

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：34441

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870744

研究課題名(和文) 骨髄間質細胞によるグリア細胞機能調節を介した脊髄再生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism of spinal cord regeneration via functional regulation of glial cells by bone marrow stromal cell

研究代表者

兼清 健志 (Kanekiyo, Kenji)

藍野大学・中央研究施設・講師

研究者番号：20525399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷モデルラットを用いて、骨髄間質細胞の培養上清の投与によって神経が再生する際、神経細胞に対する直接的な効果だけでなく、シュワン細胞の浸潤や損傷部周辺のアストロサイトが活性化することを明らかにした。培養アストロサイトを用いて *in vitro* での骨髄間質細胞の影響を調べたところ、骨髄間質細胞の培養上清の添加によってアストロサイトによる炎症性ケモカインの産生が抑えられていた。また、脳脊髄液を産生し中枢神経系の維持に重要であるグリア細胞の一つである脈絡叢上皮細胞も骨髄間質細胞によって一部の栄養因子の産生が増加した。さらに、この脈絡叢上皮細胞の培養上清を脳脊髄液経由で投与し、神経再生を確認した。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that bone marrow stromal cells (BMSC) stimulate axon regeneration directly but also indirectly via activation of glial cells such as astrocytes, choroid plexus epithelial cells (CPECs), and Schwann cells. Conditioned medium from BMSC (BMSC-CM) promoted the production of anti-inflammatory chemokines and reduced inflammatory chemokines in astrocytes. *In vivo* experiment using spinal cord injury model rat revealed that BMSC-CM administration promoted locomotion compared to control groups. Furthermore, extracellular matrix components, such as collagen types I and IV, and laminin were expressed in the region site and interact with regenerating axon. Similarly, CPEC-transplantation also accelerated recovery from spinal cord injury. Taken together, it was suggested that many glial cells play a role in axon regeneration after spinal cord injury, and BMSC-CM enhance glial cell function. Further investigation is needed to develop a novel therapy with regulating glial cells.

研究分野：神経再生

キーワード：脊髄損傷

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国には、現在10万人を超える脊髄損傷患者があり、毎年約5千人が新たに受傷している。症状は損傷部位によって様々であるが、重篤な場合、一生車椅子の生活を強いられるため、新たな治療法の開発が急務である。近年、iPS細胞や体性幹細胞移植による再生医療が注目され、多くのグループによって研究が進められているが未だ有効な治療法は確立されていない。我々のグループはこれまでに、骨髄間質細胞(BMSC)に着目し、脊髄損傷ラットを用いてBMSC移植が有効であることを報告し、さらにヒトへの臨床応用も行っており、その有効性と安全性を報告してきた。その中で、移植したBMSCは移植から2週間以降は消失しているにもかかわらず、なお神経再生は持続していることがわかってきた。このことから、BMSCによる神経の再生は、BMSC自身がニューロンに分化することではなく、BMSCがニューロンのみならずその周辺のグリア細胞に作用し自己再生能力を増強することにより達成されていることが示唆された。しかしながら、その詳細なメカニズムは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

上述のような背景を踏まえて、本研究ではBMSCが各種グリア細胞に与える影響を調べ、損傷部位での体系的な神経再生メカニズムを明らかにすることで、グリア細胞を介した新たな脊髄損傷治療法の開発を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ニューロンや各種グリア細胞の単離・初代培養はマウスで確立してきた方法(Kanekiyo et al. *J Neurosci* 2013)に従って行なった。略説すると、ニューロンはSDラットの新生仔の海馬から、グリア細胞は脳から、接着性の違い、密度勾配遠心、レクチン-免疫パンイン各グリア細胞を単離し、それぞれ至適培地で培養した。BMSCは、3~4週齢のSDラットの大腿骨と脛骨から骨髓液を採取し、10% FBS含有DMEMで24時間培養し、接着した細胞を2~4継代したものをBMSCとして用いた。脈絡叢上皮細胞(CPEC)は、3~4週齢のラットの側脳室および第4脳室から脈絡叢を採取し、酵素処理後、ポリ-L-リジンコートしたディッシュ上で10% FBS含有DMEMで培養した。

