

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670423

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞から誘導した脳移行性シュワン細胞による進行型多発性硬化症の治療法開発

研究課題名(英文) Developing a cell transplantation therapy for chronic multiple sclerosis by using Schwann cells induced from mesenchymal stem cells

研究代表者

吉良 潤一(Kira, Jun-ichi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40183305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、進行型多発性硬化症に対しての新たな細胞移植治療の確立を目指したものである。ラット骨髄間葉系幹細胞からサイトカイン刺激に組み合わせによりシュワン細胞を誘導。脱髄モデルとしては、自己免疫性脳脊髄炎モデル、Cuprizone摂取による脱髄ラット、Ethidium bromide(EB)局注による脊髄脱髄ラットを作成。誘導シュワン細胞の移植実験を行った。しかし結果的には全体としては明らかな機能改善に至らなかった。モデル動物の症状の不安定さが原因の一つとして考えられたが、移植細胞の生着能力の低さが最大の原因と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to develop a novel cell transplantation therapy for chronic multiple sclerosis. Schwann cells were induced from rat bone marrow mesenchymal stem cells by adding several cytokines. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and toxin(Cuprizone or Ethidium bromide)-induced focal demyelinating model rat were prepared as chronic demyelinating animal models. Induced Schwann cells were transplanted into these models, but no significant therapeutic effect could be observed. The instability of symptom of animal models might be one of the reason. But the low rate of transplanted cell engraftment was thought to be the primary cause of this result.

研究分野：神経免疫学

キーワード：間葉系幹細胞 細胞移植 多発性硬化症 シュワン細胞 脱髄モデル

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症(multiple sclerosis, MS)は、中枢神経髄鞘を標的とした自己免疫疾患であり、末梢神経髄鞘は障害されない。再発寛解型 MS(relapsing remitting MS, RRMS)では、疾患修飾薬(disease-modifying drug, DMD)の開発が進み、再発率を下げるのが可能になった。しかし、慢性進行型 MS(chronic progressive MS, CPMS)に対しては有効な治療法がない。なかでも病初期から慢性進行性の経過を呈する一次性進行型 MS(primary progressive MS, PPMS)では、全く治療法がない。さらに RRMS で発症しても 10 年余で約半数は二次性進行型 MS(secondary progressive MS, SPMS)へ移行する。DMD も二次性進行型 MS にはほとんど効かない。また DMD で再発率を下げることで二次性進行期への移行を阻止できるかは全く不明である。したがって、MS のこれからの治療ターゲットは、再発よりも慢性進行の防止にある。慢性進行型 MS では T 細胞性炎症は軽減し、グリア炎症や再髄鞘化の障害、脱髄の持続による軸索障害が主体となっている。一方、MS の破壊性の脊髄病巣では、グリア限界膜の破綻に伴い末梢からシュワン細胞が侵入し、末梢性髄鞘で軸索を再髄鞘化している所見が観察される。したがって、シュワン細胞は中枢神経由来の軸索をも再髄鞘化する能力を有すると考えられる。

骨髄や臍帯に存在する間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells, MSCs)には優れた分化能があることが知られている。私たちは、ヒト臍帯の MSCs やヒト、ラット、サルの MSCs からシュワン細胞を誘導し、それを末梢神経損傷部位へ移植すると、移植細胞自身が再髄鞘化を行い、軸索再生を促し、神経機能を回復させることを明らかにした(Matsuse et al, J Neuropathol Exp Neurol, 2010)。この研究では誘導した細胞は、in vitro, in vivo においてもシュワン細胞のマーカーを発現し、シュワン細胞と同様の機能を有することが少なくとも末梢神経では確認された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、中枢の軸索も再生、再髄鞘化しうるシュワン細胞を MSCs から誘導し、それをを用いた細胞移植治療法を、MS、とくに現在治療法のない CPMS に対して開発することである。移植細胞は、ラットの骨髄間葉系細胞(BM-MSCs)や、ヒト臍帯の間葉系細胞(UC-MSCs)から誘導したシュワン細胞を用いる。また、CPMS の動物モデルとして、ラットを用いて中枢性の脱髄モデルを作成する。作成したモデル動物に対して細胞移植実験を行う。移植後組織学的、機能的評価を行い本移植方法について検証する。また移植細胞の中核移行能についても評価する。

