

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 11 月 4 日現在

機関番号：34441

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870950

研究課題名(和文)脳脊髄液を介した中枢神経系の体系的な神経再生メカニズムの解明

研究課題名(英文)Systematic mechanisms for regeneration of central nervous system via the cerebrospinal fluid

研究代表者

本間 玲実 (HOMMA, Tamami)

藍野大学・再生医療研究所・研究員

研究者番号：30631220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：BMSCとの共培養で、CPECのNGF、VEGF、HGF、IGF-1、FGF-2のmRNAが増加したが、有意差なかった。

LPS加の培養液でのBMSCとの共培養では、IGF-1 FGF-2に明らかな増加が見られた。real-time PCRで、NGFはBMSCとの共培養で明らかに増加し、HGFはmono-layered BMSCとの共培養の時のみ増加した、VEGFは大きな変化はなかった。次に、タンパク質の発現量では、NGFは、共培養でそれぞれの単独培養の合算値より高い値を示し、共培養による影響が明らかであった。VEGFは、共培養による増加はなかった。

研究成果の概要(英文)：The expression of mRNAs of NGF, VEGF, HGF, IGF-1, and FGF-2 was up-regulated in CPECs under the co-culture with BMSCs, but, there was no significant difference. The co-culture with BMSCs in the medium containing LPS showed that mRNAs of IGF-1 and FGF-2 increased significantly. Next, the real-time PCR showed that the mRNA of NGF was up-regulated in the co-cultures with BMSCs, while that of HGF was increased only when co-cultured with mono-layered BMSCs. There was no change with VEGF. The protein expressions of NGF were up-regulated in individual cultures of BMSCs and CPECs in the LPS-containing medium. The co-culture showed that NGF of CPECs was up-regulated to the level higher than the total values of the individual cultures, indicating that NGF was enhanced by the co-culture. Expressions of VEGF remained at the same level as the total values of individual cultures of BMSCs and CPECs, meaning that there was no enhancement of VEGF production by the co-culture.

研究分野：医歯薬学 総合生物

キーワード：脈絡叢 骨髄間質細胞 神経再生 脊髄損傷

## 1. 研究開始当初の背景

(研究計画調書に則って記す。)

(1) 近年、幹細胞を治療に応用する再生医療への関心が高まっている。骨髄間質細胞 (BMSC) は骨髄中に存在する間葉系の細胞で、軟骨、脂肪、心筋、神経など様々な細胞に分化する能力を持っている。脊髄損傷に置いても BMSC 移植が有効な治療法として注目されており現在臨床試験も行われている。BMSC は IGF1, TGF などの栄養因子を分泌しており、BMSC に脳虚血時の脳の抽出物を与えることでこれらの因子も含め、様々な神経栄養因子の発現が増強されることが報告されている。故に、BMSC は損傷等の侵襲により、神経栄養因子の発現・分泌を増強させると考えられる。申請者のグループは、BMSC の損傷部位および脳室内移植が脊髄損傷に対して有効であることを明らかにした。申請者らはこの BMSC による神経修復作用は BMSC 由来の可溶性分子によること、及び BMSC を数回脳室内に移植することで急性期だけでなく、亜急性期や慢性期においても顕著な行動機能の改善および神経再生効果があることを見いだした。移植した BMSC は移植後短期間 (1-2 週) で消失するにも拘らず、BMSC 移植による神経修復効果は長く持続する。これらの結果より、申請者は BMSC による長期にわたる神経修復効果は、損傷部位に直接作用するだけでなく、仲介する細胞を活性化し、脳脊髄液 (CSF) を通して、中枢神経系全体に作用していると考えている。

