

201419093A

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 26 年度 総括研究報告書

研究代表者 松瀬 大

平成 27 年(2015 年) 5 月

目次

I. 総括研究報告書	1
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	
松瀬 大 (九州大学大学院医学研究院神経内科学)	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	11

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いため、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し、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。また、脱髄疾患、パーキンソン病といった、他の神経疾患に対しても同細胞の移植治療を行い、神経疾患全般に対する本細胞の移植治療法の確立を試みる。

結果 ラット骨髄間葉系細胞(BM-MSCs)からシュワン細胞(BM-SCs)を誘導し、シュワン細胞特異的なマーカーの発現を確認した。中大脳動脈閉塞（MCAO）モデルラット、Ethidium bromide 注入による脊髄局所脱髄モデルラット、6-OHDA 注入によるパーキンソン病脱髄モデルラットに対する移植実験をそれぞれ行った。しかしいずれのモデルでもこれまでのところ、個体差はあるものの、全体としては有意な機能改善、組織学的改善が得られなかった。移植細胞動態を解析したところ、誘導したシュワン細胞の中枢神経系への生着能が非常に低く、移植後数週間で生体内から排除されている所見が確認された。また移植後早期に、移植臓器内で確認された移植細胞も、シュワン細胞のマーカーを発現していない、あるいは発現を低下させている所見が得られ、間葉系細胞から誘導されたシュワン細胞は、少なくとも今回の実験系においては移植後シュワン細胞としての性質、機能を失っている可能性も示唆された。

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
臨床神経免疫学・准教授

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。脳梗塞モデルとしては、中大脳動脈閉塞モデル(MCAO)

を用い、局所へ細胞移植することにより、治療効果の評価を行う。また、中枢神経系での軸索再生能を証明するために、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。

今年度は、前年度に引き続いて脳梗塞モデル、中枢性脱髄モデルへの移植実験を試みるとともに、パーキンソン病モデルに対する移植実験も行い、中枢神経疾患全般に対する、間葉系細胞由来シュワン細胞の移植法樹立を行い、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) ラット骨髄間葉系細胞からシュワン細胞の誘導

すでに報告しているように、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行った。

誘導細胞は、S100 β 、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 S100 β 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。移植に際して、当初レンチウイルスによる緑色蛍光タンパク質(GFP)標識と、Hoechst による標識を当初試みていたが、GFP の標識率の低さと、Hoechst 標識の信頼性の問題が生じたため、GFP ラット (Wistar) を購入し、その大腿骨、脛骨から BM-MSCs を採取。それから誘導した BM-SCs を用い、移植実験を行った。

2) 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した。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した。細胞は1万 cells/ μ l を PBS で希釈。6 μ l を線条体 [from the bregma: anterior (A) 0.0mm, right (R) + 2.0mm, ventral (V) - 4.5 mm] と、4 μ l を皮質 [from the bregma: A 0.0mm, R + 2.0mm, V - 2.0 mm] へ移植した。移植細胞は、PBS(vehicle)群、BM-MSCs 由来シュワン細胞 (BM-SCs)、を準備。移植細胞は GFP

ラット由来のため、すでに GFP で標識されている。

移植後の評価期間は当初 2-3 か月を予定していたが、35 日時点で一旦評価を行うこととした。機能評価として、modified limb placing test (mLPT) を用いる。mLPT は移植後 7 日毎に施行する。

組織学的には、脳梗塞体積、移植細胞の生存率をまず確認。移植細胞が確認されれば、移植細胞の発現しているマーカーを確認し、移植細胞がシュワン細胞の性質を維持できているか等について評価する。

3) 脊髄局所脱髄モデルラットに対する細胞移植

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、また、中枢性の脱髄疾患に対する本治療法の有効性を確認するため、脊髄局所脱髄モデルラットを作成した。モデルとしては、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した。

Ethidium bromide (EB) による脱髄ラットは、Wistar Rat (8 週齢、♂) に対し、イソフルレンで麻酔後、laminectomy を行い、脊髄後面を露出。Th10 レベルに 0.3 mg/ml の EB を 3 μ l 局注。モデル作成 7 日後に、EB 注

