

厚生労働科学研究費補助金  
障害者対策総合研究事業  
(神経・筋疾患分野)

骨髄・臍帯間葉系細胞由来脳移行性シユ  
ワン細胞による脳梗塞の神経修復治療

平成 24 年度 総括研究報告書

研究代表者 松瀬 大

平成 25 年(2013 年) 5 月

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）  
（総括）研究報告書

研究課題：骨髄・臍帯間葉系細胞由来脳移行性シュワン細胞による脳梗塞の神経  
修復治療

課題番号： H24-神経・筋-若手-007

研究代表者：氏名 松瀬 大

研究施設 九州大学大学院医学研究院神経内科学・助教

研究要旨 脳梗塞は罹患率の高い疾患であり、かつ発症後の症状を改善する治療法に乏したため、多くの患者が後遺症に苦しんでいるのが現状である。そのもっとも大きな理由の一つとして、中枢神経は通常軸索再生作用がほとんどない点が挙げられる。近年脳梗塞の新たな治療法の一つとして、細胞移植治療が注目されてきている。様々な細胞を用いた脳梗塞への移植研究がなされているが、中枢神経へも軸索再生を促す細胞が有用な細胞源となりうる可能性がある。本研究では、中枢、末梢神経へ軸索再生促進作用をもたらすシュワン細胞に注目した。そのシュワン細胞を間葉系細胞から誘導することを試み、それを脳梗塞モデルへ移植する研究を行う。脳梗塞後の障害された軸索の再生を促し、神経症状を改善させる新たな治療法を確立することをめざす。

結果 8 週齢♂の Wistar Rat の骨髄間葉系細胞 (BM-MSCs) から、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 を加えることでシュワン細胞 (BM-SCs) の誘導に成功した。誘導した BM-SCs は S100 $\beta$ 、PMP22、GFAP などのシュワン細胞のマーカーを発現していた。細胞の中枢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 BM-MSCs に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。しかしその中枢移行性を調べる目的で experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) ラットを作成し、細胞を脊髄に移植したところ、生着は良好であった。中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルラットを作成し、現在のところ PBS (vehicle) (n=3)、BM-MSCs (n=5) の移植を行い、BM-MSCs 群に軽度の脳梗塞体積、神経機能の改善を認めている。今後 BM-SCs を移植し、これらの結果との比較を行う予定である。一方ヒト臍帯間葉系細胞 (UC-MSCs) についても、現在同様の方法でシュワン細胞 (UC-SCs) の誘導を確認している。今後 BM-SCs を用いた移植実験を進め、また UC-MSCs を用いた治療法の開発も進めていく予定である。

研究分担者氏名・所属研究機関名  
及び所属研究機関における職名

九州大学大学院医学研究院  
神経内科学・助教  
松瀬 大  
九州大学大学院医学研究院  
神経内科学・学術研究員  
松下 拓也  
九州大学大学院医学研究院  
神経内科学・共同研究員  
吉村 怜

#### A. 研究目的

脳梗塞は罹患率の高い疾患であり、罹患すると多くの後遺症を残し、ADLを大きく損ねることが少なくないが、発症後の症状を改善する治療法に乏しいのが現状である。過去の脳梗塞に対する細胞移植治療研究は多くなされており、機能改善を認めているものが多数見られるが、そのほとんどは機能改善の機序が明確にされていない。移植細胞もさまざまなものが使用されているが、移植した細胞そのものが失われた細胞の代わりとなって機能改善しているというよりむしろ、移植細胞の栄養効果等による改善が主である報告が少なくないと思われる。

シュワン細胞は軸索再生を促す作用を持ち、移植した場合、末梢神経だけでなく、中枢神経においても軸索の再生をサポートする。したがって、本来軸索再生能力に非常に乏しい中枢神経疾患において、シュワン細胞を用いた細胞移植治療は非常に高い可能性を持っていると思われる。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。

