

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：17102
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790996
 研究課題名（和文） 間葉系細胞から分化・誘導した脳移行性シュワン細胞による中枢神経脱髄性疾患の治療
 研究課題名（英文） Treatment for central nervous system demyelinating disorder using mesenchymal cell-derived Schwann cells
 研究代表者
 松瀬 大（MATSUSE DAI）
 九州大学・医学研究院・助教
 研究者番号：70596395

研究成果の概要（和文）：

まず、DA ラットを用いて慢性の実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルを作成。DA ラットの骨髄間葉系細胞(MSCs)から種々の栄養因子を加えることで、シュワン細胞 (BM-SCs) を誘導した。EAE モデル作成後に、BM-SCs、MSCs、もしくは PBS(vehicle)を動物に髄注。移植後、clinical score、体重は他の群と比較し、BM-SC 群に改善を認めた。誘導細胞は PSA-NCAM の発現が誘導前より減少していたが、生着は良好であった。本方法は多発性硬化症などの中枢性脱髄疾患に対し、画期的な治療法となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

At first, we developed chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model rat from DA rats. We also induced to differentiate Schwann cells (BM-SCs) from bone marrow-derived mesenchymal cells (MSCs) of DA rats by adding several trophic factors. After developing EAE, BM-SCs, MSCs, or PBS (vehicle) were injected intrathecally. In BM-SC-transplanted group, clinical score and body weight recovered compared with the other 2 groups. Although the expression of PSA-NCAM was decreased in BM-SCs, the engraftment of these cells was successful. This treatment can be a breakthrough therapy for central nervous system demyelinating disorder such as multiple sclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：細胞移植治療、間葉系細胞、シュワン細胞、中枢性脱髄疾患

1. 研究開始当初の背景

中枢神経は従来軸索再生能力がないといわれ、そのためさまざまな中枢神経疾患において、有効な治療方法に乏しく、長期にわたって後遺障害を残す原因となっている。一方、シュワン細胞は末梢神経のグリア細胞であり、軸索をミエリン化し、跳躍伝導などの神経機能に大きな役割を果たしている。末梢神経系が損傷され軸索がミエリンを喪失すると、シュワン細胞は活性化・増殖し、様々な

成長因子やサイトカインを放出し、軸索再生に適した微小環境を作る。シュワン細胞はまた、それ自身が機能的回復に必要なミエリンを再形成し、末梢神経再生に重要な役割を果たす。さらに、シュワン細胞を移植した場合、末梢神経障害だけでなく、通常十分に再生しない脊髄損傷などの中枢神経障害においても、軸索の再生をサポートすることが最近知られるようになった。事実、中枢神経の脱髄性疾患である多発性硬化症の剖検

例では、末梢からシュワン細胞が脊髄内に侵入し軸索を再髄鞘化している像が報告されている。これらの理由から、シュワン細胞は末梢神経のみならず中枢神経においても軸索再生と神経機能回復に大きな役割を担うと期待されている。

しかし、シュワン細胞を神経疾患の治療に実用化する際に、末梢神経由来のシュワン細胞を使用する場合は、シュワン細胞を得て培養するために他の健康な末梢神経を切除せざるを得ない。さらに、適切な時間の中で治療に十分な量のシュワン細胞を培養、増殖させることは技術的に困難である。したがって、末梢神経に代わって、シュワン細胞の機能を持った細胞を十分量容易に得ることができる細胞源が渴望されている。骨髄、臍帯等に存在する間葉系細胞は、他のタイプの細胞に分化する能力を持ち、培養も容易で増殖能も高い。細胞バンクも利用可能であり、腫瘍化の報告もないことから、細胞移植治療における細胞源としての実用化が期待されている。骨髄間葉系細胞は、自家移植への応用が可能な点で特に有用性が高い。申請者らは最近、ヒト臍帯間葉系細胞からシュワン細胞を誘導することに成功した。それを末梢神経障害部へ移植することで、移植細胞自身が再髄鞘化し軸索再生を促進することで神経機能回復を果たすことを明らかにした。同様にヒト、ラット、サルの骨髄間葉系細胞からもシュワン細胞を誘導し、移植により末梢神経障害の機能回復に大きく寄与することも報告している。従って、これらの方法を用いて間葉系細胞から分化誘導したシュワン細胞を活用することで、健康な末梢神経を損傷することなく有効な細胞移植治療が可能となる。

