

神経・筋変性疾患における自己細胞移植のための生体材料の開発

研究分担者 田畑泰彦 京都大学再生医科学研究所 生体組織工学研究部門 生体材料学分野 教授

研究要旨

本研究の目的は、細胞移植治療を実現するための生体材料の研究開発を行うことである。3年間を通して、骨髄間葉系幹細胞（MSC）の神経細胞への分化のための分化遺伝子の導入技術について検討した。分化遺伝子の導入を効率よく行うための非ウイルス性キャリアのデザインおよび遺伝子導入培養法の改良を行い、MSCに対する遺伝子導入とそれにとまう神経細胞への分化を調べた。スペルミンを化学導入して作製したカチオン化多糖（プルラン）と培養方法を工夫することによって、細胞の生存率を下げることなく、細胞分化を実現することができた。

A. 研究目的

骨髄間質細胞（MSC）は患者本人から採取可能であり、細胞数確保が可能であるため、パーキンソン病や筋ジストロフィーなどの神経・筋変性疾患において、免疫拒絶や倫理問題のハードルの低い「自己細胞移植治療」への応用が可能である。しかしながら、変性疾患ではすでに組織が荒廃・萎縮していることが多く、たとえ自己由来の神経細胞や骨格筋細胞が移植されたとしても、効率的な細胞生着と機能回復には結びつかない。現在の再生医学では、如何に目的とする細胞を効率よく獲得するかということに焦点が置かれているが、細胞移植治療を現実的な視点から眺めれば、有効な細胞投与法、移植細胞の周辺環境の整備などが次なる大きな課題となっている。すなわち、細胞だけを単に局所に入れるという発想から一歩前に踏み出し、細胞の生着・分化・機能発揮に必要とされる要素を盛り込んだ移植システム（＝システムアプローチ）を構築することが、将来に向けた重要課題となる。本研究では、これまでの研究

成果を発展させ、神経・筋変移植システムの確立を目指す。具体的には、骨髄間質細胞から神経細胞と骨格筋細胞を誘導し、各種変性モデルにおいて生体材料と用いた移植細胞の周辺環境の整備も含めたシステムアプローチによる移植を行い、機能回復、組織再生を検討する。生体材料の中で、まず、MSCから神経細胞への分化を効率よく行うための非ウイルス性キャリアの作製と培養条件についての検討を行った。

B. 研究方法

遺伝子導入のための非ウイルス性キャリアの研究においては、遺伝子発現効率の向上が主な目的である。しかしながら、本研究の最終目的は治療であるため、キャリアデザイン、作製においては、臨床応用できる材料を用いることが不可欠である。そこで、臨床前例があり、細胞毒性が低く、細胞内への取り込みに優れた材料が必要となる。細胞の表面には、物質を取り込むためのレセプターが存在している。このレセプターには、タンパ

ク質を認識するものと糖を認識するものの2つがある。私たちは後者のレセプターを利用することを考えた。糖認識レセプターに認識される糖の重合体である多糖を出発材料として、アニオン性の遺伝子と複合化（コンプレックス）するために多糖のカチオン化修飾を行った。通常、細胞内に取り込まれた物質は、まずエンドソームに運ばれ、そこで、分解される運命にある。この過程を回避するためにはエンドソームの pH を低下させない緩衝作用をもつ性質が必要である。このような要求から、生体アミンであり、かつ pH 緩衝能をもつスベルミンを選び、多糖への化学導入を行った。多糖であるプルランの水酸基をカルボジイミダゾール（CDI）で活性化した後、スベルミンを加え、水酸基とスベルミンの末端アミノ基とを化学結合させた。得られたカチオン化デキストランと遺伝子プラスミド DNA を水溶液中で混合、両者のポリイオンコンプレックスを形成させた。ポリイオンコンプレックス形成を電気泳動、動的あるいは表面電位光散乱装置によって解析した。ポリイオンコンプレックスを MSC とともに培養することで、遺伝子導入を行った。プラスミド DNA—カチオン化デキストランコンプレックスを培養液中に投入する遺伝子導入培養（従来法）とコンプレックスをコーティングした基材上で細胞を培養し、遺伝子を導入する方法（リバーストランスフェクション法）の両方を比較した。次に、遺伝子導入された MSC の神経細胞への分化誘導を調べた。マウス、ラット、サルから MSC を採取、動物種が遺伝子導入と細胞分化に与える影響について検討した。神経分化は神経細胞特異表面マーカーの免疫染色とドーパミン産生測定によって評価した。遺伝子導入培養の前後における細胞の生存率の変化を調べ、遺伝子導入による細胞毒性を評価した。

次に、培養基材と培養方法が遺伝子導入に与える影響について調べるため、2次元と3次元の基材を調製した。ゼラチン水溶液に  $\beta$ -TCP（トリカルシウムリン酸）顆粒を分散させた後、泡立て、凍結乾燥することで3次元スポンジ基材を作製した。得られた基材を 160℃にて異なる時間、熱脱水処理を行うことによって、ゼラチンを化学架橋し、 $\beta$ -TCP 含有ゼラチンスポンジ足場を調製した。プラスミド DNA—カチオン化デキストランコンプレックスをコーティングした2次元あるは3次元スポンジ基材上でラット MSC を培養し、遺伝子の導入と発現効率を調べた。培養は静置および旋回培養の2つの方法を用いた。コンプレックスのコーティング条件、培養方法が遺伝子導入と細胞毒性に与える影響について検討した。

### C. 研究成果

プルランのカチオン化反応において、CDI やスベルミン濃度、および反応時間を変えることによって、プルランへのスベルミン導入率は変化した。プラスミド DNA とカチオン化プルランを水溶液中で混合したところ、両者のコンプレックスが形成された。コンプレックスの分子サイズは 150-200nm であり、その表面電位は十数 mV であった。プラスミド DNA は 600nm のサイズをもち、その表面電位は-30mV 程度であることから、カチオン化ゼラチンとの混合によってコンプレックスが形成されていることがわかった。次に、このコンプレックスによる MSC に対する遺伝子導入と遺伝子発現を調べた。MSC はマウス、ラット、サルの骨髄より単離した。培養液中にコンプレックスを加え、従来法の遺伝子導入培養を行ったところ、遺伝子発現は認められたが、そのレベルは低いものであった。そこで、遺伝子発現レベルを高めるとともに、細胞毒性を下げる目的で、リバーストランスフェクション法を考案した。まず、

培養皿表面にアニオン化ゼラチンと細胞接着因子をコーティング、その後、コンプレックスをコーティングする。このコーティング表面上で細胞を培養する。細胞近傍に常に遺伝子が存在し、培養条件をよくすることで、細胞毒性が低く、遺伝子発現レベルを高めることが可能となった。マウス、ラット、サルから採取した MSC に対して、遺伝子とカチオン化プルランとのコンプレックスを利用したリバーストランスフェクション法を適用した。その結果、神経分化遺伝子導入による細胞死もほとんど見られず、細胞の神経への分化が認められた。神経細胞特異マーカーを用いた免疫染色と細胞のドーパミン産生能、加えて細胞の形態から MSC 神経細胞への分化を確認した。

細胞培養のための 3 次元スポンジ基材の作製では、熱処理時間を変えることで  $\beta$ -TCP 含有ゼラチンスポンジの架橋程度を変化させることができた。架橋度に関係なく、いずれのスポンジも連通多孔質構造をもち、その平均孔サイズは  $150\mu\text{m}$  であった。 $\beta$ -TCP 顆粒を加えることによって、スポンジ強度が高まり、細胞培養操作時におけるスポンジの変形が抑制された。なお、 $\beta$ -TCP 存在は細胞の増殖に影響を与えることはなかった。次に、異なる基材を用いて、コンプレックスによる MSC に対する遺伝子導入と遺伝子発現を調べた。MSC はラットの骨髄より単離した。培養皿表面にアニオン化ゼラチンと細胞接着因子をコーティング、その後、コンプレックスをコーティングする。このコーティング表面上で細胞を培養した。この培養方法では、細胞近傍に常に遺伝子が存在し、培養条件をよくすることで、細胞毒性が低く、遺伝子発現レベルを高めることが可能となった。 $\beta$ -TCP 含有力学補強ゼラチンスポンジをアニオン化ゼラチン水溶液に浸漬、スポンジ孔構造の内壁をコーティングした。その後、コンプレックス水