入部位に Wistar Rat 由来の BM-SCs を 2×10^5 /2 μ lPBS で移植した。評価方法としては、本モデルは明らかな下肢麻痺などの機能低下を来しにくく、行動評価は困難であったため、組織学的な評価を行った。組織学的には、脱髄巢体積、移植部位周辺の NF 陽性軸索数、移植細胞の生存率を評価した。NF 陽性軸索数については、正常組織境界から 50 μ m 部位の NF 陽性軸索密度を測定し、コントロールとしての PBS 移植群(n=6)と BM-SC 移植群(n=6)で比較した。移植細胞が確認されれば、移植細胞の発現しているマーカーを確認し、移植細胞がシュワン細胞の性質を維持できているか、host の軸索の再髄鞘化を行っているか等について評価する。

4) パーキンソンモデルラットに対する細胞移植

275-290g の Wistar rat (♂) に対し、イソフルレンで麻酔後 6-OHDA 12 μ g (dissolved in 4 μ l of 0.9% saline containing 0.02% vitamin C) を線条体 (4.8mm PA, 1.8mm right lateral, 7.8mm ventral from bregma) へ注入することで作成。6 週後、アポモルフィン誘発回転運動を施行し、1 分間に 10 回転以上の個体をモデルとして選択。同部位へ細胞を移植 (1×10^5 cells/2 μ l PBS)。行動評価は、週

に1回のアポモルフィン誘発回転運動で評価。PBS移植群(n=3)とBM-SC群(n=6)とで比較した。また、移植細胞の発現しているマーカーを確認し、移植細胞がシュワン細胞の性質を維持できているか、hostのTH陽性細胞の増加を来しているか等について評価する。

(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。

C. 研究結果

1) ラット骨髄間葉系細胞からシュワン細胞の誘導

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。2.86×10³ 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 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。

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)。

図1 ラット骨髄間葉系細胞(BM-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

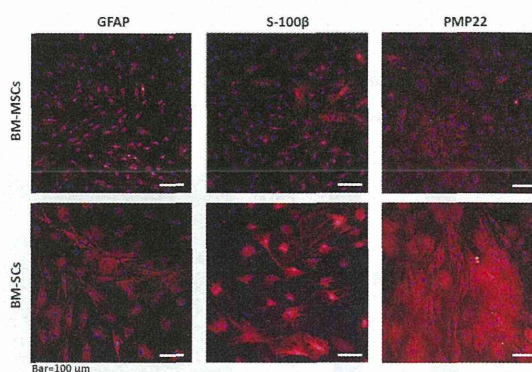
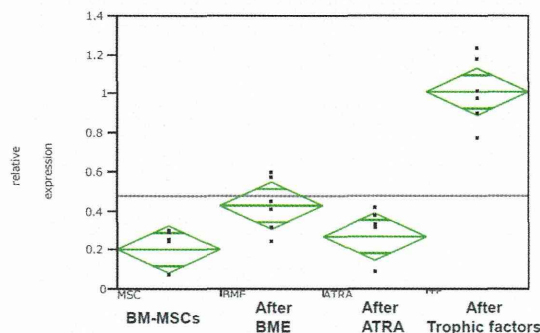


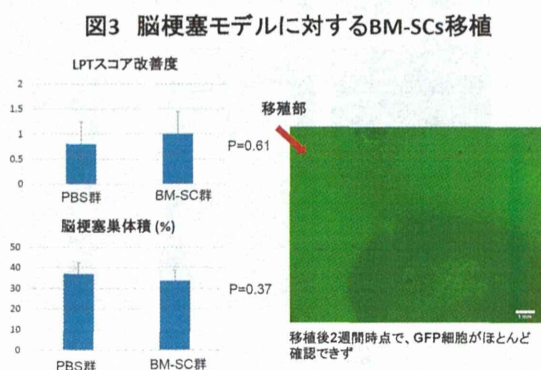
図2 BM-SCs誘導段階ごとのQ-PCRでの、S100βのmRNA発現



2) 中大脳動脈閉塞モデルラットに対する細胞移植

Wistar Ratの中大脳動脈閉塞モデルに対する細胞移植は、移植35日目におけるPBS群(n=5)、BM-SCs群(n=5)を評価。移植35日目のmLPTの改善度は、PBS群、BM-SCs群それぞれ0.8±0.4、1.0±0.7 (p=0.61)、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単体積の割合はそれぞれ37.0±5.3%、33.6±5.2%(p=0.37)、であった(図3)。いずれも平均値として