本研究では、間葉系細胞由来のシュワン細胞を用いた細胞移植治療の次の治療対象として、中枢神経疾患の中でも、脱髄疾患である多発性硬化症に注目した。多発性硬化症は再発寛解を繰り返しながら障害が蓄積していく疾患で、現在のところ急性期はステロイドや血漿交換、慢性期にはインターフェロンやフィンゴリモド、免疫抑制剤などが使用されるが、未だ効果としては不十分な部分が多い。多発性硬化症に対し、間葉系細胞を用い、そこからシュワン細胞を誘導して病巣へ移植するという細胞移植治療法を確立し、多発性硬化症に対する新たな、有用な治療システムを作り上げることを考えた。

2. 研究の目的

中枢性脱髄疾患の多発性硬化症は自己免疫疾患の一つである。発症当初は再発寛解の経過をとることが多いが、罹病期間が長くなると徐々に慢性に進行するようになるという、変性疾患的な側面も持つ。そのような経過となった場合、有効な治療法に乏しいのが

現状である。本疾患の新たな治療法の一つとして細胞移植治療が考えられる。移植細胞としては失われた細胞と同様のものを移植することが考えられるが、多発性硬化症は中枢性のミエリンをターゲットにする疾患であるため、その場合移植細胞が移植後も多発性硬化症の病態に巻き込まれ、脱落する可能性がある。一方移植細胞としてシュワン細胞を使用することは、移植細胞が移植後も自己免疫の標的にはならず、治療効果を発揮し続けることが予想される。そこで本研究では、骨髄の間葉系細胞から、中枢神経移行性をもつシュワン細胞を誘導することを試みる。誘導した細胞を中枢神経脱髄モデル動物へ移植し、治療効果の高い細胞移植療法を樹立する。これにより、多発性硬化症での画期的な細胞移植療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) モデル動物の作製

まず、モデル動物として、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルラットの作成を試みた。複数系統のラットにおいて作成したが、MOGで免疫したDAラットが慢性モデルに近い経過をとり、本研究の動物モデルとして選択した。モデル作成方法としては、7~9週齢、雌のDAラットに対し免疫する。内容としては、

- a) 1 mg/ug の MOG 1-125
 - b) 4 ug/ul の Mycobacterium tuberculosis を含む complete Freund adjuvant
- a) と b) を 1:1 で混合し、ラットのテール基部に 50 μ l ずつ 2 か所に皮下注した。

(2) DA ラット骨髄間葉系細胞からのシュワン細胞の誘導

beta-mercaptoethanol (BME)、All-trans retinoic acid (ATRA) で処理した後、human basic fibroblast growth factor (FGF)、forskolin (FSK)、platelet-derived growth factor-AA (PDGF)、heregulin-beta1-EGF-domain (HRG) の trophic factor を加えることで誘導を試みた。細胞密度や誘導の日数、試薬の濃度は条件を変え、最適なものを選択した。

(3) 誘導したシュワン細胞の評価

誘導細胞は、S100 β 、PMP22、GFAP、P0、O4 等の発現を免疫細胞化学で調べることで、シュワン細胞への分化を確認した。また S100 β については、定量的 PCR にて、誘導の段階ごとの mRNA の発現も調べた。さらに、誘導細胞について、中枢神経系への移行に重要といわれている PSA-NCAM の発現を免疫細胞化学的に確認した。

(4) 細胞移植、行動評価

EAEモデル作成14日後に誘導細胞を髄注。PBS (vehicle) 群、骨髄間葉系細胞(MSCs)群、誘導細胞(BM-SCs)群に分けて移植を行った。髄注は、動物をイソフルレンで麻酔し、下部腰椎部分の背部を露出する。L5-6の椎間を穿刺し、細胞移植群については200万細胞を移植した。移植後1カ月評価を行い、clinical scoreによる行動評価と組織学的評価を行った。clinical scoreは下記のように評価した。

- 0 : no disease
- 0.5 : distal limp tail
- 1 : limp tail
- 2 : abnormal gait, hind limb weakness (shaking)
- 2.5 : one hindlimb paralyzed
- 3 : complete hindlimb paralysis
- 3.5 : ascending paralysis (able to move around)
- 4 : tetraplegia
- 5 : moribund (death)