我々は最近、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。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っている。

本研究では、間葉系細胞からシュワン細胞を誘導し、それを脳梗塞モデルへ移植することで軸索の再生を促し、脳梗塞後の神経症状を改善させる新たな治療法を確立することを目的とする。それにより、神経細胞を外部から補充するのではなく、hostの軸索再生機能を促進することによる移植治療が可能となる。その際に移植細胞の

生着、中枢移行性についても注目し、生着性に乏しい場合として、①分子細胞生物学的手法を用いて PSA-NCAM の発現を維持させ脳移行性とする。②澤田ら（名古屋大環境医学研究所）が脳（中枢神経）移行性ミクログリアから作成した脳（中枢神経）標的化ペプチドを、間葉系細胞から分化・誘導したシュワン細胞に発現させ、脳（中枢神経）移行性シュワン細胞を作成する。③移植細胞の足場としてコラーゲンスポンジを使用する、といった方法を検討する。これらの成績をもとに、移植療法に使用可能なヒト由来の間葉系脳移行性シュワン細胞の樹立を行い、将来へのヒトへの臨床応用の基盤づくりを行う。

## 研究方法

### 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

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。その後 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。他系統の Rat として、DA Rat からも同様に BM-MSCs からの誘導を試みた。

### 2) 誘導したシュワン細胞の評価

誘導細胞は、S100β、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 S100β 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。

### 3) 中大脳動脈閉塞モデルラットに対する細胞移植

Wistar Rat（8週齢、♂）に対し、イソフルレンで麻酔後、silicon coated monofilaments (Doccol Corporation) を用い、2時間の中大脳動脈閉塞を行い、脳梗塞モデルを作成する。モデル作成後7日目に、再度イソフルレンで麻酔し、経頭蓋的にラット骨髄間葉系細胞を移植する。(細胞は1万 cells/μl で PBS で希釈。6μl を線条体[from the bregma: anterior (A) 0.0mm, right (R) + 2.0mm, ventral (V) - 4.5 mm]と、4 μl を皮質[from the bregma: A 0.0mm, R + 2.0mm, V - 2.0 mm]へ移

植する。移植細胞は、a)PBS(vehicle)群、b)BM-MSCs、c)BM-MSCs由来シュワン細胞(BM-SCs)、の3種類を準備する。移植細胞はあらかじめ緑色蛍光タンパク質(GFP)で標識しておく。

#### 4) 移植後の行動評価と組織学的評価

移植後の評価期間は35日とし、組織学的評価と機能評価を行う。機能評価として、modified limb placing test (mLPT)、Morris water maze test (MWT)を用いる。mLPTは移植後7日毎に施行。MWTは移植後31日から5日連続で施行する。

組織学的には、脳梗塞体積、移植細胞の生存率、移植細胞の発現しているマーカー (myelin associated glycoprotein(MAG)、myelin basic protein(MBP)、glial fibrillary acidic protein(GFAP)、O4、P0等を想定)、移植細胞が軸索を髄鞘化しているかという点を主に評価する。

#### 5) BM-SCsの、中枢神経生着能と軸索再生能の確認

BM-SCsの中枢神経生着能と髄鞘化作用をvivoで確認するため、別途experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)ラットを作成し、移植を行い、生着と軸索再生能について組織学的に解析する。

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 Freund adjuvant

a)とb)を1:1で混合し、ラットのテール基部に50μl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-SCs200万細胞を移植した。評価期間として移植35日後を想定しているが、一部移植7日後に安楽死させ、病巣部への移植細胞のmigrationを確認する。

#### 6) ヒト臍帯由来間葉系細胞でのシュワン細胞誘導

ヒト臍帯のWharton's jellyから間葉系細胞(UC-MSCs)を採取。1)と同様に誘導を行う。その後2)-5)を同様にを行い、ヒト臍帯間葉系細胞を用いた細胞移植方法の確立を行う。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学の倫理委員会において承認を受け、動物実験においては当施設の動物実験施設の規約およびマニュアルにそって行う。臍帯につ