はBM-SCs群により改善を認めたが、統計的に有意な差は示せなかった。移植5週以降での評価を予定していたが、組織学的には移植2週後の時点で、すでにGFP陽性の移植細胞は確認できなかった(図3)。



3) 脊髄局所脱髄モデルラットに対する細胞移植

EB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たことが確認された。移植部位近辺では、ミクログリア(Iba1陽性)の浸潤、反応性、アストロサイト(GFAP陽性)の増加といったグリオシスの所見が観察された(図4)。移植細胞は、移植7日後には生着しているように見えるものの、28日後までにはGFP陽性細胞が確認できない状態になっており、移植細胞はグリオシスを起こして排除されていると考えられた(図4)。また、移植7日後に移植細胞を染色したところ、P0、PM22、S100といったシュワン細胞のマーカを発現していない、あるいは

低下させていた(図5)。また、移植部位付近のNF陽性軸索もPBS群 $43.3 \pm 9.9/10^{-8}mm^2$ に対し、BM-SC群 $48.7 \pm 4.6/10^{-8}mm^2$ ($p=0.26$) と、明らかな増加傾向を認めなかった(図6)。

図4 EBを用いた脱髄モデルへのBM-SCs移植

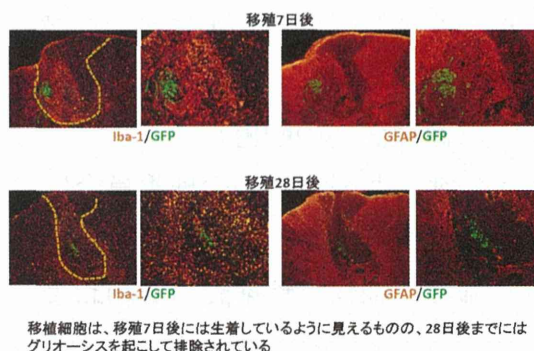


図5 移植後MSC-SCsのシュワン細胞のマーカ

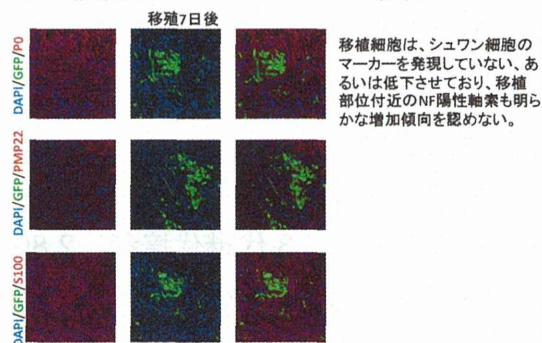
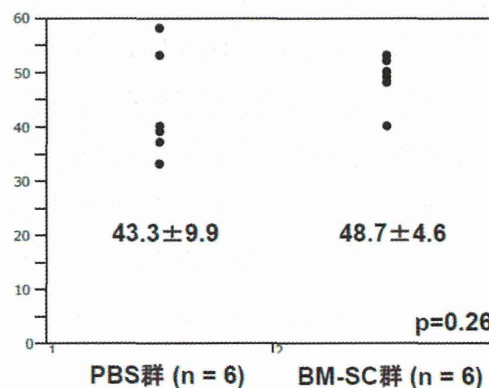


図6 移植部位周辺のNF陽性軸索密度
($/10^{-8}mm^2$)



4) パーキンソンモデルラットに対する細胞移植

移植後7日ごとに、アポモルフィン誘発回転運動による行動評価を行った。個体によっては移植後回転運動の改善を認めたが、全体としてはむしろ増悪の経過をとった。移植後4週間での回転運動の増減は、PBS群 1.7 ± 1.5 、BM-SC群 2.5 ± 1.5 ($p=0.47$)と、コントロールと比べても数値上はより増加する結果となり、有意差を認めなかった(図7)。また、組織学的には、移植28日後ではGFP陽性細胞を認めず、移植7日目は移植細胞を確認できたが、移植細胞は、シュワン細胞のマーカーを発現していない、あるいは低下させていた(図8)。