4. 研究成果

8週齢のDAラット骨髄から間葉系細胞を採取し、3代継代培養。2.86 × 10³ cells/cm²の密度で細胞を撒き、BME (1 mmol/L) を含む無血清培地で24時間培養。その後 ATRA (35 ng/mL)、10%FBS を含む培地で72時間培養。最後に、10%FBS を含む培地へ FGF (10 ng/mL)、FSK (5 μmol/L)、PDGF (5 ng/mL)、HRG (200 ng/mL) の栄養因子を加え、5-7日培養することで、シュワン細胞の誘導に成功した。誘導した細胞は S100β、PMP22、GFAP などのシュワン細胞のマーカーを発現していた (図1)。また、S100βについては、誘導の最終段階で、FGF、FSK、PDGF、HRG といった4つの trophic factors (TF) を加えることで、大きく発現を上昇させることが分かった (図2)。さらに、細胞の中核移行性に必要といわれている PSA-NCAM の発現を調べたところ、誘導前の間葉系細胞は発現が軽度見られたものの、誘導後は発現が低下していることが免疫細胞化学にて確認された (図3)。EAEモデルは、脊髄に長大病変が認められ、PLP染色などで脱髄が確認された。移植後、clinical score、体重は PBS 群 (1 ± 0.82)、MSC 群 (0.83 ± 0.29) と比較し、BM-SCs (0.5 ± 0.5) 群に改善を認めたと、統計学的に優位差は得られなかった。誘導細胞は PSA-NCAM の発現が誘導前より減少していたが、生着は良好であった (図4)。

本研究は、シュワン細胞の、中枢軸索再生作用に着目した細胞移植治療開発である。シュワン細胞は末梢性ミエリンを産生するため、中枢神経脱髄性疾患の自己免疫の標的にはならない。シュワン細胞を間葉系細胞から誘導する点で、多発性硬化症に対するシュワン細胞の移植は、画期的な治療法となる可能

性がある。本研究の結果を踏まえ、今後より長期での多数例の評価、他の方法での脱髄モデルを利用した移植実験等につなげ、より臨床応用に近付けて行くことが望まれる。

図1 DAラット骨髄間葉系細胞(MSCs)から誘導したシュワン細胞(BM-SCs)におけるマーカー発現

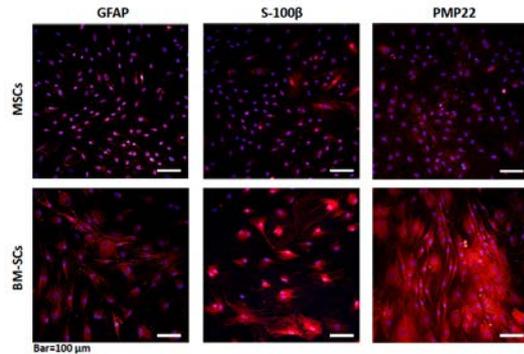


図2 BM-SCs誘導段階ごとのQ-PCRでの、S100βのmRNA発現

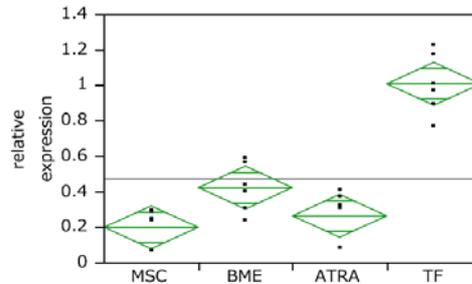


図3 DAラット骨髄間葉系細胞(MSCs)から誘導したシュワン細胞(BM-SCs)の、PSA-NCAMの発現の変化

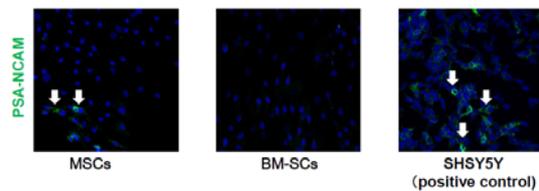
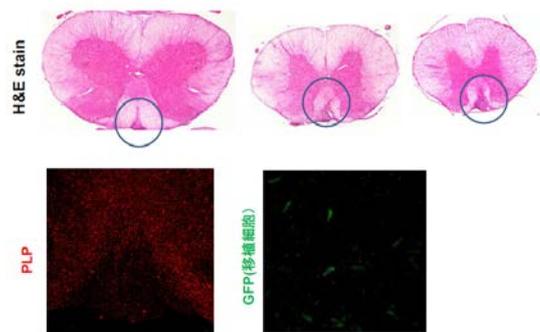


