

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 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 松瀬 大

平成 26 年(2014 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目指す。

結果 8週齢♂のWistar Ratの骨髄間葉系細胞(BM-MSCs)から、種々の因子を加えることでシュワン細胞(BM-SCs)が誘導されたことを確認した。その中枢移行能と軸索再生作用を調べる目的で experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) ラットを作成し、細胞移植したところ、生着は認められたが、BM-SCs群とBM-MSCs群との定量的な比較は困難であった。次にCuprizoneを使用した脱髄モデルラットを作成し、同様に移植を試みたが、脱髄層が小さく、やはり定量的な評価が困難であった。そこで、Ethidium bromideを脊髄に局注し、局所の脱髄モデルを作成し、細胞を脱髄部に局注しての評価をすすめている。局所脱髄モデルに対する、移植細胞の生着、軸索再生能、機能改善、組織学的改善について評価し、BM-SCsの優位性を示し、そののちに中大脳動脈閉塞(MCAO)モデルラットを作成し、脳梗塞への本細胞の移植治療効果について評価を進める。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を使用されているが、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。中枢神経系での軸索

再生能を証明するために、まず中枢性の脱髄モデルを作成し、そこに誘導したシュワン細胞を移植し、機能的、組織学的改善、軸索再生の評価を行う。また、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 (Docol 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-SCs、c)BM-SCs 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、中枢性の脱髄モデルラットを作成した。モデルとしては、

i) experimental autoimmune

encephalomyelitis (EAE) ラット

ii) Cuprizone による脱髄ラット

iii) Ethidium bromide による脱髄ラット

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。

i) EAE 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-SCs を 200 万細胞移植した。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。

ii) Cuprizone による脱髄ラットは、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 200 万細胞移植して評価した。105 日齢で安楽死させ、組織評価を行った。

iii) Ethidium bromide (EB) による脱髄ラットは、8週齢の Wistar Rat に対し、Th10 レベルに 0.3 mg/ml の EB を 3 μ l 局注。7 日後に Wistar Rat 由来の BM-SCs を 200 万細胞移植して評価した。

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、提供者の個人情報が入り込ま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

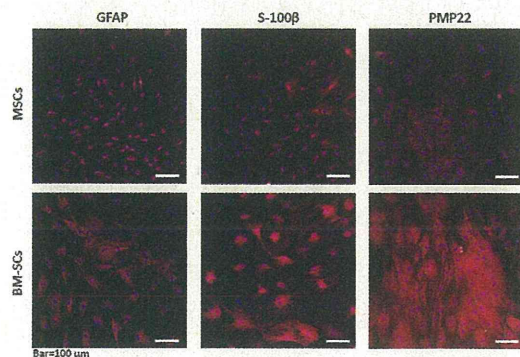
しても、すでに九州大学の倫理委員会で承認済みである。

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 $\times 10^3$ 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。DA Rat から同様に誘導可能であった。

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

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



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

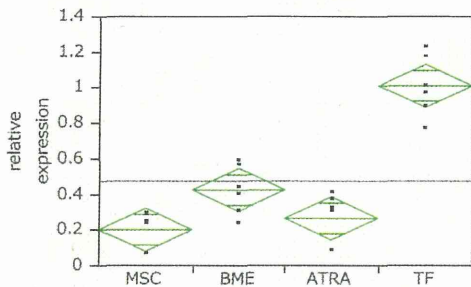
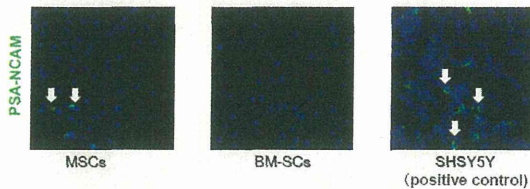


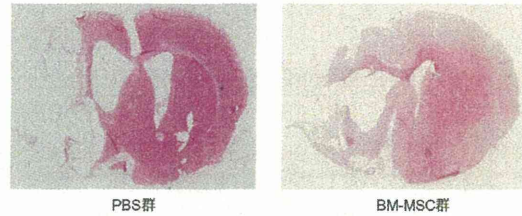
図3 DAラット骨髄間葉系細胞 (MSCs) から誘導した シュワン細胞 (BM-SCs) の、PSA-NCAM の発現の変化



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-MSCs 群(n=5)を評価。移植 35 日目の mLPT は、PBS 群、BM-MSCs 群それぞれ 6.7 ± 0.6 、 5.6 ± 1.1 ($p=0.19$)、WMT は、latency が 93 ± 25 、 86 ± 15 ($p=0.62$)、speding time が 14.3 ± 5.1 、 19.4 ± 5.1 ($p=0.23$)、number of crossing が 1.0 ± 1.7 、 1.6 ± 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)。

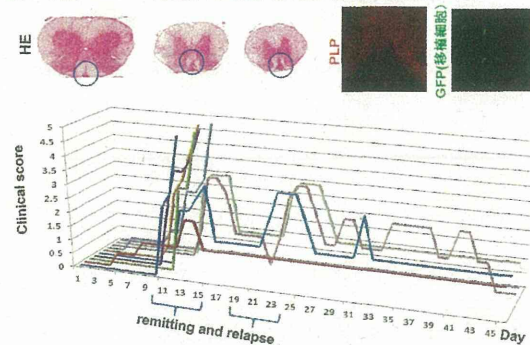
いずれも BM-MSCs 群により改善を認めたが、統計的に有意な差は出ていない。組織学的評価の詳細、ならびに BM-SCs の移植実験は現在解析中である。