いては、当院婦人科学産科学教室・総合周産期母子医療センターでの満期帝王切開症例のうち同意を得られた症例から、分娩後に本来破棄予定である臍帯の一部の提供をいただく。臍帯の提供を受ける際には、インフォームドコンセントを徹底し、書類で確認をする。また、提供者の個人情報特定できないようプライバシーの保護に十分配慮する。これらの内容はすでに九州大学の倫理委員会で承認済みである。ヒト骨髄間葉系細胞の使用に関しても、すでに九州大学の倫理委員会で承認済みである。

### C. 研究結果

1) 2) 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<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup> 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。DA Rat から同様に誘導可能であった。

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)。

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

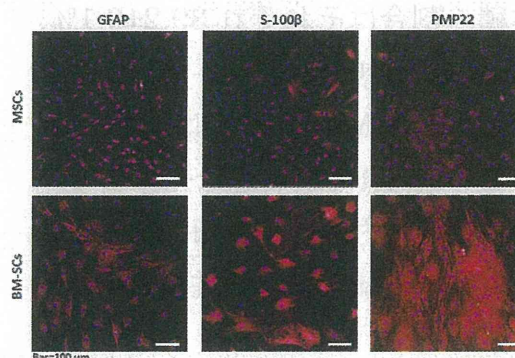


図2 BM-SCs誘導段階ごとのQ-PCRでの、S100βのmRNA発現

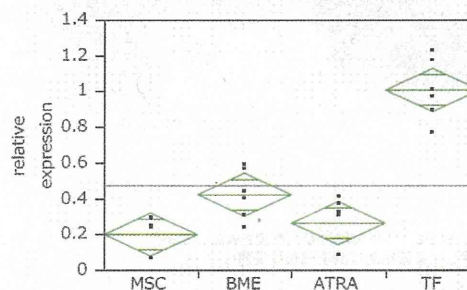
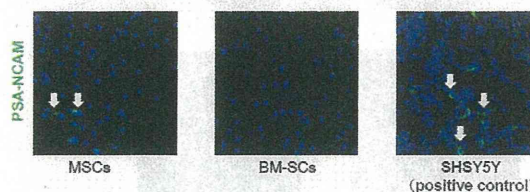


図3 DAラット骨髄間葉系細胞(MSCs)から誘導したシュワン細胞(BM-SCs)の、PSA-NCAMの発現の変化



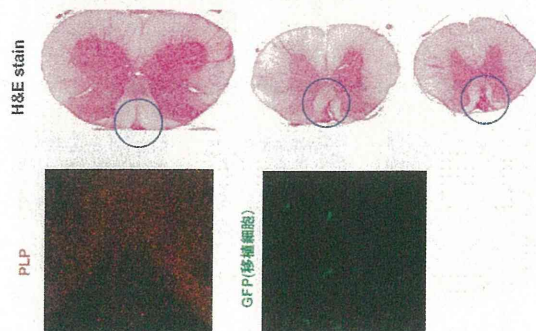


3) 4) Wistar Rat の中大脳動脈閉塞モデルに対する細胞移植は、まず PBS 群 (n=3)、BM-SCs 群(n=5)を評価。移植 35 日目の mLPT は、PBS 群、BM-SCs 群それぞれ  $6.7 \pm 0.6$ 、 $5.6 \pm 1.1$ ( $p=0.19$ )、WMT は、latency が  $93 \pm 25$ 、 $86 \pm 15$ ( $p=0.62$ )、speeding time が  $14.3 \pm 5.1$ 、 $19.4 \pm 5.1$ ( $p=0.23$ )、number of crossing が  $1.0 \pm 1.7$ 、 $1.6 \pm 1.1$ ( $p=0.77$ )であった。また脳梗塞体積は、対側大脳半球と比較した梗塞巣体積の割合はそれぞれ  $39.2 \pm 6.1\%$ 、 $33.8 \pm 5.3\%$ ( $p=0.27$ )であった (図 4)。いずれも BM-SCs 群により改善を認めたが、統計的に有意な差は出ていない。組織学的評価の詳細、ならびに BM-SCs の移植実験は現在解析中である。