溶液をスポンジに加え、スポンジ孔内壁をコーティング処理した。この 3 次元スポンジ足場を用いて、MSC の遺伝子導入を調べた。その結果、2 次元基材に比べて、より高い遺伝子発現効率が得られた。また、遺伝子導入培養による細胞毒性は認められなかった。

#### D. 考察

カチオン化プルランのスペルミン導入率とプラスミド DNA との混合比、MSC への与える濃度比などを変えると、遺伝子発現レベルが変化した。カチオン化プルランのスペルミン導入率、プラスミド DNA とカチオン化多糖との混合比などによって、形成されたプラスミド DNA—カチオン化多糖コンプレックスの分子サイズとその表面電荷は大きく変化する。このコンプレックスの物性が MSC への取り込みとその結果として起こる遺伝子発現に影響を与えることが知られている。コンプレックスの取り込みと遺伝子発現レベルとの正の相関性が得られた。このことは、キャリアの設計が効率よく遺伝子を導入し、発現させる key 技術であることが示している。遺伝子導入キャリアだけでなく、遺伝子導入培養の条件を最適化することによって、遺伝子発現レベルの増加とその結果としての細胞機能の修飾、すなわち神経細胞への分化が促進されることがわかった。その理由として、遺伝子キャリアとして用いたプルランが細胞表面の糖認識レセプターによって認識され、細胞内に効率よく遺伝子を導入させることができたこと、次に、緩衝能をもつスペルミンにより、導入遺伝子のエンドソームからの細胞質への移動が効率よく行われたことなどが考えられる。遺伝子コンプレックスを細胞培養液中に添加する従来法と比較して、リバーストランスフェクション法では、導入すべき遺伝子が細胞近傍に存在するため、細胞内への遺伝子の取り込み確率が

高まることが期待できる。また、リバーズ法では、細胞培養時に培養液中に血清を添加させることが可能となり、細胞の栄養状態がよくなり、遺伝子発現レベルの増大と細胞毒性の低減とが同時に得られたと考えられる。カチオン化プルランを用いて、MSC への遺伝子導入した細胞は、神経の分化マーカーを発現するとともに、ドーパミンを分泌していた。これらの成果は、これまで遺伝子導入が難しかったサル MSC に対しても認められた。この結果は、細胞の形態、形質のみならず、機能的にも MSC の神経細胞への分化を実証している。加えて、これまでの遺伝子導入法に比較して、遺伝子導入、発現にともなう細胞死が大幅に抑制され、神経分化細胞の回収率と質の向上が実現された。このように、細胞の機能および回収率の観点から見て、今回の研究成果は、移植治療に用いる細胞の調製法に対して大きな進歩をもたらしたと考えられる。

また、コンプレックスコーティング基材上で細胞を培養する新しい遺伝子導入法では、細胞培養時に培養液中に血清を添加させることが可能となり、細胞の栄養状態がよくなり、遺伝子発現レベルの増大と細胞毒性の低減とが同時に得られたと考えられる。さらに、基材を 2 次元から 3 次元に変化させたことにより、遺伝子発現がより高まることがわかった。旋回培養により細胞への栄養と酸素の供給がよくなり、その結果として、3 次元スポンジ基材内での細胞の状態がよくなり遺伝子導入効率が向上したことが理由であると考えられる。

#### E. 結論

スペルミン化学導入したカチオン化プルランを遺伝子導入キャリアとして用い、さらに、遺伝子導入培養法を工夫することによって、細胞毒性を抑えた MSC への遺伝子導入を実現させること

ができることがわかった。この方法により、サル MSC の神経分化も可能となった。現在、神経分化細胞を用いたサル病態モデル動物への移植実験を行ったところ、よい機能回復が見られている。この移植における細胞の生着率と機能発現のための細胞足場に対する生体材料の検討も加え、治療効果の高い細胞移植システムの確立を行う。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. A. Okazaki, JI. Jo, Y. Tabata. A Reverse Transfection Technology to Genetically Engineer Adult Stem Cells. *Tissue Engineering*, 13(2), 245-251 (2007)
2. JI. Jo, N. Nagaya, Y. Miyahara, M. Kataoka, M. Harada-shiba, K. Kangawa, and Y. Tabata. Transplantation of genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in Rats with Myocardial Infarction: Benefit of a Novel Nonviral Vector, Cationized Dextran. *Tissue Engineering*, 13(2), 313-322 (2007)
3. JI Jo, T Ikai, A Okazaki, M Yamamoto, Y Hirano, Y Tabata. Expression profile of plasmid DNA by spermine derivatives of pullulan with different extents of spermine introduced. *J Control Release*, 118(3), 389-398(2007)
4. JI. Jo, T. Ikai, A. Okazaki, K. Nagane, M. Yamamoto, Y. Hirano and Y. Tabata. Expression profile of plasmid DNA obtained using spermine derivatives of pullulan with different molecular weights. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, 18(7), 883-899(2007)
5. T. Okasora, JI. Jo, and Y. Tabata. Augmented anti-tumor therapy through natural targetability of macrophages genetically engineered by NK4 plasmid DNA. *Gene Therapy*, 15, 524-30, (2008)
6. M. Nakamura, JI. Jo, Y. Tabata, and O. Ishikawa. Controlled delivery of T-box 21 siRNA

ameliorates autoimmune alopecia (alopecia areata) in C3H/HeJ mouse model. Am J Pathol., 172(3):650-8, (2008)

7. N. Nishishita, JI. Jo, M. Yamamoto, Y. Tabata, and Y. Hirano. The gene transfection using cell attachment peptides for gene therapy. Peptide Science, 2007, 443-46, (2008)
8. K. Nagane, M. Kitada, S. Wakao, M. Dezawa, Y. Tabata. Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells by spermine-pullulan-mediated reverse transfection method. Tissue Engineering Part A, **15**(7):1655-65 (2009)

## 2. 学会発表

該当なし

## G. 知的所有権の取得状況

該当なし

## 骨格筋の幹細胞と移植モデルとしての筋ジストロフィー犬

分担研究者

今村 道博

国立精神・神経センター神経研究所

遺伝子疾患治療研究部 室長

### 研究要旨

1. 筋衛星細胞は骨格筋の幹細胞で、再生医療に有用な細胞の一つである。筋細胞膜上の  $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$ -DG) は *O*-マンノース型糖鎖修飾を受け、細胞外マトリックスと結合し、筋膜の安定性を保っていると考えられている。そこで骨格筋衛星細胞の  $\alpha$ -DG の *O*-マンノース型糖鎖修飾の機能を調べる目的で、*O*-マンノース型糖転移酵素ノックアウトマウス(POMGnT1<sup>-/-</sup>)の筋衛星細胞の増殖能と移動能を検討した。POMGnT1<sup>-/-</sup>筋衛星細胞では同腹の野生型マウスに比べて増殖能と移動能が低下していた。また、POMGnT1<sup>-/-</sup>筋衛星細胞にレトロウイルスで POMGnT1cDNA を導入し、 $\alpha$ -DG の糖鎖修飾を回復させると、細胞増殖活性が部分的に回復した。以上から  $\alpha$ -DG の *O*-マンノース型糖鎖修飾は筋衛星細胞の増殖と組織内での移動に重要である事が示唆された。

2. 筋ジストロフィーの骨格筋では、進行期に筋線維が徐々に脂肪細胞に置換されるが、脂肪細胞の由来や出現機序については不明である。そこで脂肪細胞の由来を特定することを目的とし、筋固有の SP 細胞、筋芽細胞、骨髄細胞を GFP-tag マウスから採取して野生型のマウスに移植した後、筋再生を誘導して、脂肪細胞に GFP が発現するかどうか検討した。SP 細胞移植筋の再生では、GFP 陽性の細胞質を持ち、ペリリピン陽性の油滴を含む細胞が見出された。一方筋芽細胞移植筋や骨髄キメラマウス筋の再生で出現する脂肪細胞には GFP の発現は認められなかった。以上からグリセリン誘導による筋再生で出現する脂肪細胞のうち、その少なくとも一部は筋固有の SP 細胞に由来することが示唆された。