CSF は側脳室、第 3 脳室、第 4 脳室の各脳室に存在する脈絡叢上皮細胞によって産生される。脈絡叢上皮細胞 (CPEC) には IGF, FGF, EGF 等の様々な神経栄養・促進因子が発現されることが知られている。近年の研究により、頭部外傷や脳血管障害における神経再生および機能改善には、神経栄養・成長因子の作用が密接に関与していることが報告されている。申請者のグループでは脈絡叢の脊髄損傷部位への移植は軸索再生を促進すること、虚血再環流による脳梗塞巣の進展が、培養 CPEC の脳脊髄液内投与によって抑制されることを示した。これらの所見から、CPEC は CSF 中へ分泌性因子を放出することにより中枢神経の成長・維持および保護・修復に深く関与すると考えられる。

申請者は CSF 内に移植された BMSC が宿主の CPEC の生物活性を増強させ、次ぎに CPEC における神経栄養・成長因子の合成・分泌が促されることで、CSF を介した中枢神経系の体系的な神経修復効果を誘導し、脊髄損傷に対する長期的な神経修復効果が得られるものとの仮説を立てた、つ

まり BMSC によって活性化される CPEC が機能分子を CSF に分泌し続けることで、長期的かつ体系的な神経組織の修復がおこなわれるという 2 段階メカニズムを新たな概念として考える。

本研究では、BMSC が CPEC にあたえる効果を遺伝子及び細胞レベルで検索することで中枢神経系の損傷に対する基本的な修復機構の本質を明らかにし、これにより、上位器官としての CPEC を介した中枢神経組織の体系的な修復機構の解明を目指す。

## 2. 研究の目的

(研究計画調書に則って記す。)

骨髄間質細胞の脳脊髄液内投与による脊髄損傷の機能回復は BMSC 由来の可溶性分子が関与すること、および BMSC 移植による神経修復・再生作用は BMSC 消失後も長期間持続することを我々のグループが明らかにした。これらの所見から、BMSC 由来の有効因子は損傷部位だけではなく、CSF を介して中枢神経系に体系的に作用することが示唆される。CSF を産生・分泌する脈絡叢上皮細胞は様々な神経栄養・成長因子を発現・分泌するため、CSF を介して中枢神経の保護・修復に深く関与すると考えられる。そこで申請者は、BMSC 移植効果は CSF を介する体系的な神経修復・再生機能の誘導による部分が大きいという仮説下に、BMSC 存在下に発現が活性化される CPEC 由来の神経修復をもたらす栄養因子同定を目的にする。

研究の到達点は以下の通り。

(1) トランスウェル法による CPEC と BMSC の非接触性の共培養系を確立させ、BMSC との共培養によって CPEC 内で発現が変化する遺伝子群を探索する。

(2 上の 1 の結果をもとに、CPEC 内で BMSC から CPEC への情報伝達に関与する CPEC 受容体の発現を遺伝子および蛋白レベルで明らかにする。

(3) *in vitro* 系において、侵襲が CPEC の標的遺伝子発現に与える影響を遺伝子および蛋白レベルで明らかにする。

(4) 脊髄損傷ラットへの培養 BMSC の CSF 内移植が宿主脈絡叢の標的、遺伝子発現に与える影響を遺伝子および蛋白レベルで明らかにし、形態学的な解析から CPEC で発現する神経修復に有効な因子を特定する。

## 3. 研究の方法

(研究計画調書に則って記す。)

本研究は、BMSC が CPEC に与える生物学的効果および CPEC で発現する神経修復に有効な遺伝子群を特定し、CPEC に寄る中枢神経系の神経再生機構をあきらかにするために以下の実験を計画した。

(1) トランスウェル法による CPEC と

BMSC の非接触性共培養系を確立し、BMSC の存在により CPEC 内で発現が変化する遺伝子群を DNA マイクロアレイにて特定する。(2) BMSC 由来因子を認識して、(1) で同定された機能分子の発現を誘導する CPEC 受容体の遺伝子発現を分子生物学的に解析する。(3) in vitro における CPEC への侵襲が CPEC の標的遺伝子発現に与える影響、および(4) in vivo 検索として脊髄損傷ラットへの培養 BMSC の CSF 内移植が宿主脈絡叢の遺伝子発現および標的遺伝子発現に与える影響を遺伝子およびタンパクレベルで解析し、その発現部位を形態学的に解析する。