図4 還流固定後脳標本のHE染色像



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浸潤していた。



5) 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。BM-SCs は PSA-NCAM の発現が誘導前より減少していたが、移植 7 日後の生着は良好であった (図 5)。

6) ヒト臍帯から間葉系細胞を採取し、3 代継代培養。  $3.81 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> 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  $\mu$ 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 P0 や S100 $\beta$ 、Krox20 等を発現していた (図 6)。

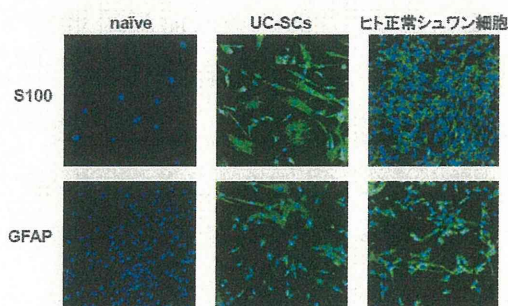


図6 臍帯間葉系細胞から誘導したシュワン細胞(UC-SCs)は、シュワン細胞のマーカーを発現していた

#### D. 考察

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不可欠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。

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有用性が高く、臍帯間葉系細胞は採取に信州を伴わないため多くのドナーが期待でき、特に自己細胞が使用できない場

合の細胞バンクを利用した移植治療システムへの応用に期待が大きい。

上記の理由から、本研究の臨床応用の可能性、見込まれる成果は非常に大きいと思われる。移植実験については現在施行途中であるが、MSCsのみを移植した群はPBS群を比較して神経機能や脳梗塞体積などが改善しているものの、今のところ統計的に有意な差は認めていない。MSCsについても、神経保護効果や栄養因子の効果が言われているが、効果の程度は動物の個体差によって不明瞭になる程度のレベルかもしれない。誘導シュワン細胞の移植実験を次に行うことで、誘導することの優位性を確認したい。なお、今のところ誘導したシュワン細胞は、PSA-NCAMの発現が落ちているにもかかわらず、ある程度の中枢神経生着能を有することが示唆されているが、1) レトロウィルスベクターを用いた遺伝子導入法により、PSA-NCAMの発現を維持させた誘導シュワン細胞の作成、2) 澤田らのグループ（名古屋大環境医学研究所）より、脳移行性ペプチドを発現できる融合タンパク質ベクターの供与を受け、脳移行性ペプチドを誘導シュワン細胞に発現させる、3) 移植細胞の足場としてコーゲンスポンジを使用する、といった、中枢神経移行性、生着性を高める操作も行っていく予定である。



## E. 結論

ラット (Wistar、DA) 骨髄間葉系細胞、ヒト臍帯間葉系細胞からそれぞれシュワン細胞を誘導し、シュワン細胞特異的なマーカーの発現も確認した。移植実験については現在施行途中であるが、MSCs のみを移植した群は PBS 群を比較して神経機能や脳梗塞体積における改善は、今のところ統計的に有意なレベルではない。誘導シュワン細胞の移植実験を次に行うことで、誘導することの優位性に関して確認していく予定である。また移植細胞の中枢神経移行性、生着性を高める操作についても検討を進めて行く。

なし。

3. その他  
なし。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

現在のところ該当なし

### 2. 学会発表

- 1) 松瀬大、北田容章、若尾昌平、小濱みさき、田畑泰彦、出澤真理、吉良潤一：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 2013.5.23 東京。

## G 知的所有権の取得状況

### 1. 特許所得

なし。

### 2. 実用新案登録