図4 EAEモデルは脊髄に長大病変を作成しており、髄注した移植細胞は病変部位に浸潤していた。



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 6 件)

(1) Kawamura N, Yamasaki R, Yonekawa T, Matsushita T, Kusunoki S, Nagayama S, Fukuda Y, Ogata H, Matsuse D, Murai H, Kira J. Anti-neurofascin antibody in patients with combined central and peripheral demyelination. *Neurology (In Press)*. (査読あり)

(2) Matsushita T, Tateishi T, Isobe N, Yonekawa T, Yamasaki R, Matsuse D, Murai H, Kira J. Genetic and infectious profiles of Japanese multiple sclerosis patients. *PLoS One (In Press)*. (査読あり)
DOI:10.1371/journal.pone.0061835
PONE-D-13-02996 [pii]

(3) Aizawa-Kohama M, Endo T, Kitada M, Wakao S, Sumiyoshi A, Matsuse D, Kuroda Y, Morita T, Jorge J. Riera, Kawashima R, Tominaga T, Dezawa M. Transplantation of bone marrow stromal cells-derived neural precursor cells ameliorates deficits in a rat model of complete spinal cord transection. *Cell Transplant (In Press)*. (査読あり)
DOI: ct0669aizawakohama [pii]
10.3727/096368912X658791

(4) Hayashi T, Wakao S, Kitada M, Ose T, Watabe H, Kuroda Y, Mitsunaga K, Matsuse D, Shigemoto T, Ito A, Ikeda H, Fukuyama H, Onoe H, Tabata Y, Dezawa M. Autologous mesenchymal stem cell-derived dopaminergic neurons function in parkinsonian macaques. *J Clin Invest* 123:272-284;2013. (査読あり)
DOI: 62516 [pii]
10.1172/JCI62516

(5) Matsuse D, Kitada M, Ogura F, Wakao S, Kohama M, Kira J, Tabata Y, Dezawa M. Combined transplantation of bone marrow stromal cell-derived neural progenitor cells with a collagen sponge and basic fibroblast growth factor releasing microspheres enhances recovery after cerebral ischemia in rats. *Tissue Eng Part A* 17:1993-2004; 2011. (査読あり)
DOI: 10.1089/ten.TEA.2010.0585

(6) Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, Shigemoto T, Matsuse D, Akashi H, Tanimura Y, Tsuchiyama K, Kikuchi T, Goda M, Nakahata T, Fujiyoshi Y, Dezawa M. Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in

human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:9875-9880;2011. (査読あり)
DOI: 1100816108 [pii]
10.1073/pnas.1100816108

[学会発表] (計 4 件)

(1) 松瀬大 「骨髄間葉系細胞からの神経前駆細胞誘導と脳梗塞モデルへの生体材料を用いた有効な移植システムの検討」 第 53 回日本神経学会学術大会 2012 年 5 月 22-25 日 東京

(2) 松瀬大 「骨髄間葉系細胞からの神経前駆細胞誘導と脳梗塞モデルへの有効な移植システムの検討」 第 5 回 Kyushu CVD Conference 2011 年 11 月 19 日 福岡

(3) 松瀬大 「ヒト臍帯細胞からのシュワン細胞の誘導と末梢神経再生への応用」 第 22 回日本末梢神経学会学術集会 2011 年 9 月 2-3 日 沖縄

(4) 「ヒト臍帯細胞からのシュワン細胞の誘導と神経再生への応用」 第 52 回日本神経学会学術大会 2011 年 5 月 18-20 日 名古屋

[図書] (計 2 件)

1) 松瀬大, 吉良潤一. 多発性硬化症. 免疫性神経疾患ハンドブック. 南江堂. (印刷中)

2) 松瀬大, 吉良潤一. 多発性硬化症. 日本医師会雑誌「神経・精神疾患診療マニュアル」. 南山堂. (印刷中)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松瀬 大 (MATSUSE DAI)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：70596395

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

緒方 英紀 (OGATA HIDENORI)

九州大学・医学系学府・大学院生