NT-3, GDNF, HGF, CNTF)はELISA法により定量した。

## 4. 研究成果

### (1) OM由来細胞三次元ゲルの細胞種

OECはグリア系とSchwann細胞の両方の性質を持つと報告されており、①p75陽性、②GFAP陽性、③p75およびGFAP共陽性の3種のフラクションから成る(図1)。マトリゲル中の細胞を免疫組織化学的に同定した結果、p75陽性細胞が約55%、GFAP陽性細胞が約56%であり、このうち45%が共陽性であった(図2)。このことからマトリゲル中の細胞の約65%がOECと判定された。

一方、RM由来細胞ではOECは3%以下であり、CD90陽性のfibroblastが約39%、60%が判別不能の細胞であった。

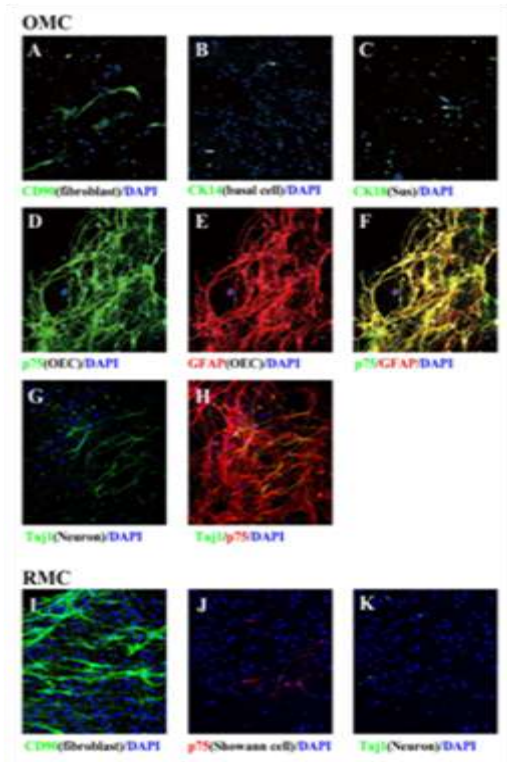


図1. OM由来細胞とRM由来細胞の免疫染色像

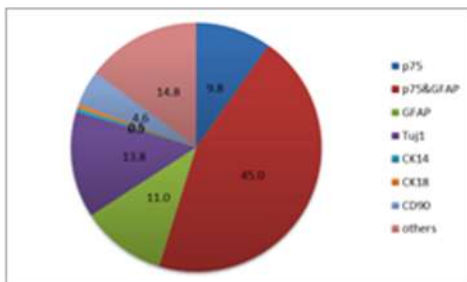


図2. OMCの細胞組成

(2) 大脳皮質スライスからの軸索伸長

OM 由来細胞を含んだマトリゲルに接してラット大脳皮質スライスを共培養すると、ゲル中に軸索が伸長した(図3)。OM 細胞中に伸長してくる軸索は、RM 由来細胞におけるそれより有意に長く、本数も増加していた(図4)。

(3) 共培養中に産生・遊離される因子

共培養中の上清には、神経栄養因子 NT-3, HGF, GDNF が遊離された(図5)。一方 BDNF, NT-4/5, NGF, CNTF はコントロールと有意差がなかった。NT-3 は単独でも軸索伸長を促すことが認められた。一方、嗅神経鞘細胞はゲ

ル内でシュワン細胞様形態をとり、軸索と接触して伸長していることが確認された。

以上から、嗅粘膜由来細胞は可溶性の神経栄養因子と細胞接着の両面から軸索伸長を促進することが示された。

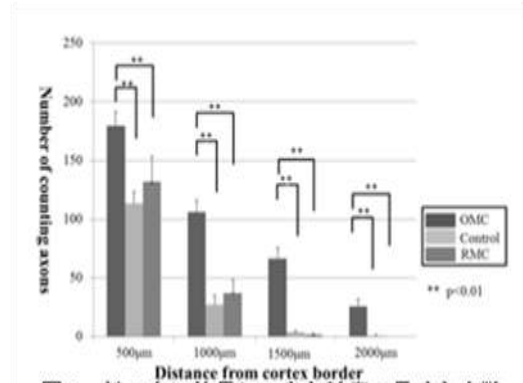


図4. ゲル中に伸長してきた軸索の長さ和本数

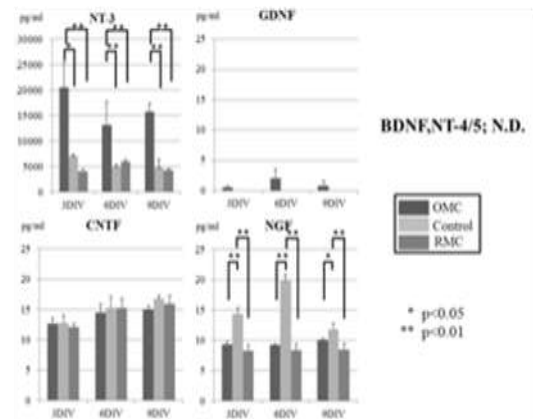


図5. 培養液中に遊離された神経栄養因子

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4件)

- Ohnishi Y, Iwatsuki K, Shinzawa K, Nakai Y, Ishihara M, Yoshimine T. Disuse muscle atrophy exacerbates motor neuronal degeneration caudal to the site of spinal cord injury. *Neuroreport*, 23, 157-161, 2012, 査読有

2) M. Ishihara et al.

A new three-dimensional axonal outgrowth assay for central nervous system regeneration, *Journal of Neuroscience Methods*, 198, 181-186, 2011, 査読有

3) Iwatsuki K, Yoshimine T, Umegaki M, Yoshimura K, Ohnishi Y, Ishihara M, Moriwaki T. Percutaneous Diode Laser Irradiation for Lumbar Discogenic Pain: A Clinical Study. *Photomedicine and Laser Surgery*, 29, 459-462, 2011, 査読有

4) Yu-ichiro Ohnishi, Koichi Iwatsuki, Eiichi Morii, Maki Kobayashi, Yumiko Hori, Takashi Moriwaki, Masahiro Ishihara, Kazunori Yoshimura, Masao Umegaki and Toshiki Yoshimine. Histopathological Study of Spinal Meningioma Originating from Arachnoid Villi: A Case Report. *Brain Tumor Pathol.* 28, 77-81, 2011, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① M. Ishihara, Olfactory mucosal cells promote axonal regeneration in newly three-dimensional assay. *Neuroscience* 2011, SfN's 41st annual meeting: November 14<sup>th</sup>, 2011, Washington D.C.(USA)

② 石原正浩 嗅粘膜由来細胞の持つ神経軸索再生効果についての検討~ in vitro 3次元培養系を用いて~第 69 回脳神経外科学会総会 2011 年 10 月 27 日、マリンメッセ福岡

③ 石原正浩 嗅粘膜由来細胞の神経栄養因子分泌能およびその形態変化についての検

討、第 70 回脳神経外科学会総会 2011 年 10 月 12 日、パシフィコ横浜

④ 石原正浩 初代嗅粘膜由来細胞の神経栄養因子分泌能および形態変化についての検討、第 26 回脊髄外科学会 2011 年 6 月 10 日、沼津市民文化センター

⑤ M. Ishihara. Regeneration of cortical axons into the three-dimensional gel containing olfactory cells. *International Society for Stem Cell Research 8<sup>th</sup> annual meeting 16<sup>th</sup> Jun 2010, San Francisco (USA)*

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石原 正浩 (ISHIHARA MASAHIRO)  
大阪大学・医学系研究科・特任研究員  
研究者番号：00533803