これらをもとに、将来への CPMS 患者に

対する細胞移植治療法確立への基盤づくりを行う。

3. 研究の方法

(1) ラット骨髄間葉系細胞(BM-MSCs)・ヒト臍帯間葉系細胞(UC-MSCs)からシュワン細胞の誘導

Wistar Rat (8 週齢、♂) の骨髄から間葉系細胞(BM-MSCs)を採取し、3 代継代培養を行う。その後 beta-mercaptoethanol (BME)、続いて All-trans retinoic acid (ATRA) で処理した後に、human basic fibroblast growth factor (FGF)、forskolin (FSK)、platelet-derived growth factor-AA (PDGF)、heregulin-beta1-EGF-domain (HRG) の trophic factor のカクテルを加えることで、シュワン細胞(BM-SCs)の誘導を行った。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。

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。

移植に際しては、当初レンチウイルスによる緑色蛍光タンパク質(GFP)標識と、Hoechst による標識を当初試みていたが、GFP の標識率の低さと、Hoechst 標識の信頼性の問題が生じたため、GFP ラット(Wistar)を購入し、その大腿骨、脛骨から BM-MSCs を採取。それから誘導した BM-SCs を用い、移植実験を行った。

また、ヒト臍帯の Wharton's jelly から間葉系細胞(UC-MSCs)を採取。BM-MSCs と同様にシュワン細胞(UC-SCs)を誘導、評価を行った。

(2) 中枢神経系脱髄モデルラットの作成と移植実験

中枢神経系脱髄モデルラットの作成として、

- ① experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) ラット
- ② Cuprizone による脱髄ラット
- ③ Ethidium bromide (EB) による脱髄ラット

以上の 3 種類のモデルを作成し、移植を行い、生着や軸索再生能についての解析を試みた。なお、当初は①、次に②のモデルを利用した移植実験を予定していたが、後述する問題点が生じ、方法を変更しながら改善を試みたものの解決せず、最終的には③のモデルを、中枢神経系脱髄モデルとして採用した。また、①、②の実験の際はまだ GFP ラット入手前の段階であり、これらの移植実験に関しては、移植細胞をレンチウイルスによって GFP ラベリングを行い、さらに移植前に Hoechst にて

染色して移植していた。

①EAE ラット

モデル動物としては、より慢性に近い経過をとる DA Rat を選択。作成方法としては、7~9 週齢、雌を使用し、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 Freud 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 か所に皮下注射した。

EAE モデル作成 14 日後に、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、DA Rat 由来の BM-SCs を 2×10^6 cells/20 μ l PBS、髄腔内へ移植した。評価期間を移植 35 日後とし、しかし一部移植 7 日後に安楽死させ、病巣部への移植細胞の migration を確認した。

② Cuprizone による脱髄ラット

Wistar Rat に 0.6% の cuprizone を含んだ餌を 21 日齢から連日与えることで作成。63 日齢の時点で、Wistar Rat 由来の BM-SCs を、 1.0×10^5 cells/2 μ l PBS、脳梁の脱髄部位へ経頭蓋的に移植して評価した。105 日齢で安楽死させ、組織評価を行った。

③ EB による脱髄ラット

Wistar Rat (8 週齢、♂) に対し、イソフルレンで麻酔後、laminectomy を行い、脊髄後面を露出。Th10 レベルに 0.3 mg/ml の EB を 3 μ l 局注。モデル作成 7 日後に、EB 注入部位に GFP ラット (Wistar) 由来の BM-SCs を 2×10^5 /2 μ l PBS にて移植した。評価方法としては、本モデルは明らかな下肢麻痺などの機能低下を来しにくく、行動評価は困難であったため、組織学的な評価を行った。組織学的には、脱髄巣体積、移植部位周辺の NF 陽性軸索数、移植細胞の生存率を評価した。NF 陽性軸索数については、正常組織境界から 50 μ m 部位の NF 陽性軸索密度を測定し、コントロールとしての PBS 移植群 (n=6) と BM-SC 移植群 (n=6) で比較した。移植細胞が確認されれば、移植細胞の発現しているマーカを確認し、移植細胞がシュワン細胞の性質を維持できているか、host の軸索の再髄鞘化を行っているか等について評価する。