3. Duchenne 型筋ジストロフィーのモデル動物である筋ジストロフィー犬は、幹細胞移植をはじめとする様々な治療研究に利用されている。しかし、実験動物としての供給が限られているために、非侵襲的な臨床症状の評価が望まれる。従来観察によるスコアリングが行われてきたが、運動性の評価に関する客観性と定量性が十分でなかった。そこで、赤外線センサーを用いた運動量モニタリングシステムによる運動量評価を検討した。その結果、従来法よりも運動性の評価を詳細に描出し、長期的な経過観察・治療評価に有用であることがわかった。

### A. 研究目的

#### 1. 幹細胞としての筋衛星細胞の単離と遺伝子発現解析

骨格筋の筋衛星細胞は、筋障害時に活性化、増殖、融合し、多核の筋線維を形成し、

筋線維を再生する。筋衛星細胞を用いた細胞移植治療は筋ジストロフィーの再生医療として期待されているが、移植効率の低さが問題となる。本研究では筋ジストロフィーに対する自家筋衛星細胞移植の確立を目標に、筋衛星細胞の  $\alpha$ -dystroglycan の糖

鎖修飾が筋衛星細胞の維持、活性化、増殖、分化に与える影響について検討を行った。

## 2. 筋再生時に出現する脂肪細胞の由来

筋ジストロフィーの骨格筋では筋線維の変性・壊死・再生が繰り返された後、一部は脂肪細胞に置き換わることが知られている。しかしながら、脂肪細胞の由来や出現機序については不明である。本研究で我々は、脂肪細胞の由来の特定を目的として、筋再生に寄与すると考えられる骨髄細胞、筋固有 SP 細胞及び筋芽細胞に着目し、GFP-tag マウスから採取して移植した野生型のマウスに、グリセリン投与による筋再生を誘導して出現する脂肪細胞に GFP が発現するかどうか検討を行った。

## 3. 筋ジストロフィー犬での治療効果の定量的解析ー赤外線モニタリングシステムを用いた運動量評価法の確立ー

筋ジストロフィー犬（筋ジス犬）は、Duchenne 型筋ジストロフィーに最も類似した進行性で重症の症候を有するため、筋ジストロフィーに対する幹細胞移植治療を開発し、評価を行う上で重要な実験動物である。非侵襲的な臨床症状の評価方法としてこれまで、グレーディングスケールによるスコアリングが行われてきた。このスコアリングシステムは、5 段階であるために個体ごとの僅差を検出できないこと、多くの筋ジス犬が早期に最大値に達することなどから、十分な客観性と定量性において不十分であった。本研究では、赤外線運動量モニタリングシステムを用いた自発運動量の評価法が、筋ジス犬の運動量評価として有用かどうか検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 筋衛星細胞の単離と遺伝子発現

SM/C-2.6 抗体とセルソーターを用いて、

O-マンノース型糖転移酵素の POMGnT1 がノックアウトしたマウスの骨格筋から直接単離した筋衛星細胞を *in vitro* で 20%FCS, bFGF 2.5ng/ml を含む DMEM (増殖培地) で培養し、その増殖能を MTT アッセイで検討した。また、筋衛星細胞の移動能を transwell migration assay および wound healing assay で検討した。

また、野生型及び POMGnT1 ノックアウトマウスの骨格筋からセルソーターで単離した筋衛星細胞にレトロウイルスを用いて POMGnT1 cDNA を導入し、 $\alpha$ -DG の糖鎖修飾と増殖能の回復を検討した。さらに、GFP-Tg 及び GFP-Tg/POMGnT1 ノックアウトマウスの骨格筋から筋衛星細胞を調整し、NOD/Scid マウス骨格筋へ移植し、2 週間後の移植効率について検討を行った。

## 2. 筋再生時に出現する脂肪細胞の由来

B6 系の GFP-tag マウス骨格筋より単核細胞を採取し、FACS により SP 細胞と筋芽細胞を分離調製した。野生型マウス (B6) の前脛骨筋に 50%グリセリンを注入して筋再生を誘導し、翌日細胞を移植して 10 日以上飼育したのち筋を採取して解析した。一方 GFP-tag マウスより骨髄を採取し、直前に X 線照射した B6 マウスに移植し、1 カ月以上飼育してキメラマウスを作製、その再生誘導筋を解析した。解析は凍結切片を免疫染色し、コンフォーカル顕微鏡で観察することにより行った。GFP はその特異抗体で、また脂肪は脂肪滴膜タンパク質ペリリピンの抗体で検出した。

## 3. 筋ジス犬の治療効果の定量的解析

本研究では赤外線エネルギーの変化を計測する運動量モニタリングシステム (Supermex®, 室町機械株式会社) を用い、以下の検討を行った。

(1) 筋ジス犬の自発運動量とグレーディングスケールによる評価との関連性の検討

1～9 歳齢の筋ジス犬(n=9)について、自発運動量測定の前5～7日前にグレーディングスケールによるスコアリングを行った。自発運動量測定は連続する5日間について行い、1日あたりの明期の合計運動量の平均値を各個体の自発運動量とし両者の相関関係について検討した。

(2) 10 週齢、1～2 歳齢の正常犬及び筋ジス犬の自発運動量の測定

10 週齢の正常犬(n=2)および筋ジス犬(n=5)、1～2 歳齢の正常犬(n=3)および筋ジス犬(n=3)について連続する5日間の自発運動量を測定した。1～2 歳齢の正常犬(n=3)および筋ジス犬(n=3)について、連続する5日間の自発運動量を測定した。またこのデータから1日ごとの合計運動量を求め、各年齢群における正常犬と筋ジス犬の24時間の運動量パターンの比較を統計学的に行った。

(3) 新規環境に対する正常犬及び筋ジス犬の反応の比較

環境変化に対する反応性を比較するために1～2 歳齢の正常犬(n=5)および筋ジス犬(n=4)を通常飼育しているケージから運動量モニタリングシステムを設置したケージに移動させ、その後2時間の運動量を測定し、正常犬と筋ジス犬の運動量パターンの比較を行った。

(4) 筋ジス犬の治療研究における運動量モニタリングシステムを用いた効果の評価

同腹の筋ジス犬(n=2)において、一方には3～10 ヶ月齢まで治療薬 X を投与した後、治療を中止した。もう一方は10 ヶ月齢までは溶媒のみを投与し、以降治療薬 X を投与した。これらの犬の自発運動量を実験 2 と同じ方法で10、11、12、13 ヶ月齢の時点で評価した。

## C. 研究成果

### 1. 筋衛星細胞の単離と遺伝子発現

O-マンノース型糖転移酵素、POMGnT1 を欠損したマウスの筋衛星細胞では同腹の野生型マウスの筋衛星細胞に比べて著しく増殖能と移動能が低下していた。

Fusion index (融合能の指標)には差がなかった。また、POMGnT1<sup>-/-</sup>筋衛星細胞にレトロウイルスで POMGnT1 cDNA を導入したところ、alpha-dystroglycan (α-DG) の糖鎖修飾が完全に回復していた。しかし、細胞増殖活性は部分的にしか回復していなかった。さらに、野生型及び POMGnT1<sup>-/-</sup>の筋衛星細胞を NOD/Scid に移植し、その効率を解析したが、GFP 陽性線維数に差はなかったが、形成される GFP 陽性筋線維の直径は野生型筋衛星細胞移植群で大きい傾向があった。

### 2. 筋再生時に出現する脂肪細胞の由来

作製した骨髄キメラマウスの再生誘導筋では GFP 陽性の骨髄由来細胞が多数検出されたが、出現した脂肪細胞に GFP が発現する様子は認められなかった。再生誘導した筋芽細胞移植筋では GFP 陽性の筋線維は少数検出された。また十分に分化していないと思われる GFP 陽性の細胞も認められた。しかしこのマウスにおいても GFP 陽性の脂肪細胞は認められなかった。一方、SP 細胞移植筋の再生では、GFP 陽性の移植細胞群が観察した前脛骨筋すべてにおいて脂肪細胞と共存する様子が認められた。共存領域を詳細に観察すると GFP 陽性の細胞質を持ち、ペリリピン陽性の油滴を含む細胞が見出された。