(2) グリア細胞が発現する神経修復有効因子の解析

BMSCの刺激に応答して変動するグリア細胞が発現する神経有効因子を解析するために、まずBMSCの培養上清(BMSC-CM)を回収した。BMSC-CMは初代培養ニューロンに対して神経突起の伸長効果をチェックしたものをを用いた。このBMSC-CMを初代培養グ

リア細胞に添加し、グリア細胞の増殖能や細胞マーカーの発現をコントロール群(DMEMのみ)と比較した。グリア細胞の中でBMSCの影響を大きく受けたアストロサイトとCPECについて、さらにBMSC-CMを添加したものとコントロール群(DMEMのみ)について、RNeasy mini kit(QIAGEN)を用いてtotal RNAを抽出し、DNA microarray(3D-Gene, 東レ)によって発現因子の遺伝子レベルの変動を解析した。

(3) 脊髄損傷モデルラット

脊髄損傷治療効果を検討するため、脊髄損傷モデルラットを作製し、グリア細胞移植やBMSCやグリア細胞の培養上清を投与して行動学的な評価及び組織学的な解析を行った。6週齢のメスのSDラットにNew York University impactorを用いて圧挫損傷を与えることで脊髄損傷モデルラットを作製した。細胞の移植は、損傷から1週間後の亜急性期に損傷部に直接注入した。液性因子の投与は、損傷直後から、浸透圧ポンプを用いて第4脳室から脳脊髄液経由で1週間もしくは2週間にわたって投与した。運動機能の評価は、Basso, Beattie, Bresnahan(BBB)スコアを用いた。組織の解析は、各種抗体を用いた免疫組織化学染色やHE染色した組織の光学顕微鏡での観察及び一部は電子顕微鏡での観察で行なった。

4. 研究成果

BMSCによるグリア細胞への影響を調べるために、BMSC-CMを添加してグリア細胞の発現する因子の変動をDNA microarrayによって解析した。アストロサイトでは、パスウェイ解析の結果、いくつかのパスウェイで複数の遺伝子が発現していることが分かった。中でも、エストロゲンの生合成に関わる遺伝子の発現が増加していた。エストロゲンは、女性ホルモンのほたけの他に、神経の新生や再生を促すことが報告されている。骨髄間質細胞の移植や培養上清の投与で神経再生が促進されるメカニズムの一つとして、損傷部周辺のアストロサイトによるエストロゲンの発現の上昇が寄与している可能性が示唆された。また、BMSC-CMで培養したアストロサイトではMAObの発現が約半分に抑えられていた。このMAObはGABA産生酵素であり、アルツハイマー病などの中枢神経疾患で見られる反応性アストロサイトで活性化することが知られている。さらに、炎症性のケモカインCCL20とCXCL10の発現が約30%に抑えられていた。一方で、抗炎症性サイトカインであるIL-11の発現は1.7倍増加していた。これらのことから、BMSC-CMは、アストロサイトの活性化を抑えることで炎症反応を抑制し、二次損傷を軽減することでその後の神経再生を有利にしていることが示唆された。

一方で、脳脊髄液を産生し中枢神経系の維持に重要であるグリア細胞の一つであるCPECについてはその細胞移植効果と培養上清(CPEC-CM)の投与効果を脊髄損傷ラットを用いて検証した。BBB scoreにより運動機能の回復を評価した結果、CPECを移植したCPEC移植群は移植4週間後にはコントロール群(PBS投与)に対して有意な回復がみられた(図1)。免疫組織化学染色により、損傷部の再生神経を解析したところ、驚くべきことに移植から2日後に移植したCPEC周辺に多くの再生神経が確認された(図2)。同様に、CPEC-CMを投与した場合でもコントロール群(DMEM投与)に比べて優位な回復がみられた。また、移植したCPECはニューロンやグリア細胞には分化しなかった。これらのことから、CPECの分泌する有効因子が神経修復を促進したと考えられる。今後は、外から細胞移植や内在的な脈絡叢を活性化させ、同様の効果を得る方法を模索する必要がある。