4. 研究成果

(1) ラット骨髄・ヒト臍帯間葉系細胞からシュワン細胞の誘導

8 週齢の Wistar Rat 骨髄から間葉系細胞を採取し、3 代継代培養。 2.86×10^3 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 μ mol/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 S100 β 、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、S100 β 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)。

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

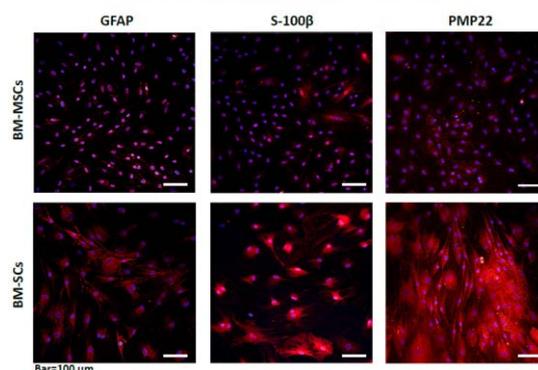


図2 BM-SCs誘導段階ごとのQ-PCRでの、S100βのmRNA発現

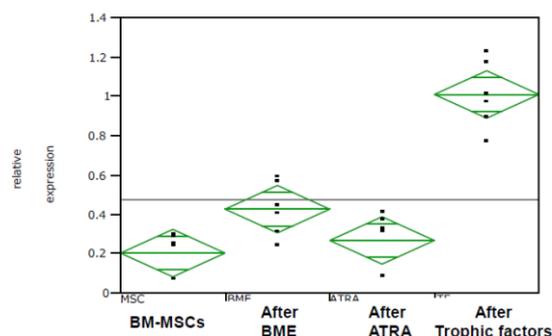
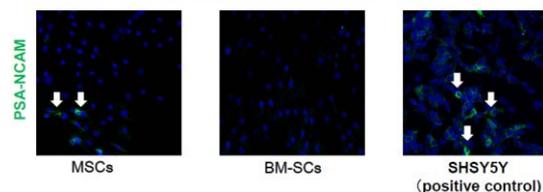
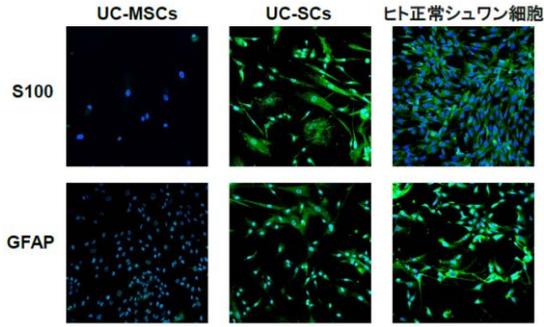


図3 DAラット骨髄間葉系細胞(MSCs)から誘導したシュワン細胞(BM-SCs)の、PSA-NCAMの発現の変化



ヒト臍帯からも同様にシュワン細胞の誘導を確認した。提供を受けた臍帯から間葉系細胞を採取し、3 代継代培養。 3.81×10^3 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 μ mol/L)、PDGF (5 ng/mL)、HRG (200 ng/mL) の栄養因子を加え、3-5 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 S100 β や GFAP 等を発現していた (図 4)。

図4 ヒト臍帯間葉系細胞(UC-MSCs)から誘導したシュワン細胞(UC-SCs)におけるマーカー発現

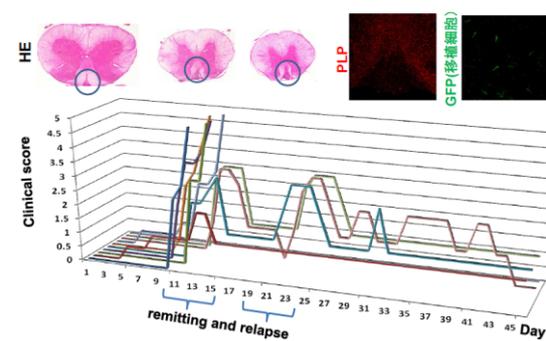


(2) 中枢神経系脱髄モデルラットの作成と移植実験

① EAE ラット

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。移植細胞も、脊髄へ部分的に生着した像は確認できたものの、長大病変であり、また細胞移植に関わらず臨床症状の変動があり、そのために clinical score も変動の個体差が大きく、定量的な移植治療効果の判定が困難であった(図5)。したがって、本治療方法を検証するモデルとしては適切ではないと判断した。