平成 25 年度研究計画

【BMSC と CPEC の共培養による BMSC と CPEC 内で発現が変化する遺伝子の特定】

1) 生後 4 週令の Wistar ラットから、脈絡叢および BMSC を採取・単離し、単独培養をする。BMSC, CPEC の培養方法は申請者のグループが既に確立しているため、その方法を用いてそれぞれの培養を行う。5 日～1 週程度培養した CPEC と 2 回継代した BMSC を共培養に用いる。CPEC と BMSC の共培養にはトランスウェル法を用い、BMSC をチャンバー上で培養させる共培養系を確立させ、効果的な培養条件を探す。次に、BMSC との効果的な培養条件を定めるために、予めトランスウェル上に単層培養した BMSC と細胞を解離してからトランスウェル上まいた BMSC を CPEC と確立して共培養系で培養し、CPEC が分泌していると報告のある IGF1, VEGF, FGF2, EGF などの神経栄養因子・成長因子の発現に対する影響を検討する。2) 確立した CPEC と BMSC の共培養系を用いて、24 時間共培養させた CPEC および共培養していない CPEC のアンプルで DNA マイクロアレイによる網羅的解析を行い、BMSC および CPEC で共培養により発現が変化する遺伝子群を明らかにする。このマイクロアレイによる解析は RNA 抽出まで申請者が行い、後の解析は東レ株式会社マイクロアレイ受託解析サービスに委託する予定である。

【CPEC 内で発現が変化している神経栄養・成長因子および BMSC から CPEC への情報伝達に関与している受容体の遺伝子の発現解析】

DNA マイクロアレイによる解析をもとに、同様の共培養系を用いて、CPEC 内で発現が変化している神経栄養・成長因子および BMSC から CPEC への情報伝達に関与している受容体の遺伝子の発現を Real-time PCR, Western blot などにて申請者が解析する。

平成 26 年度研究計画

【CPEC 内で発現が変化している神経栄養・成長因子および BMSC から CPEC への情報伝達に関与している受容体の遺伝子の発現解析】

平成 25 年度に則した実験解析を行う。

【BMSC と CPEC の共培養系における低酸素、lipopolysaccharide (LPS) およびその両方の侵襲が CPEC の遺伝子の発現に与える影響】

1) CPEC 単独および BMSC と CPEC の共培養に低酸素侵襲を与えた状態と与えない状態で培養し、24 時間後に平成 25 年で標的にした遺伝子の発現を real-time PCR, Western blot などにて解析する。低酸素侵襲には酸素を 1% にして BMSC と CPEC の共培養を行う。

2) CPEC 単独および BMSC と CPEC の共培養に第 2 の侵襲である LPS を底、中、高濃度と濃度依存的に 24 時間与える。LPS を負荷した場合としない場合の CPEC 単独および BMSC と共同培養した CPEC にて、遺伝子の発現を real-time PCR, Western blot 等にて解析する。このモデルでは適度なストレスになる LPS 濃度を事前に検討する。

3) 第 3 の侵襲モデルとして、低酸素と LPS 侵襲の両方を CPEC 単独および BMSC と CPEC の共培養した CPEC にて上記の遺伝子の発現を real-time PCR, Western blot などにて解析する。LPS の濃度は(2) で明らかにした適切な負荷能度を適用する。