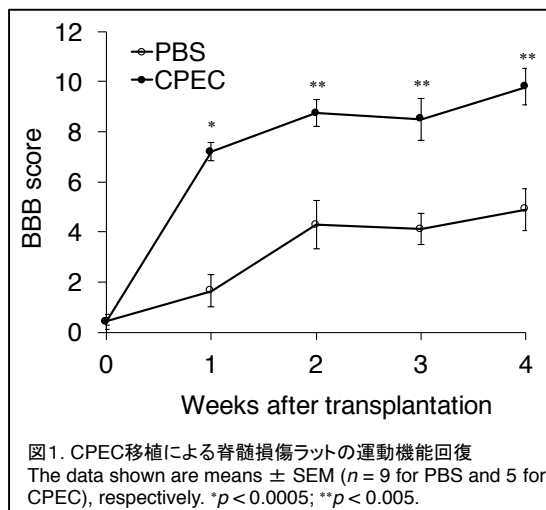


図1. CPEC移植による脊髄損傷ラットの運動機能回復
The data shown are means \pm SEM ($n=9$ for PBS and 5 for CPEC), respectively. * $p < 0.0005$; ** $p < 0.005$.

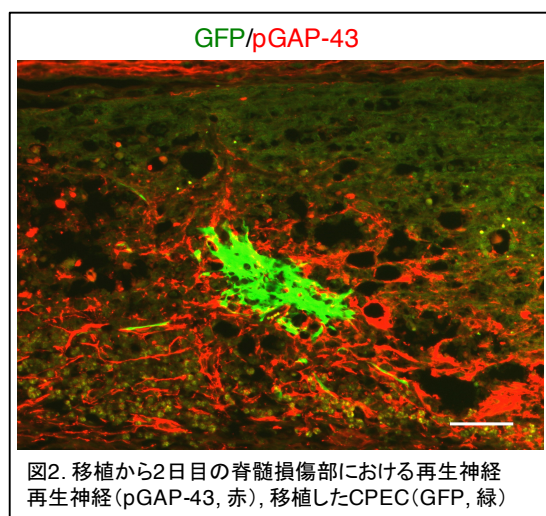


図2. 移植から2日目の脊髄損傷部における再生神経
再生神経(pGAP-43, 赤), 移植したCPEC(GFP, 緑)

次に、BMSC-CM投与による効果を脊髄損傷ラットを用いて検証した。損傷と同時にBMSC-CMを脳脊髄液経路で投与しはじめ、

1週間もしくは2週間にわたって投与した結果、投与期間中に大きな運動機能の回復が見られた(図3)。

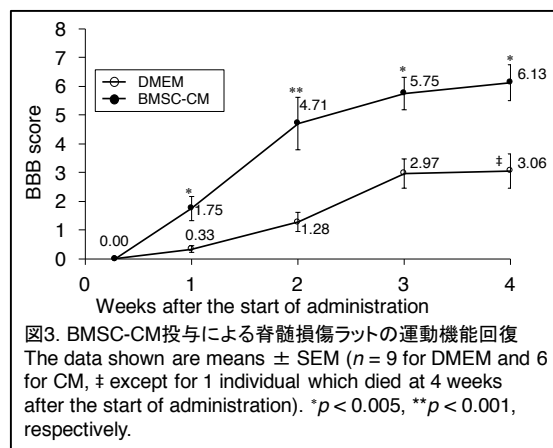


図3. BMSC-CM投与による脊髄損傷ラットの運動機能回復
The data shown are means \pm SEM ($n=9$ for DMEM and 6 for CM, \ddagger except for 1 individual which died at 4 weeks after the start of administration). * $p < 0.005$, ** $p < 0.001$, respectively.