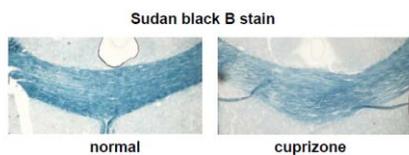
図5 EAEモデルは脊髄に長大病変を作成しており、髄注した移植細胞は病変部位にいくらか浸潤していたが、組織学的、機能的な定量的評価が困難であった。



② Cuprizone による脱髄ラット

cuprizone モデルは、脳梁部位を中心に脱髄病巣ができ(図6)、またコントロール群と体重差も認めた。しかしこのモデルは神経学的症状を比較評価することがほぼ不可能で、また脱髄層が小さいために、正確な移植細胞の注入や、定量的な組織学的評価が困難であり、本実験系のモデルとして不適切と判断した。

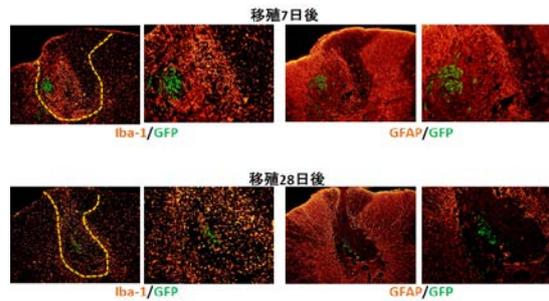
図6 Cuprizoneモデルは脳梁を中心に脱髄病変を作成していたが、病変部位が微小で、技術的な面も含め、組織学的な定量的評価が困難であった。



③ EB による脱髄ラット

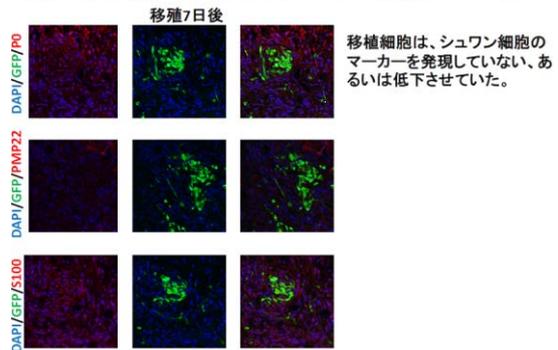
本モデルに関しては、EB 注入7日後に、注入部位周辺に fluoromyelin の染色性が低下している部位を認め、比較的広範に脱髄巣ができていたことが確認された。移植部位付近では、ミクログリア (Iba1 陽性) の浸潤、反応性. アストロサイト (GFAP 陽性) の増加といったグリオシスの所見が観察された(図7)。移植細胞は、移植7日後には生着しているように見えるものの、28日後までには GFP 陽性細胞が確認できない状態になっており、移植細胞はグリオシスを起こして排除されていると考えられた(図7)。また、移植7日後に移植細胞を染色したところ、P0、PM22、S100 といったシュワン細胞のマーカーを発現していない、あるいは低下させていた(図8)。また、移植部位付近の NF 陽性軸索も PBS 群 $43.3 \pm 9.9/10^{-8} \text{mm}^2$ に対し、BM-SC 群 $48.7 \pm 4.6/10^{-8} \text{mm}^2$ ($p=0.26$) と、明らかな増加傾向を認めなかった(図9)。

図7 EBを用いた脱髄モデルへのBM-SCs移植



移植細胞は、移植7日後には生着しているように見えるものの、28日後までにはグリオシスを起こして排除されている

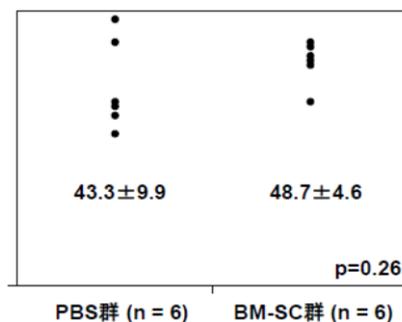
図8 移植後BM-SCsのシュワン細胞のマーカー



移植細胞は、シュワン細胞のマーカーを発現していない、あるいは低下させていた。

図9 移植部位周辺のNF陽性軸索密度

($/10^{-8} \text{mm}^2$)