### 3. 筋ジス犬の治療効果の定量的解析

歩行障害のスコアは運動量と有意な相関を認めましたが、運動性のスコアでは有意差は認められなかった。また、正常犬、筋ジス犬の運動レベルは正常犬で有意に高かった。とりわけ正常犬では、ケージを交換後85分まで交換直後と同程度の運動量が維



持されたが、筋ジス犬では 40 分後に運動量の有意な低下が認められた。さらに、10 ヶ月齢の治療犬では未治療犬に比べて有意に運動量が高かったが、治療を入れ替えて 3 ヶ月後の 13 ヶ月齢では 2 頭の運動量の有意差を認めなかった。

## D. 考察

### 1. 筋衛星細胞の単離と遺伝子発現

筋衛星細胞は骨格筋の幹細胞で細胞移植治療に有効な細胞であり、筋ジストロフィーの薬物療法や遺伝子治療に於いても標的となる細胞である。我々は筋衛星細胞の糖鎖修飾がその増殖や移動に重要である事を明らかにした。しかし POMGnT1 遺伝子を導入した後、POMGnT1 ノックアウト由来の筋衛星細胞の増殖能は完全に回復しなかった。 $\alpha$ -DG の糖鎖修飾は基底膜のラミニンとの結合に重要であることから、 $\alpha$ -DG の糖鎖修飾はニッチェ（筋線維と筋基底膜の間）に於ける筋衛星細胞の幹細胞としての活性の維持にも関係する可能性が残された。

### 2. 筋再生時に出現する脂肪細胞の由来

以上の結果から、B6 マウスのグリセリン誘導による筋再生で出現する脂肪細胞のうち、その少なくとも一部は筋固有 SP 細胞に由来するものと考えられた。これまで我々は、SP 細胞が更に 3 つに分画されることを示し、そのうち CD31-/CD45-細胞は筋再生下において非常に良く増殖し、間葉系の遺伝子を発現するようになり、培養すると脂肪や骨細胞に分化し、筋芽細胞と共培養すれば筋管細胞にも分化することを見出して、グリセリン誘導による筋再生過程における脂肪細胞の出現には、筋固有 SP 細胞の関与があるものと推察された。

### 3. 筋ジス犬の治療効果の定量的解析

グレーディングによる運動性のスコアに

関しては、赤外線モニタリングによる運動量との相関を認めなかった。グレーディングでは犬は評価者が近づいたことによる反応を示すために個体の性格が評価に影響することが考えられる。運動量モニタリングシステムでは人為的な因子を除外して評価できると考えられた。筋ジス犬では 2 ヶ月齢頃から歩様異常を認めることが過去に報告されているが、今回の検討により 10 週齢群で正常犬より有意に運動量が低いことが示された。また 1~2 歳齢群では正常犬と筋ジス犬の差が大きくなっており、過去の報告による臨床症状の進行と合致することが示唆された。運動量モニタリングシステムにより症状の進行を定量的に捉えることができると考えられた。新規環境に対する反応性に関しては、正常犬に比べて筋ジス犬で早く運動量の低下を認めた。筋ジス犬の易疲労性や情緒機能の異常が考えられた。治療研究における赤外線運動量モニタリングを用いた評価に関しては、治療の有効性を示唆する結果を得た。運動量モニタリングシステムは長期的な経過観察を行う必要がある場合に優れた定量的評価法であると考えられた。

## E. 結論

### 1. 筋衛星細胞の単離と遺伝子発現

POMGnT1 は筋衛星細胞の  $\alpha$ -DG の O-マンノース型糖鎖修飾に必須であり、POMGnT1 が欠損した筋衛星細胞では増殖能と移動能が低下する事が明らかになった。また、POMGnT1 遺伝子を発現するレトロウイルスベクターは筋衛星細胞の  $\alpha$ -DG の糖鎖修飾を完全に回復し、筋衛星細胞の増殖能を部分的に回復させた。以上の結果から、 $\alpha$ -DG の糖鎖修飾が筋衛星細胞の増殖と移動に重要である事を示唆ものである。

### 2. 筋再生時に出現する脂肪細胞の由来

B6 マウスのグリセリン誘導による筋再生で出現する脂肪細胞のうち、その少なくとも一部は筋固有の SP 細胞に由来すると考えられる。

### 3. 筋ジス犬の治療効果の定量的解析

赤外線運動量モニタリングシステムは、筋ジス犬の運動機能を定量的に評価する優れた方法であると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Nishiyama A, Ampong BN, Ohshima S, Shin JH, Nakai H, Imamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Okada T, Takeda S. Recombinant adeno-associated virus type 8-mediated extensive therapeutic gene delivery into skeletal muscle of  $\alpha$ -sarcoglycan-deficient mice. Hum Gene Ther, 19, 719-730, 2008

Hijikata T, Nakamura A, Isokawa K, Imamura M, Yuasa K, Ishikawa R, Kohama K, Takeda S, Yorifuji H. Plectin 1 links intermediate filaments to costameric sarcolemma through  $\beta$ -synemin,  $\alpha$ -dystrobrevin and actin. J Cell Sci. 121, 2062-2074, 2008

Masuda-Hirata M, Suzuki A, Amano Y, Yamashita K, Ide M, Yamanaka T, Sakai M, Imamura M, Ohno S. Intracellular polarity protein PAR-1 regulates extracellular laminin assembly by regulating the dystroglycan complex. Genes Cells, 14, 835-850, 2009

### 2. 学会発表

今村道博、武田伸一：

ポリ A トラップ法により分子種特異的な C 末端構造を欠失させた  $\epsilon$ -サルコグリカンの発現

第 40 回日本発生生物学会、第 59 回日本細胞生物学会合同大会、福岡, 5.29, 2007

Imamura M, Takeda S: Analysis of allele-specific expression of the mouse  $\epsilon$ -sarcoglycan gene. 48 th American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Francisco (USA), December 15, 2008

Imamura M, Takeda S: Searching for loss of imprinting of the  $\epsilon$ - sarcoglycan gene in the cells of  $\epsilon$ -sarcoglycan partial knockout mice. 49 th American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Diego (USA), December 8, 2009

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

(代表者：出澤真理)

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
M. Dezawa et al.	Vision	R. Splinter	Handbook of Physics in Medicine and Biology	Taylor and Francis Publishing	米国	2010	10-1～10-20
出澤真理	脳神経	松島綱治・西脇徹編	炎症・再生医学事典	朝倉書店	日本	2009	
出澤真理	骨髄間葉系細胞からの骨格筋細胞の誘導	田畑泰彦編	遺伝子医学MOOK	メディカルドゥ社	大阪	2008	pp.46-49
出澤真理	骨髄間葉系細胞からの神経細胞の誘導	田畑泰彦編	遺伝子医学MOOK	メディカルドゥ社	大阪	2008	pp.54-56

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Dezawa M	Induction system of neuronal and muscle cells from bone marrow stromal cells and applications for degenerative diseases.	Inflammation and Regeneration	27(2)	96-101	2007
Shimizu S, Kitada M, Ishikawa H, Itokazu Y, Wakao S, Dezawa M	Peripheral nerve regeneration by the in vitro differentiated-human bone marrow stromal cells with Schwann cell property.	Biochem Biophys Res Commun	359	915-920	2007
Yoshihara T, Ohta M, Itokazu Y, Matsumoto N, Dezawa M, Suzuki Y, Taguchi A, Watanabe Y, Adachi Y, Ikehara S, Sugimoto H, Ide C	Administration of Bone Marrow-Driven Mononuclear Cells After Spinal Cord Injury Suppresses Cavity Formation and is Followed by Functional Recovery.	J Neurotrauma	24	1026-1036	2007
Dezawa M	Systematic neuronal and muscle induction systems in bone marrow stromal cells: the potential for tissue reconstruction in neurodegenerative and muscle degenerative diseases	Medical Molecular Morphology	41(1)	14-19	2008
Someya Y, Koda M, Dezawa M, Kadota T, Hashimoto M, Kamada T, Nishio Y, Kadota R, Mannoji C, Miyashita T, Okawa A, Yoshinaga K, Yamazaki M	Reduction of cystic cavity, promotion of axonal regeneration and sparing, and functional recovery with transplanted bone marrow stromal cell-derived Schwann cells after contusion injury to the adult rat spinal cord	J Neurosurg Spine	9(6)	600-610	2008