図7 アポモルフィン誘発回転運動の変化(回)

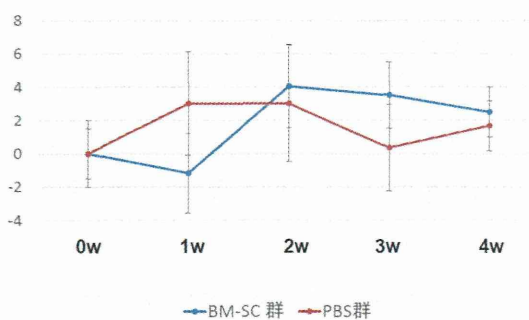
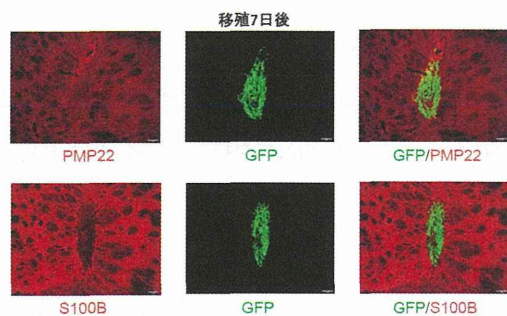


図8 移植後BM-SCsのシュワン細胞のマーカー



移植28日後ではGFP陽性細胞を認めず、移植7日目は移植細胞確認できたが、移植細胞は、シュワン細胞のマーカーを発現していない、あるいは低下させていた。

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。したがって本研究では、間葉系細胞をソースにシュワン細胞を誘導し、その軸先再生作用や trophic effect による中枢神経疾患の治療方法確立を目指した。

本研究では、中枢神経疾患モデルとして、MCAO モデル、EB による脊髄脱髄モデル、6-OHDA によるパーキンソン病モデルを作成し、それぞれ移植実験を行った。前年度までは移植細胞をレンチウイルスにて GFP を標識し、また Hoechst による標識も行っていた。しかし、GFP の標識率が低く、移植細胞の動態の評価が不十分であった。また脱髄モデルに関して、BM-SCs 移植群において Hoechst 陽性細胞周囲の再髄鞘化が示唆される所見が一部得られていたが、移植細胞近辺の host 細胞の一部にも Hoechst で染色されている所見が見られ、標識の信頼性の問題が生じた。したがって、最終的には GFP ラットを入手し、その BM-MSCs から誘導したシュワン細胞を使用することとした。

しかし移植実験では、脳梗塞モデル、脱髄モデル、パーキンソン病モデルいずれにおいても、移植群において明ら

かな機能改善、組織学的な改善を認めなかった。移植細胞は、移植後 1 週間程度は生着していることが確認されたが、その後徐々に生体内から排除され、約 4 週間には確認できないレベルになっていることが判明した。脱髄モデルでの実験では、Iba1 陽性のミクログリアの浸潤、GFAP 陽性の反応性アストロサイトの増加といったグリオシスの所見が観察され、移植細胞がグリオシスを起こして排除されている可能性が示唆された。Trophic effect の可能性についても、脳梗塞モデル、パーキンソン病モデルで明らかな行動評価の改善が見られず、脱髄モデルにおいても、NF 陽性軸索数の有意な増加を認めなかった。

本研究での問題点は、移植細胞の生着能が非常に低かったことと、移植細胞が移植後にシュワン細胞の性質を失っている可能性が示唆されたことである。厚生労働省科学研究費としての期間は終了したが、引き続きこれらの問題点の解明、解決方法について検討を続けていきたい。移植細胞の生着に関しては、まずは免疫抑制剤使用による生着能の改善が得られるかを試みたい。また、1) レトロウイ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検討していきたい。

移植後シュワン細胞の性質を失う可能性については、生着能の改善を得たのちに、移植後のシュワン細胞マーカー発現の推移を詳細に検討する。少なくとも末梢神経へ移植された際にはシュワン細胞の性質を維持することが確認されているが、中枢神経の部位や疾患の種類についても違いがあるかを検証する。本来シュワン細胞が存在しない部位でのシュワン細胞性質の維持が難しい可能性もあり、必要に応じて HRG など、シュワン細胞分化に関する因子の徐放剤併用なども検討する。