平成 27 年度研究計画

【BMSC と CPEC の共培養における侵襲が CPEC の遺伝子発現に与える影響】

平成 26 年度に則した実験解析を引き続き行う。

【脊髄損傷ラットへの培養 BMSC の移植が宿主 CPEC に与える影響】

1) 6 週令の Wistar ラットの第 8-9 胸椎レベルを挫滅損傷させる。直ちに BMSC を脳室内に移植し、急性期、亜急性期、慢性期に匹敵する、移植後 1 日、2 週間後、4 週間後の脈絡叢を採取して、標的遺伝子の発現を上記と同様な手法を用いて分子生物学的に解析する。さらに、標的電子あるいはそのタンパク発現を免疫組織染色あるいは in situ hybridization にて形態学的に解析し、発現部位が脈絡叢上皮細胞であるかを確認する。2) 上記と同様に脊髄損傷させたラットに BMSC と移植し、24 時間後の脈絡叢を採取し、DNA マイクロアレイにて BMSC 移植によって発現が変化する遺伝子を網羅的に解析する。sham operation (sham), sham+BMSC 移植、脊髄損傷、脊髄損傷+BMSC 移植群を作成し、それぞれの脈絡叢の遺伝子発現を網羅的に解析し、脊髄損傷において、BMSC によって変化する遺伝子を特定する。

## 4. 研究成果

(1) 骨髄間質細胞 (BMSC) 共培養による脈絡叢上皮細胞 (CPEC) の mRNA 発現量の変化

まずはじめに、神経再生に關与すると考えられる因子について、共培養下での mRNA の発現量の変化を RT-PCR で網羅的に解析した。その結果、CPEC 単培養時と比べて骨髄間質細胞 (BMSC) と共培養したときに、有意差はつかなかったものの、NGF (神経栄養因子, nerve growth factor) や VEGF (血管内皮細胞増殖因子, vascular endothelial growth factor)、HGF (肝細胞増殖因子, hepatocyte growth factor)、IGF-I (insulin-like growth factor I)、FGF-2 (fibroblast growth factor-2) などの発現が増加する傾向がみられた。

次に、脊髄損傷時の炎症モデルとして、LPS を添加した系で BMSC の共培養の影響を調べた。その結果、単培養に比べて共培養時に IGF-I と FGF-2 で有意な増加がみられ、逆に IGF-II では有意な減少がみられた。一方で、特に神経再生に關連が深い NGF や VEGF、HGF については、NGF で増加傾向、HGF で減少傾向がみられたものの、有意差は認められなかった。

そこで、これらの3因子についてさらに定量性の高い real-time PCR 法でその発現の変化を解析した。その結果、CPEC を単培養したときと BMSC と共培養したときとを比較すると、NGF と HGF の発現量に差はみられなかった。一方、VEGF の発現量は、BMSC を monolayer で培養したときには差はみられなかったが、細胞を分散して (dissociated) 共培養したときは有意な増加がみられた。次に、脊損時の炎症モデルとして LPS を加えた系での変化を解析した。CPEC の単培養において、LPS で刺激することにより、NGF の mRNA の発現は増加した。さらに、LPS 刺激時に BMSC と共培養することで NGF の mRNA の発現は増加した。HGF の発現量も、単培養で LPS 刺激することで有意な増加がみられた。LPS 刺激時の BMSC と共培養では、dissociated BMSC では差は認められなかったが、monolayer BMSC では有意な増加がみられた。一方、VEGF の mRNA 発現量は、CPEC 単培養で LPS 刺激しても変化は見られなかった。LPS 刺激時の共培養では発現量が有意に増加した。

(2) BMSC 共培養による CPEC のタンパク質発現量の変化

LPS 刺激時に BMSC と共培養することで mRNA 発現量に増加がみられた NGF と VEGF について、実際に培地中に分泌されるタンパク質の変化を ELISA 法によって解析した。

NGF は、LPS 刺激により CPEC、BMSC の単培養で共に発現が増加した。LPS 刺激

時の共培養では、顕著な発現の増加がみられた。これは、CPEC、BMSC の各々の単培養での発現量の和よりも明らかに高値を示したことより、共培養により発現が誘導されたと考えられる。

VEGF は、LPS 刺激により CPEC、BMSC の単培養で共に発現の増加がみられた。LPS 刺激時の共培養でも単培養に比べて高濃度の VEGF が検出されたが、この値は、それぞれの単培養での測定値の和と同等な値であった。つまり、共培養によってタンパク質の発現は増加しなかったと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

Hayashibe M, Homma T, Fujimoto K, Oi T, Yagi N, Kashihara M, Nishikawa N, Ishizumi Y, Abe S, Hashimoto H, Kanekiyo K, Imagita H8, Ide C, Morioka S.