さらに、免疫組織化学的な解析を行なった結果、損傷部に type I collagen (図4) や type IV collagen、laminin などのマトリックス成分が多く発現し、再生してきた神経と密接に相互作用していることがわかった。このようなマトリックス成分が足場となることが神経再生に重要な役割を担っていると考えられる。

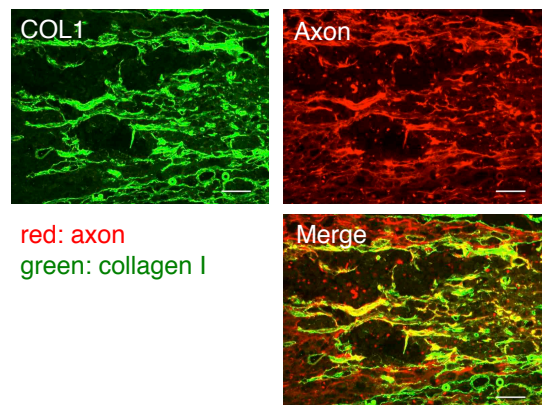


図4. BMSC-CM投与開始から4週間後の脊髄損傷部
再生神経(赤)の周辺にCollagen Type I(緑)が大量に発現している

本研究から、脊髄損傷からの回復は神経細胞のみならず種々のグリア細胞が複雑に相互作用した結果であること、また、BMSCはそれらの機能を複合的に調節することで神経再生を促進させていることがわかった。しかしながら、内在的な個々のグリア細胞をどの様に刺激して、神経再生を促すことができるかはさらなる研究が必要である。

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. Kanekiyo K, Nakano N, Homma T, Yamada Y, Tamachi M, Suzuki Y, Fukushima