<u>Dezawa M</u> , Nabeshima Y-I	Transdifferentiation systems in bone marrow stromal cells and its application to muscle dystrophy: Insights into cell-based therapy	"Recent Advances of Skeletal Muscle Differentiation" in Research Signpost	-	79-92	2008
Kidata M, <u>Dezawa M</u>	Induction system of neural and muscle lineage cells from bone marrow stromal cells; a new strategy for tissue reconstruction in degenerative diseases	Histology and Histopathology	24(5)	631-642	2009
Kentaro Nagane, Masaaki Kitada, Shohei Wakao, <u>Mari Dezawa</u> , Yasuhiko Tabata, (5人中4番目 : Dezawa = correspondence)	Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells by spermine-pullulan-mediated reverse transfection method.	Tissue Engineering	15(7)	1655-65	2009
Ishikawa N, Suzuki Y, <u>Dezawa M</u> , et al	Peripheral nerve regeneration by transplantation of BMSC-derived Schwann cells as chitosan gel sponge scaffolds.	J Biomed Mater Res A	89(4)	1118-24	2009
Hayase M, Kitada M, Wakao S, et al	Committed neural progenitor cells derived from genetically modified bone marrow stromal cells ameliorate deficits in a rat model of stroke.	J Cereb Blood Flow Metab	29(8)	1409-20	2009
Makinoshima H, <u>Dezawa M</u>	Pancreatic cancer cells activate CCL5 expression in mesenchymal stromal cells through the insulin-like growth factor-I pathway.	FEBS Lett.	583 (22)	3697-703	2009
Noguchi A, Matsumura S, <u>Dezawa M</u> , et al	Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high-mass amyloid beta-protein (Abeta) assembly from Alzheimer's disease brains.	J. Biol. Chem.	284 (47)	32895-905	2009
Matsumoto N, Taguchi A, Kitayama H, et al	Transplantation of cultured choroid plexus epithelial cells via cerebrospinal fluid shows prominent neuroprotective effects against acute ischemic brain injury in the rat.	Neurosci. Lett.	-	-	In press
Shohei Wakao, Takuya Hayashi, Masaaki Kitada, et al (14人中14番目 : Dezawa = correspondence)	Long-term observation of auto-cell transplantation in non-human primate reveals safety and efficiency of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in peripheral nerve regeneration.	Exp. Neurol.	-	-	In press
国府田正雄、 <u>出澤真理</u>	骨髄間葉系細胞を用いた脊髄損傷修復の試み	脳 2 1	10(2)	144-147	2007
石川裕人、 <u>出澤真理</u>	視神経移植とは	視覚と眼球運動のすべて	-	216-221	2007

出澤真理	骨髄間葉系細胞を用いた筋ジストロフィーへの再生医療の可能性	BRAIN and NERVE-神経研究の進歩59	-	503-508	2007
出澤真理	胚葉をこえた多分化能と自己細胞移植治療への可能性	蛋白質核酸酵素シリーズ「幹細胞技術の現状と展望」	52(2)	158-165	2007
出澤真理	骨髄間葉系細胞からの神経・骨格筋系細胞の誘導	再生医療	16	19-25	2007
出澤真理	筋ジストロフィーと細胞移植治療	医学のあゆみ	226(5)	393-396	2008
出澤真理	骨髄間葉系細胞を用いた神経筋疾患治療の可能性	最新医学	63(12)	55-63	2008
北田容章, 出澤真理	神経・筋変性疾患における細胞移植治療；骨髄間葉系細胞を用いた自己細胞移植への可能性	Clin Neurosci	26	210-13	2008
出澤真理	間葉系幹細胞の分化転換	治療学	43(6)	615-8	2009
林拓也, 出澤真理	骨髄間葉系細胞を用いた自己細胞移植の可能性	日本臨床「パーキンソン病ー基礎・臨床研究のアップデートー」	67(4)	429-34	2009
出澤真理	筋ジストロフィーと細胞移植治療	ミオパチーー臨床と治療研究の最前線 楚中征哉編集	-	61-4	2009

(分担者：林 拓也)

#### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
林 拓也	神経画像法を用いた虚血性脳疾患の前臨床・臨床試験と病態把握.		循環器病研究の進歩	協和企画	東京	2008	79-86
林 拓也	骨髄間葉系細胞を用いたパーキンソン病への自己細胞移植の可能性		日本臨床増刊号：パーキンソン病ー基礎・臨床研究のアップデート	日本臨床社	大阪	2009	429-434
林 拓也	高磁場MRI	友池仁暢	循環器診療マニュアル2009年	中山書店	東京	2009	

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hayashi T	Connectivity between cortex and basal ganglia revealed by the diffusion-weighted imaging	Rinsho Shinkeigaku	47(11)	838-40	2007
Kudomi N, Watabe H, Hayashi T, Iida H	Separation of input function for rapid measurement of quantitative CMRO2 and CBF in a single PET scan with a dual tracer administration method	Phys Med Biol	52(7)	1893-908	2007
Shimamura M, Sato N, Sata M, Kurinami H, Takeuchi D, Wakayama K, et al	Delayed Postischemic Treatment With Fluvastatin Improved Cognitive Impairment After Stroke in Rats	Stroke	38(12)	3251-8	2007
Iida H, Eberl S, Kim KM, Tamura Y, Ono Y, Nakazawa M, et al	Absolute quantitation of myocardial blood flow with (201)Tl and dynamic SPECT in canine: optimisation and validation of kinetic modelling	Eur J Nucl Med Mol Imaging	35(5)	896-905	2008
Temma T, Iida H, Hayashi T, Teramoto N, Ohta Y, Kudomi N, et al	Quantification of regional myocardial oxygen metabolism in normal pigs using positron emission tomography with injectable (15)O-O (2)	Eur J Nucl Med Mol Imaging	37(2)	377-85	In press
Kudomi N, Hayashi T, Watabe H, Teramoto N, Piao R, Ose T, et al	A physiologic model for recirculation water correction in CMRO2 assessment with 15O2 inhalation PET	J Cereb Blood Flow Metab	29(2)	355-64	2009
Koshino K, Watabe H, Hasegawa S, Hayashi T, Hatazawa J, Iida H	Development of motion correction technique for cardiac 15O-water PET study using an optical motion tracking system	Ann Nucl Med	24(1)	1-11	In press
Iwanishi K, Watabe H, Hayashi T, Miyake Y, Minato K, Iida H	Influence of residual oxygen-15-labeled carbon monoxide radioactivity on cerebral blood flow and oxygen extraction fraction in a dual-tracer autoradiographic method	Ann Nucl Med	23(4)	363-71	2009
Iwanishi K, Watabe H, Fujisaki H, Hayashi T, Miyake Y, Minato K, et al	Evaluation of utility of asymmetric index for count-based oxygen extraction fraction on dual-tracer autoradiographic method for chronic unilateral brain infarction	Ann Nucl Med	23(6)	533-9	2009
Ikoma Y, Watabe H, Hayashi T, Miyake Y, Teramoto N, Minato K, et al	Measurement of density and affinity for dopamine D(2) receptors by a single positron emission tomography scan with multiple injections of [(11)C]raclopride	J Cereb Blood Flow Metab	30(3)	663-73	In press
Ikoma Y, Watabe H, Hayashi T, Miyake Y, Teramoto N, Minato K, et al	Quantitative evaluation of changes in binding potential with a simplified reference tissue model and multiple injections of [(11)C]raclopride	Neuroimage	47(4)	1639-48	In press