E. 結論

ラット骨髄間葉系細胞から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を確認した。脳梗塞モデル、脊髄局所脱髄モデル、パーキンソン病モデルラットに対して病変部に細胞移植を行い、治療を試みた。しかしいずれのモデルでもこれまでのところ、有意な機能改善、組織学的改善が得られなかった。原因としては、

誘導したシュワン細胞の中枢神経系への生着能が非常に低かったことが考えられた。また、移植細胞が移植後にシュワン細胞としての機能を失っている可能性も示唆された。この2点を改善させていくことが、今後の研究課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wakao S, Matsuse D, Dezawa M. Mesenchymal Stem Cells as a Source of Schwann Cells: Their Anticipated Use in Peripheral Nerve Regeneration. Cells, tissues, organs. 2015; DOI: 10.1159/000368188.
- 2) Ogata H, Matsuse D, Yamasaki R, Kawamura N, Matsushita T, Yonekawa T, Hirokuni M, Murai H, Kira J. A nationwide survey of combined central and peripheral demyelination in Japan. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2015; DOI: 10.1136/jnnp-2014-309831.
- 3) Song Z, Yamasaki R, Kawano Y, Sato S, Masaki K, Yoshimura S, Matsuse D, Murai H, Matsushita T, Kira J. Peripheral blood T cell dynamics predict relapse in multiple sclerosis patients on fingolimod. PLoS One. (in press).

2. 総説

- 1) 松瀬大, 緒方英紀, 吉良潤一. 免疫性神経疾患 III. 中枢・末梢連合脱髄症 3. 中枢・末梢連合脱髄症の病態・診断・治療. 日本臨牀, (印刷中) .
- 2) 松瀬大, 吉良潤一. 多発性硬化症のフィンゴリモド療法. Minds 多発性硬化症トピックス, 2014.
- 3) 松瀬大, 吉良潤一. 診療ガイドライン UP-TO-DATE2014-2015 中枢神経疾患 多発性硬化症・視神経脊髄炎. メディカルレビュー社, 2014 ; 524-529.

3. 学会発表

松瀬大. 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. 厚生労働科学研究(障害者対策総合研究推進事業(精神障害、神経・筋疾患分野)) 研究成果等普及啓発事業 研究成果発表会. 2015年2月5日. 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
なし。
3. その他
なし。

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
松瀬大, 緒方英紀, 吉良潤一	中枢・末梢連合脱髄症の病態・診断・治療.		免疫性神経疾患 III.	日本臨牀	東京	2015	印刷中
松瀬大, 吉良潤一	多発性硬化症のフィンゴリモド療法		多発性硬化症トピックス	Minds	東京	2014	Web公開
松瀬大, 吉良潤一	中枢神経疾患多発性硬化症・視神経脊髄炎.		診療ガイドラインUP-TO-DATE2014-2015	メディカルレビュー社	東京	2014	524-529

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
Wakao S, <u>Matsuse D</u> , Dezawa M.	Mesenchymal Stem Cells as a Source of Schwann Cells: Their Anticipated Use in Peripheral Nerve Regeneration.	<i>Cells Tissues Organisms</i>		DOI: 10.1159/000368188	2015
Ogata H, <u>Matsuse D</u> , Yamasaki R, Kawamura N, <u>Matsushita T</u> , Yonekawa T, Hirokawa T, Murai H, Kira J	A nationwide survey of combined central and peripheral demyelination in Japan.	<i>J Neurol Neurosurg Psychiatry</i>		DOI: 10.1136/jnnp-2014-309831.	2015
Song Z, Yamasaki R, Kawano Y, Sato S, Masaki K, Yoshimura S, <u>Matsuse D</u> , Murai H, <u>Matsushita T</u> , Kira J.	Peripheral blood T cell dynamics predict relapse in multiple sclerosis patients on fingolimod.	<i>PLoS One</i>		DOI: 10.1371/journal.pone.0124923	2014