- M,Saito F, and Ide C. Effects of multiple-injection of bone marrow mononuclear cells on spinal cord injury of rats. *J Neurotrauma*, (2017), [Epub ahead of print], (査読有り) , DOI: 10.1089/neu.2016.4841.
2. Ide C, Nakano N, and Kanekiyo K. Cell transplantation for the treatment of spinal cord injury - bone marrow stromal cells and choroid plexus epithelial cells. *Neural Regen Res* 2016;11(9):1385-8. DOI: 10.4103/1673-5374.191198
 3. Ide C and Kanekiyo K. “Points regarding cell transplantation for the treatment of spinal cord injury. *Neural Regen Res*, 2016;11(7): 1046-9. DOI: 10.4103/1673-5374.187021
 4. Nakano N, Kanekiyo K, Nakagawa T, Asahi M, and Ide C. NTAK/neuregulin-2 secreted by astrocytes promotes survival and neurite outgrowth of neurons via ErbB3. *Neurosci Lett* 2016;622(0):88-94. (査読有り) DOI: 10.1016/j.neulet.2016.04.050.
 5. Kanekiyo K, Nakano N, Noda T, Yamada Y, Suzuki Y, Ohta M, Yokota A, Fukushima M, and Ide C. Transplantation of choroid plexus epithelial cells into contusion-injured spinal cord of rats. *Restor Neurol Neurosci*, 2016;34(3):347-66. (査読有り) DOI: 10.3233/RNN-150546.
 6. Hayashibe M, Homma T, Fujimoto K, Oi T, Yagi N, Kashihara M, Nishikawa N, Ishizumi Y, Abe S, Hashimoto H, Kanekiyo K, Imagita H, Ide C, and Morioka S. Locomotor improvement of spinal cord-injured rats through treadmill training by forced plantar placement of hind paws. *Spinal Cord* 2016;54(7):521-9. (査読有り) DOI: 10.1038/sc.2015.186.
 7. Kanekiyo K, Nakano N, Homma T, Yamada Y, Tamachi M, Ohta M, Suzuki Y, and Ide C. Are the long-term survival, proliferation, and differentiation of transplanted cells desirable in clinical application for spinal cord injury? *Aino Journal*, 2015;14:69-76. (査読有り)
- [学会発表] (計 14 件)
1. 兼清健志、中野法彦、鈴木義久、井出千束 “骨髄由来単核細胞の脊髄損傷モデルラットへの複数回移植効果の検討” 第 16 回日本再生医療学会総会, 仙台, 2017.3.7-9
 2. 兼清健志、中野法彦、鈴木義久、井出千束 “脊髄損傷モデルラットに対する骨髄由来単核細胞の複数回移植効果” 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 長崎, 2017.3.28-30
 3. 兼清健志、中野法彦、本間玲実、野田亨、井出千束 “脈絡叢上皮細胞移植によるラット脊髄損傷修復効果” 第 89 回日本生化学会大会, 仙台, 2016.9.25-27
 4. 中野法彦、兼清健志、中川孝俊、朝日通雄、井出千束 “アストロサイト由来の NTAK/Neuregulin-2 のニューロンに対する作用” 第 89 回日本生化学会大会, 仙台, 2016.9.25-27
 5. Ide C, Kanekiyo K, and Nakano N. “Cell transplantation for the treatment of spinal cord injury-bone marrow stromal cells and choroid plexus epithelial cells.” 2016 International Neural Regeneration Symposium (INRS 2016) & Pacific Symposium on Neural regeneration (APSNR 2016), Yinchuan (China), July 29-31, 2016
 6. Kanekiyo K, Nakano N, and Ide C. “Cell transplantation for the treatment of spinal cord injury” 2016 International Neural Regeneration Symposium (INRS 2016) & Pacific Symposium on Neural regeneration (APSNR 2016), Yinchuan (China), July 29-31, 2016
 7. Kanekiyo K, Nakano N, Noda T, and Ide C. “Transplantation of choroid plexus epithelial cells promotes axon regeneration in spinal cord injury” 第 39 回日本神経科学大会, 横浜, 2016.7.20-22
 8. Kanekiyo K, Nakano N, Homma T, Noda T, and Ide C., “Transplantation of choroid plexus epithelial cells into contusion-injured spinal cord of rats” 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 福島, 2016.3.28-31
 9. 兼清健志、中野法彦、本間玲実、野田亨、井出千束, “脊髄損傷モデルラットにおける脈絡叢上皮細胞移植による神経再生効果” 第 15 回日本再生医療学会総会, 大阪, 2016.3.17-19
 10. 兼清健志、中野法彦、本間玲実、野田亨、井出千束, “脊髄損傷モデルラットに対する脈絡叢上皮細胞移植効果” 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, 2015.12.1-4
 11. 兼清健志、中野法彦、本間玲実、野田亨、井出千束, “脊髄損傷ラットへの脈絡叢上皮細胞移植効果” 第 56 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 大阪, 2015.10.3-4
 12. Kanekiyo K, Nakano N, Noda T, and Ide C., “Therapeutic effect of choroid plexus epithelial cell transplantation for spinal cord injury” 第 38 回日本神経科学大会, 神戸, 2015.7.28-31
 13. Kanekiyo K, Nakano N, Noda T, and Ide C. “Effect of transplantation of choroid plexus epithelial cells for spinal cord injury in rats” 第 120 回日本解剖学会総会, 神戸, 2015.3.21-23
 14. 兼清健志、中野法彦、野田亨、井出千束 ”脈絡叢上皮細胞の脊髄損傷モデルラットへの移植効果” 第 14 回日本再生医療学会総会, 横浜, 2015.3.19-21.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼清健志 (KANEKIYO, Kenji)
藍野大学・中央研究施設・講師
研究者番号：20525399

(4) 研究協力者

井出千束 (IDE, Chizuka)
藍野大学・中央研究施設・教授

中野法彦 (NAKANO, Norihiko)
藍野大学・中央研究施設・准教授

鈴木義久 (SUZUKI, Yoshihisa)
北野病院・形成外科・主任部長