Dagher A, Tannenbaum B, Hayashi T, Pruessner JC, McBride D	An acute psychosocial stress enhances the neural response to smoking cues	Brain Res	129	129-348	2009
林 拓也	拡散強調画像に基づいた大脳皮質線条体の 神経線維連絡.	クリニカル ニューロサ イエンス (Clinical Neuroscience)	25(1)	31-35	2007
松原 佳亮, 渡部 浩司, 林 拓也, 飯田 秀博, 湊 光 太郎	[18F]FDOPA PET データのPatlak 解析に より推定された取り込み定数のバイアス 評価: [18F]FDOPA 代謝産物の影響	生体医工学			出版中

(分担者：田畑泰彦)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
A. Okazaki, JI. Jo, Y. Tabata.	A Reverse Transfection Technology to Genetically Engineer Adult Stem Cells.	Tissue Engineering	13(2)	245-251	2007
JI. Jo, N. Nagaya, Y. Miyahara, M. Kataoka, M. Harada- shiba, K. Kangawa, and Y. Tabata.	Transplantation of genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in Rats with Myocardial Infarction: Benefit of a Novel Nonviral Vector, Cationized Dextran.	Tissue Engineering	13(2)	313-322	2007
JI Jo , T Ikai, A Okazaki, M Yamamoto, Y Hirano, Y Tabata.	Expression profile of plasmid DNA by spermine derivatives of pullulan with different extents of spermine introduced.	J Control Release	118(3)	389-398	2007
JI. Jo, T. Ikai, A. Okazaki, K. Nagane, M. Yamamoto, Y. Hirano and Y. Tabata.	Expression profile of plasmid DNA obtained using spermine derivatives of pullulan with different molecular weights.	J. Biomater. Sci. Polymer Edn,	18(7)	883-899	2007
T. Okasora, JI. Jo, and Y. Tabata.	Augmented anti-tumor therapy through natural targetability of macrophages genetically engineered by NK4 plasmid DNA.	Gene Therapy	15,	524-530	2008

M. Nakamura, JI. Jo, Y. Tabata, and O. Ishikawa.	Controlled delivery of T-box 21 siRNA ameliorates autoimmune alopecia (alopecia areata) in C3H/HeJ mouse model	Am J Pathol.,	172(3)	650-658	2008
N. Nishishita, JI. Jo, M. Yamamoto, Y. Tabata, and Y. Hirano.	The gene transfection using cell attachment peptides for gene therapy.	Peptide Science	2007	443-446	2008
Nagane, K., Kitada, M., Wakao, S., Dezawa, M., Tabata, Y.	Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells by spermine-pullulan-mediated reverse transfection method.	Tissue Eng Part A.	15(7)	1655-1665	2009

(分担者：今村道博)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Masuda-Hirata, et al.	Intracellular polarity protein PAR-1 regulates ectracellular laminin assembly by regulating the dystroglycan complex.	Genes Cells	14	835-850	2009
Nishiyama, et al.	Recombinant adeno-associated virus type 8-mediated extensive therapeutic gene delivery into skeletal muscle of $\alpha$ -sarcoglican-deficient mice.	Hum Gene Ther	19	719-730	2008
Hijikata, et al.	Plectin 1 links intermediate filaments to costameric sarcolemma through beta-synemin, a-dystrobrevin and action.	J Cell Sci.	121	2062-2074	2008



## Peripheral nerve regeneration by the in vitro differentiated-human bone marrow stromal cells with Schwann cell property

Satoshi Shimizu, Masaaki Kitada, Hiroto Ishikawa, Yutaka Itokazu, Shohei Wakao, Mari Dezawa \*

*Department of Anatomy and Neurobiology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Yoshida-Konocho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan*

Received 20 May 2007  
Available online 8 June 2007

### Abstract

We examined the availability of human bone marrow stromal cells (MSCs) as a source of transplantation therapy in nerve injury. Human MSCs were subjected to a series of treatments with a reducing agent, retinoic acid and a combination of trophic factors. Morphologically and immunocytochemically, such treated cells differentiated into Schwann cell characteristics in vitro. Cells were filled into a transpermeable tube, transplanted into the gap made in the rat sciatic nerve of a rat and followed up to 3 weeks under the control of immunosuppressant. In contrast to untreated human MSCs, differentiated human MSCs expressed Schwann cell markers in vivo and supported regenerating axons. These results suggest that human MSCs can be induced to be a substitute for Schwann cells that may be applied for nerve regeneration.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Cell therapy; Human mesenchymal cells; Transdifferentiation; Schwann cells; Transplantation; Peripheral nerve injury; Reconstruction

Schwann cells are peripheral glial cells that ensheath axons to form myelin in the peripheral nervous system (PNS). Following nerve injury, Schwann cells lose myelin, are activated, and proliferate within the distal nerve segment to produce a variety of neurotrophic factors, cytokines, and cell adhesion molecules thereby providing the pathway for regenerating axons. This process is collectively called Wallerian degeneration [1–3]. Schwann cells also play a crucial role in the endogenous repair of PNS by reconstructing myelin which is indispensable for nerve function. They are also known to support reconstruction of the injured central nervous system (CNS) where successful axonal regeneration and functional reconstruction do not normally occur. Several experiments in the spinal cord and some other areas in the CNS have shown that either the injection or transplantation of the polymer tube filled with cultured Schwann cells improved axonal growth

across the site of injury [4–8]. For these reasons, they are one of the most widely studied cell types for the axonal regeneration both in PNS and CNS.

Even though cell-based therapy using Schwann cells seems to be effective and promising for the treatment of neurotraumatic injuries and neurodegenerative diseases, another peripheral nerve must be sacrificed for the cultivation of Schwann cells. Furthermore, technical difficulties exist in the harvesting and expansion of Schwann cells to obtain sufficient amount of cells for cell-based therapy within a reasonable time period. Therefore, it is desirable to harvest the highly proliferative cells from easily accessible sources other than PNS to produce the cells with Schwann cell characteristics.

Bone marrow stromal cells (MSCs) are mesenchymal elements normally providing structural and functional support for hemopoiesis [9,10]. The great benefits of MSCs are that they are easily accessible through aspiration of the bone marrow from patients without serious ethical problems, and can be readily expanded in large scale for

\* Corresponding author. Fax: +81 75 751 7286.

E-mail address: [dezawa@anat2.med.kyoto-u.ac.jp](mailto:dezawa@anat2.med.kyoto-u.ac.jp) (M. Dezawa).



autotransplantation. They are known to have the potential to differentiate into other kinds of cells such as osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes [11].

The main purpose of this study is to verify the possibility of human MSCs to transdifferentiate into cells with Schwann cell property and to explore their function after grafting. We show the induction of human MSCs into Schwann-like cells *in vitro* and their involvement in the axonal regeneration *in vivo*. Thus this induction system is expected to serve human MSCs alternative to Schwann cells that may be applied for auto-cell-transplantation therapy in nerve injury.

## Materials and methods

**Cell culture.** The usage of human MSCs for the experiment was approved by Kyoto University Graduate School and Faculty of Medicine, Ethics Committee. All animal experiments were approved by the Animal Care and Experimentation Committee of Kyoto University Graduate School of Medicine. Human MSCs were purchased from Cambrex (East Rutherford, NJ) and were cultured in alpha-minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM) (Sigma, St. Louis, MO) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and kanamycin at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Rat MSCs were harvested according to the former study [12]. Primary rat MSCs were isolated from the tibia and femurs of 12-week-old male Wistar rats. The marrow was extruded in  $\alpha$ -MEM with 15% FBS, 2 mM L-glutamine, and kanamycin, and incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. After 48 h, the non-adherent cells were removed by replacing the medium. MSCs were subcultured four times and finally subjected to induction. Rat Schwann cell-line was commercially obtained from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA).

**The induction of M-Schwann cells.** After subculturing at the concentration of  $1.27 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>, MSCs were incubated in  $\alpha$ -MEM containing 1 mM beta-mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) without serum for 24 h. The culture media was then replaced with  $\alpha$ -MEM containing 10% FBS and 35 ng/ml all-*trans*-retinoic acid (ATRA) (Sigma, St. Louis, MO). Three days later, cells were finally transferred to  $\alpha$ -MEM containing 10% FBS and trophic factors of 5  $\mu$ M forskolin (Calbiochem, La Jolla, CA), 10 ng/ml recombinant human basic fibroblast growth factor (Peprotech, London, UK), 5 ng/ml platelet-derived growth factor-AA (Peprotech, London, UK), and 200 ng/ml heregulin- $\beta$ 1-EGF-domain (R&D systems Minneapolis, MN) and cultured for 4–5 days. These treated MSCs were referred to as M-Schwann cells in the following text.