図4 還流固定後脳標本のHE染色像



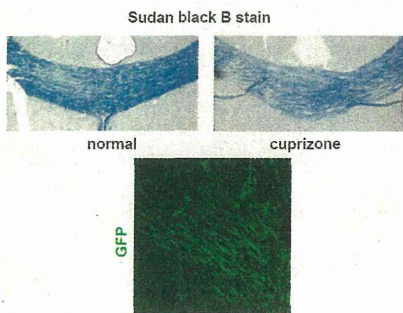
5) i)EAE モデルは、脊髄に長大病変が認められ、PLP 染色などで脱髄が確認された。移植細胞も、脊髄へ生着はしていたが、長大病変であり、また clinical score も変動の個体差があり、定量的な移植治療効果の判定が困難であった (図 5)。

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が、組織学的、機能的な定量的評価が困難であった。



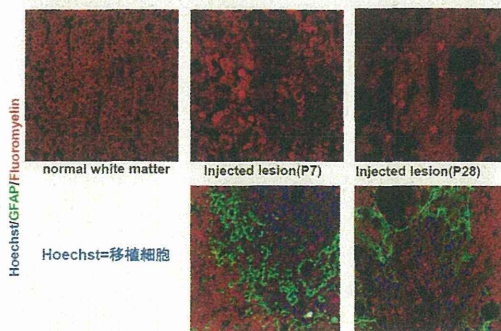
ii) cuprizone モデルは、脳梁部位を中心に脱髄病巣ができ、またコントロール群と体重差も認めた (図 6)。しかし脱髄部位が微小であり、正確な注入や定量的評価がやはり困難であると判断した。

図6 Cuprizoneモデルは脳梁を中心に脱髄病巣を作成しており、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。



iii)toxic モデルとして、EB による脱髄モデルを作成した。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ることが確認された(図7)。(toxic モデルとして Lysolecithin による脱髄モデルも検討したが、脱髄病巣が EB に比較し軽度であった)。注入28日後でも依然脱髄巣は認めており(図7)、脱髄モデルとして、EB モデルを採用することとした。移植1週間後には、GFAP 陽性細胞に乏しい領域を中心に分布し、4週間後では fluoromyelin 陽性構造が移植部位付近に増加しており、細胞移植による再髄鞘化の促進が示唆された(図7)。

図7 EBモデルは持続性の脱髄病巣を作り、移植細胞はGFAP陽性細胞の乏しい部位を中心に生着。28日後にFluoromyelin陽性構造の増加を認めた。



6) ヒト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 P0 や S100 β 、Krox20 等を発現していた(図8)。

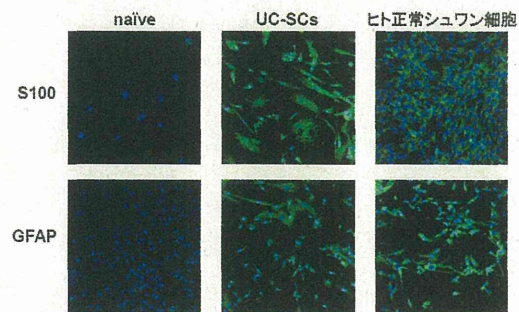


図8 臍帯間葉系細胞から誘導したシュワン細胞(UC-SCs)は、シュワン細胞のマーカーを発現していた

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侵襲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。

現在移植実験を施行中であるが、本研究で注目している間葉系細胞由来シュワン細胞の重要な意義の一つは、中枢性軸索の再生促進作用である。そ

の確認のために、まず中枢性の脱髄モデルを作成し、それに対する移植実験を行って評価すべく、実験を進めている。モデルとして EAE、cuprizone、lysolecithin などを試したが、EB によるモデルが評価に最適と考え、移植実験を進めている。現在のところ、移植細胞の生着と、移植後の fluoromyelin 陽性構造の改善が認められており、コントも定量的な評価も含め、行っていく。その後、誘導シュワン細胞の脳梗塞モデルに対する移植実験を行う方針。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ラ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、誘導シュワン細胞の中枢性軸索の再生促進作用を確認するため、EBによる中枢性脱髄モデルを作成し、移植実験を行っている。現在のところ移植細胞の生着と、移植後のfluoromyelin 陽性構造の改善が認められており、定量的な評価も含め、引き続き行っていく。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hayashi T, Wakao S, Kitada M, Ose T, Watabe H, Kuroda Y, Mitsunaga K, Matsuse D, Shigemoto T, Ito A, Ikeda H, Fukuyama H, Onoe H, Tabata Y, Dezawa M. Autologous mesenchymal stem cell-derived dopaminergic neurons function in parkinsonian macaques. J Clin Invest 2013;123:272-284.

2) Aizawa-Kohama M, Endo T, Kitada M, Wakao S, Sumiyoshi A, Matsuse D, Kuroda Y, Morita T, Jorge J. Riera, Kawashima R, Tominaga T, Dezawa M. Transplantation of bone marrow stromal cells-derived neural precursor cells ameliorates deficits in a rat model of

complete spinal cord transection. Cell Transplant 2013;22:1613-25.

3) Furuya T, Hashimoto M, Koda M, Murata A, Okawa A, Dezawa M, Matsuse D, Tabata Y, Takahashi K, Yamazaki M. Treatment with basic fibroblast growth factor-incorporated gelatin hydrogel does not exacerbate mechanical allodynia after spinal cord contusion injury in rats. J Spinal Cord Med 2013;36:134-9.

2. 学会発表

なし

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

なし。

3. その他

なし。