本研究での問題点は、移植細胞の生着能が非常に低かったことと、移植細胞が移植後にシュワン細胞の性質を失っている可能性が示唆されたことである。科学研究費助成事業としての期間は終了したが、引き続きこれらの問題点の解明、解決方法について検討を続けていきたい。

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 7 件)

① Ogata H, Matsuse D, Yamasaki R, Kawamura N, Matsushita T, Yonekawa T, Hirotani M, Murai H, Kira J. A nationwide survey of combined central and peripheral demyelination in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015; DOI: 10.1136/jnnp-2014-309831.

② Wakao S, Matsuse D, Dezawa M. Mesenchymal Stem Cells as a Source of Schwann Cells: Their Anticipated Use in Peripheral Nerve Regeneration. *Cells, tissues, organs*. 2015; DOI: 10.1159/000368188.

③ Matsushita T, Tateishi T, Isobe N, Yonekawa T, Yamasaki R, Matsuse D, Murai H, Kira J. Characteristic cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles in neuromyelitis optica, relapsing remitting or primary progressive multiple sclerosis. *PLoS One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0061835 PONE-D-13-02996 [pii]

④ 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* 2013;81:714-722.

[学会発表] (計 11 件)

① 緒方英紀、松瀬大、松下拓也、河村信利、山崎亮、楠進、吉良潤一. 中枢・末梢連合脱髄症 (CCPD) における全国臨床疫学調査成績と抗 neurofascin (NF) 抗体陽性率の検討. 第 111 回日本内科学会講演会 2014 年 4 月 11 日-13 日 東京

② Ogata H, Yamasaki R, Matsuse D, Kawamura N, Yonekawa T, Matsushita T, Imamura S, Kusunoki S, Nagayama S, Fukuda Y, Murai H, Kira J. Combined Central and Peripheral Demyelination: Diagnostic Value of Anti-Neurofascin Antibody and the First Nationwide Survey In Japan. the 6th Pan-Asian Committee for Treatment and Research in Multiple

Sclerosis 2013 年 11 月 8 日 Kyoto

③ 真崎勝久、鈴木諭、松下拓也、松岡健、鈴木万幾子、末長敏彦、岩城徹、吉良潤一. 脱髄性疾患における Connexin 43 脱落は病態の急速な進行および distal oligodendroglipathy 型脱髄と関連する. 第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会 2014 年 6 月 6 日 東京

④ Masaki K, Suzuki SO, Watanabe M, Sato S, Matsushita T, Suzuki M, Iwaki T, Kira J. Neuropathological Study of Glucose and Monocarboxylate Transporters in Multiple Sclerosis. 2014 Joint ACTRIMS-ECTRIMS Meeting. 2014 年 9 月 10 日-13 日 Boston, USA

[図書] (計 7 件)

① 松瀬大, 緒方英紀, 吉良潤一. 免疫性神経疾患 III. 中枢・末梢連合脱髄症 3. 中枢・末梢連合脱髄症の病態・診断・治療. 日本臨牀, (印刷中).

② 松瀬大, 吉良潤一. 診療ガイドライン UP-TO-DATE2014-2015 中枢神経疾患 多発性硬化症・視神経脊髄炎. メディカルレビュー社, 2014 ; 524-529.

③ 吉良潤一. 多発性硬化症の疾患概念、病因、病態. 多発性硬化症と視神経脊髄炎. 基礎臨床研究の最新知見. 日本臨牀, 2014; 1884-1894.

④ 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, 2013;218-219.

⑤ 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, 2013;68-89.

[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

吉良 潤一 (KIRA Jun-ichi)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 4 0 1 8 3 3 0 5

(2) 研究分担者

松下 拓也 (MATSUSHITA Takuya)

九州大学・大学院医学研究院・准助教

研究者番号: 0 0 5 3 3 0 0 1

松瀬 大 (MATSUSE Dai)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号: 7 0 5 9 6 3 9 5

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

緒方 英紀 (OGATA Hidenori)

九州大学・大学院医学研究院・大学院生

藤田 篤史 (FUJITA Atsushi)

九州大学・大学院医学研究院・大学院生