**Evaluation of M-Schwann cells.** M-Schwann cells were evaluated both by phase-contrast microscopic observation and immunocytochemistry. For immunocytochemistry, human MSCs and M-Schwann cells, and rat Schwann cell-line were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS). Primary antibodies used for immunocytochemistry were anti-S100 rabbit IgG (1:200, DAKO, Carpinteria, CA), anti-P0 rabbit IgG (1:300, kindly provided by Dr. J.J. Archelos, Karl-Franzens Universität, Graz, Austria), anti-p75NGF receptor mouse IgG (1:500, Abcam Cambridge, UK), anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) rabbit IgG (1:300, DAKO Carpinteria, CA), anti-L1 mouse IgG (1:100, kindly provided by Dr. Fritz Rathejen, Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg), and anti-O4 mouse IgM (1:20, Boehringer Ingelheim GmbH, Ingelheim, Germany) antibodies, and were detected by Alexa568 conjugated anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG or anti-mouse IgM antibodies (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR). Samples were incubated in 20% BlockAce (skim milk, Yukijirushi, Tokyo, Japan) in 0.005% saponin and 50 mM glycine in PBS (SaGlyPBS) for 10 min, incubated with the primary antibody in 5% BlockAce in SaGlyPBS overnight at 4 °C followed by the secondary antibody incubation in 5% BlockAce in SaGlyPBS. Nuclei were counter-stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). All images were taken by a confocal laser scan-

ning microscope (CS-1, Nikon, Kawasaki, Japan) in the same laser intensity and detection sensitivity.

**Transplantation of cells into rat sciatic nerve injury.** Prior to transplantation, both human MSCs (untreated) and human M-Schwann cells were infected with the lentivirus-green fluorescent protein (GFP) (provided by Dr. D. Trono) to label the cells as described [13], and confirmed under fluorescence microscopy that more than 95% of MSCs or M-Schwann cells expressed GFP.

Human MSCs or M-Schwann cells were suspended in matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA) at the concentration of  $1-2 \times 10^7$  cells/ml, and were filled into trans-permeable tubes (Hollow fibers, Amicon, Beverly, MA) (10 mm length) to make an artificial graft. Under general anesthesia with halothane, a 10-mm segment was completely removed from the left side of the sciatic nerve of 8-week-old male Wistar rats at the middle of the thigh. The artificial graft was anastomosed with proximal and distal nerve tips using 10-0 nylon sutures at both ends. To avoid immunorejection, intraperitoneal administration of FK506 (Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japan) was performed at 0.05 mg/kg every day for the first 2 weeks and every other day for the third week.

**Walking track analysis.** Three weeks after transplantation, walking track analysis, one of the behavioral analyses for estimation of functional recovery from the sciatic nerve injury, was performed according to the protocol reported in the past studies [14,15]. The rat's hind feet were dipped in China ink and animals were permitted to walk on a sheet of paper along a tunnel. The lengths of the third toe to its heel (PL), the first to the fifth toe (TS), and the second toe to the fourth toe (ITS) were measured with their footprints of both MSCs- and M-Schwann cells-transplanted groups. The Sciatic Function Index (SFI) in each animal was calculated by the specific formula below:

$$SFI = -38.3 \times (PL_e - PL_n)/PL_n + 109.5 \times (TS_e - TS_n)/TS_n + 13.3 \times (ITS_e - ITS_n)/ITS_n - 8.8 \text{ (e, experimental side; n, normal side).}$$

This index has been found to be both reproducible and of high sensitivity for detecting nerve dysfunction [14,15].

**Immunohistochemical analysis of transplanted grafts.** After completing walking track analysis, animals (3 weeks after transplantation) were sacrificed by an overdose of diethyl ether and perfused transcardially with periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. The left sciatic nerve including the graft was dissected and incubated in the same fixative for 6 h at 4 °C. Tissues were washed with 0.1 M PBS overnight at 4 °C, immersed in 10%, 20%, and 30% sucrose-PBS for 3 h each at 4 °C, embedded in OCT, and cut into 10- $\mu$ m-thick frozen sections by a cryostat. Primary antibodies used for immunohistochemistry were anti-neurofilament (NF) mouse IgG (1:50, Sigma, St. Louis, MO), anti-myelin-associated glycoprotein (MAG) mouse IgG (1:50, Boehringer Ingelheim), and anti-myelin basic protein (MBP) (1:500, Boehringer Ingelheim). Secondary antibodies were anti-rabbit IgG goat, mouse IgG goat or anti-mouse IgM goat antibodies conjugated to Alexa568 (Molecular Probes). The ratio of GFP-positive-transplanted cells to cells positive to MAG (including both host Schwann cells and transplanted cells) with elongated morphology was counted in a high magnification (400 $\times$ ) within the graft ( $n = 4$ ).

## Results

### Characterization of induced human M-Schwann cells

Phase-contrast microscopic observation showed the morphological changes of human MSCs during the process of induction (Fig. 1A–D). Untreated human MSCs exhibited the fibroblast-like morphology (Fig. 1A), as was similarly reported in MSCs of other species [16], while after the trophic factor treatment, MSCs finally changed into the spindle-shaped smaller cells (Fig. 1D). We have previously reported in the rat MSCs that, after treatment with the same induction protocol, differenti-



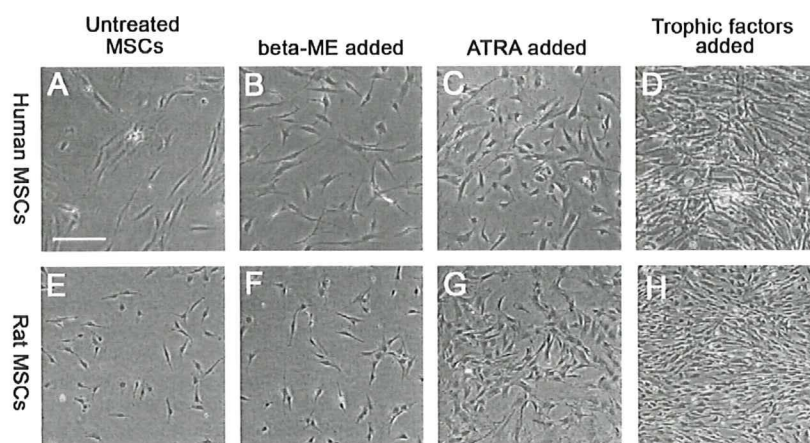


Fig. 1. Phase-contrast microscopic observation showing morphological changes of human MSCs (A–D) and rat MSCs (E–H) during the induction. The original MSCs presented the fibroblast-like morphology (A in human, E in rat). As the induction protocol proceeds, MSCs changed to spindle-shape (D in human, H in rat). Scale bar, 250  $\mu$ m.

ated MSCs were morphologically different from the original MSCs but resembled to Schwann cells derived from dorsal root ganglion and contributed to nerve regeneration and myelin reconstruction when transplanted into the injured PNS [17,18], spinal cord injury [19]. We reproduced this rat MSC experiment in this study (Fig. 1E and H) and confirmed that the rat M-Schwann cells are similar to rat Schwann cells derived from dorsal root ganglion as described (data not shown) [17]. We also compared the human MSCs system to that of the rat system, and recognized that even though the cell size of rat MSCs were smaller than those of human MSCs, the induction process was similar in both cell types (Fig. 1A–H). Immunocytochemical analysis showed that the untreated human MSCs were initially negative for Schwann cell markers of P0, p75NGF receptor, GFAP, L1, and O4 but with slight positivity for S100 (Fig. 2A–F). After the induction, human M-Schwann cells became positive for markers of P0, p75NGF receptor, GFAP, and L1 with the increased immuno-positivity to S100 (Fig. 2G–L). Positive control experiments for all these markers were performed in rat Schwann cell-line (Fig. 2M–R).