Locomotor improvement of spinal cord-injured rats through treadmill training by forced plantar placement of hind paws. *Spinal Cord*, 2015, doi: 10.1038/sc.2015.186 (査読あり)

Kanekiyo K, Homma T, Yamada Y, Tamachi M, Ohta M, Suzuki Y, Ide C: Are long-term survival, proliferation and differentiation of transplanted cells desirable in clinical application for spinal cord injury? *Aino J*, 14, 69-76, 2015

Kanekiyo K, Nakano N, Homma T, Yamada Y, Ide C. Patterns of outgrowth of regenerating axons through spinal cord lesion. *Aino Journal*, 13: 95-101, 2014.

Nakano N, Nakai Y, Seo TB, Homma T, Yamada Y, Ohta M, Suzuki Y, Nakatani T, Fukushima M, Hayashibe M, Ide C: Effects of bone marrow stromal cell transplantation through CSF on the subacute and chronic spinal cord injury in rats *PloS ONE* 8 (9) : e73494. doi : 10.1371/journal.pone.0073494, 2013

[学会発表] (計13件)

Kanekiyo, K, Nakano, N, Homma T, Noda, T, and Ide, C. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会, 福島, 3月27-30日 (2016).

兼清健志, 中野法彦, 本間玲実, 野田亨, 井出千束, 第15回日本再生医療学会総会, 大阪, 3月17-19日 (2016).

Kanekiyo, K, Nakano, N, Homma T, Noda, T, and Ide, C. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会 BMB2015, 神戸, 12月 (2015).

兼清健志, 中野法彦, 本間玲実, 野田亨, 井出千束. 第56回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 大阪, 10月3-4日 (2015).

兼清健志, 本間玲実, 中野法彦, 松本直也, 井出千束, 第87回日本生化学会大会, 京都, 10月15-18日 (2014).

兼清健志、本間玲実、中野法彦、松本直也、井出千束. 第37回日本神経科学大会(日本神経科学学会)、横浜、9月11-13日(2014).

兼清健志、本間玲実、中野法彦、松本直也、井出千束. 第119回日本解剖学会総会(一般社団法人日本解剖学会)、栃木、3月27-29日(2014).

中野法彦、兼清健志、本間玲実、井出千束. 第13回日本再生医療学会総会(一般社団法人日本再生医療学会)、京都、3月4-6日(2014).

中野法彦、本間玲実、兼清健志、井出千束. 第86回日本生化学大会、横浜、9月11-13日(2013)

本間玲実、中野法彦、井出千束. 第36回日本神経科学大会(Neuro2013)、京都、6月20-23日(2013)

中野法彦、本間玲実、井出千束. 第11回日本再生医療学会総会、横浜、6月12-14日(2012)

中野法彦、中井吉保、本間珠実、井出千束. 第35回日本神経科学大会(Neuro2012)、名古屋、9月18-21日(2012)

中野法彦、本間珠実、井出千束. 第85回日本生化学会大会、福岡、12月14-16日(2012)

[図書]

該当なし

[産業財産権](出願、取得)

該当なし

[その他]

該当無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本間玲実 (HOMMA Tamami)  
藍野大学 医療保健学部・助教  
(藍野再生医療研究所)  
研究者番号: 30631220

### (2) 研究協力者

井出千束 (IDE Chizuka)  
藍野大学 医療保健学部・教授  
(藍野再生医療研究所)  
研究者番号: 70010080

中野 法彦 (NAKANO Norihiko)  
藍野大学 医療保健学部・准教授  
(藍野再生医療研究所)  
研究者番号: 40322721

松本直也 (MATSUMOTO Naoya)  
大阪大学救急医学教室・助教  
研究者番号: 50359808