#### Morphological assessment of the grafts

The grafts were well connected with the host peripheral nerve tissue in both the human MSC-transplanted (MSC-group) and the human M-Schwann cell-transplanted (M-Schwann group) rat sciatic nerves. Anastomosis between the graft and host sciatic nerve segments remained tight, and the site of anastomosis in each graft was covered by connective tissue. Within the graft, newly formed whitish parenchymatous tissue was observed in both groups for the entire length of the graft, but the tissue of the M-Schwann group was thicker and more robust than that of the MSC-group which was fragile and weaker against tension (Fig. 3A and B).

Immunohistochemistry to NF clearly showed that a large number of regenerating axons elongated into the graft in the M-Schwann group. Additionally, some of the regenerating nerve fibers successfully reached the distal nerve segment (Fig. 3C). On the other hand, few regenerating nerve fibers were observed to cross the proximal segment that reached the graft in the MSC-group (Fig. 3D).

In the M-Schwann cell transplanted animals, nuclei of the GFP-positive transplanted cells were in elliptical shape similar to host Schwann cells, and green fluorescence of the grafted cells was typically observed as elongated in both sides, suggesting spindle-shaped morphology of the grafted cells (Fig. 4). The ratio of GFP-positive cells was only as much as  $12.6 \pm 2.98\%$  among all MAG-positive cells within the graft ( $n = 4$ ). 3D-constructed images revealed that some transplanted cells covered the regenerating axons (Fig. 4A), and expressed MAG (Fig. 4B–D) and MBP (Fig. 4E–G) with the staining intensity that was equal to or slightly weaker than that of endogenous Schwann cells.

In the case of the MSC-group, regeneration of nerve fibers was scant as described above. Phagocytosed human MSCs detected as GFP-positive-cell debris were frequently observed throughout the grafts, and neither contact between the nerve fiber and GFP-positive transplanted cells nor expression of Schwann cell markers could be recognized (data not shown). In addition, regenerating axons and endogenous Schwann cells were extremely limited (data not shown).

#### Walking track analysis

SFI in the normal rat is of the range  $-1.9 \pm 6.3$  [14]. The number of SFI was  $-85.52 \pm 2.1$  in the M-Schwann group and  $-79.12 \pm 2.1$  in the MSC-group, respectively. There was statistical difference between these indices ( $p = 0.047$ ), indicating that the M-Schwann group exhibited if not outstanding but better, functional improvement than the case of MSC-group.



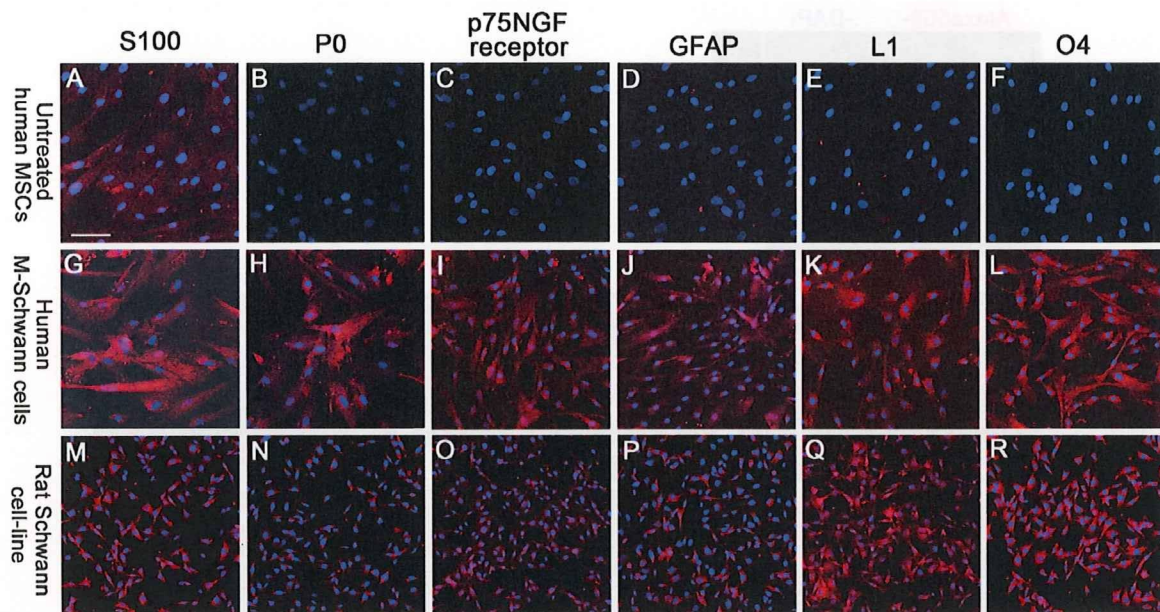


Fig. 2. Immunocytochemistry of S100 (A,G,M), P0 (B,H,N), p75NGF receptor (C,I,O), GFAP (D,J,P), L1 (E,K,Q), O4 (F,L,R) in human MSCs (A–F), human M-Schwann cells (G–L), and rat Schwann cell-line (M–R). The untreated human MSCs slightly expressed S100 (A) but were negative for other Schwann cell markers (B–F). After the induction, M-Schwann cells became positive for P0 (H), p75NGF receptor (I), GFAP (J), L1 (K), O4 antigen (L) and the immunoreactivity for S100 was upregulated (G). Rat Schwann cell-line was used as positive control for all these Schwann cell markers (M–R). Scale bar, 100 μm.

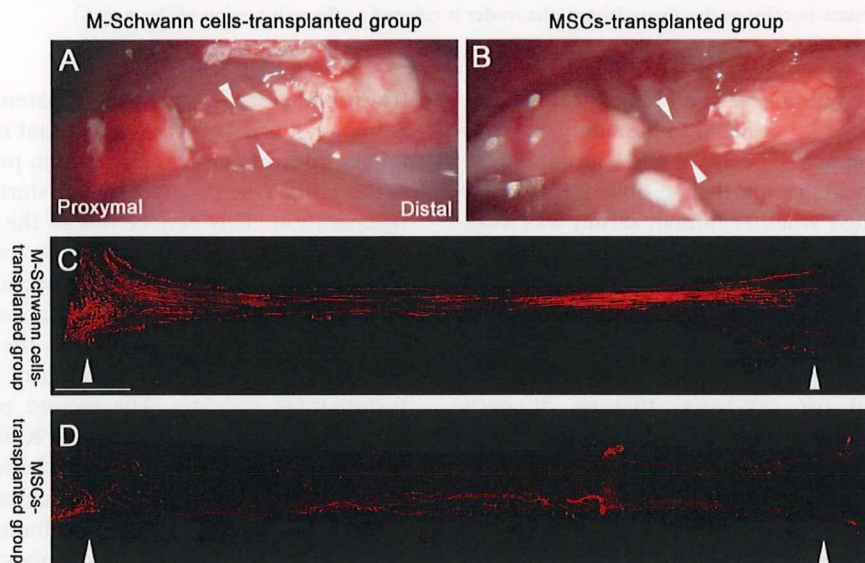


Fig. 3. Macroscopic observation of the parenchymatous tissue within the graft of M-Schwann (A) and MSC (B) groups 3 weeks after transplantation. The newly formed tissue was seen in both groups (arrowheads). The proximal segment (left) and the distal segment (right) of the sciatic nerve were indicated. Neurofilament-positive nerve fibers (red color-coded) observed in MSC (C) and M-Schwann (D) groups. Many regenerating nerve fibers were observed to enter into the graft from the proximal segment (left) and reached the distal nerve segment (right) in the M-Schwann cells-transplanted group (D). In contrast, regenerating nerve fibers were scarcely observed around the proximal segment and within the graft (D). Arrowheads showed the proximal and the distal edges of the grafts. Scale bar in C and D, 100 μm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper.)

## Discussion

This study showed a series of treatments with  $\beta$ -ME followed by retinoic acid and a certain combination of trophic

factors was able to induce the differentiation of human MSCs into cells with Schwann cell characteristics which are able to support PNS regeneration in vivo. Notably, this induction system could be achieved without gene introduc-