

脊髄損傷に対する骨髄間質細胞 (BMSCs)
移植治療法の検討

小 田 康 喬

2013

目次

序論	・・・4
参考文献	・・・9
第一章 脊髄損傷モデルマウスに対するイヌ骨髄間質細胞（BMSCs）移植の効果	・・・14
緒言	・・・15
材料と方法	・・・18
結果	・・・25
考察	・・・27
参考文献	・・・33
図・表	・・・37
第二章 イヌ由来骨髄間質細胞（BMSCs）を用いた神経様細胞の評価	・・・46
諸言	・・・47
材料と方法	・・・49
結果	・・・54

考察	・・・56
参考文献	・・・60
図・表	・・・66
第三章 脊髄損傷モデルマウスを用いた骨髄間質細胞（BMSCs）移植と	
ポリエチレングリコール（PEG）投与治療法の効果	・・・70
緒言	・・・71
材料と方法	・・・73
結果	・・・79
考察	・・・81
参考文献	・・・85
図・表	・・・91
総合考察	・・・96
謝辞	・・・100

序論

脊髄損傷疾患に対するこれまでの研究

成体の脳や脊髄が損傷した場合に中枢神経は修復しないという考えは、今日否定されつつある。近年、成体中枢神経組織には、ニューロンおよびグリア細胞を新規に生み出す能力を持った神経幹細胞または神経前駆細胞が残存することが明らかになった。しかし、このような神経前駆細胞が内在するにもかかわらず、損傷を受けた脊髄組織中ではニューロンの新生は観察されていない。

一般的に、末梢神経が損傷した場合には、神経細胞は癒合し良好な再生が得られる。末梢神経の軸索はシュワン細胞に囲まれ、さらにシュワン細胞の表面は基底膜に裏打ちされている。基底膜の外側には神経内膜があり、内膜はコラーゲン線維に富んだ結合組織である。末梢神経が再生する際、再生軸索は残存しているシュワン細胞を足掛かりとして伸長する。あるいはマクロファージによるシュワン細胞索の貪食後も基底膜や神経内膜は残存し、再生軸索はこの基底膜を支持組織として伸長していく。

いっぽう、中枢神経である脊髄の軸索はグリア細胞によって覆われており結合組織は存在しない。さらに、中枢グリア細胞であるアストロサイトやオリゴデンドロサイトはシュワン細胞と異なり、再生軸索の伸長を補助する機能を有していない。このように脊髄では再生する軸索を支持する周囲の細胞や足場が欠落していることが、再生が起こりにくい要

因の一つと考えられている。また、オリゴデンドロサイトが産生するミエリン関連タンパク、脊髄損傷後に形成される瘢痕組織やアストロサイトから産生される細胞外マトリックス分子は軸索伸展阻害因子と呼ばれ、それらが中枢神経の軸索伸展を阻害していると考えられている。

これらの中枢神経の特徴から、中枢神経を機能的に再建するための効果的な治療法の一つとして、失われたニューロンを外部から補填するという方法が挙げられる。これまで脊髄損傷(SCI: spinal cord injury)の治療において、神経幹細胞[9]、シュワン細胞[17]、嗅神経鞘細胞[6,15]、骨髄間質細胞(BMSCs)[20]などが脊髄神経再生を促す移植材料として長年研究がなされてきたにもかかわらず、重度の不全麻痺の治療はいまだに困難である。

様々なタイプの細胞が SCI の治療に試されてきたが、ES 細胞(embryonic neural stem cells)の胎児由来や胚性の幹細胞を用いた移植法はその分化能から期待されている[18]。しかし、倫理上の問題、移植技術、免疫拒絶反応、腫瘍化、費用、ドナー不足など臨床応用に至るまでには未だ多くの問題を抱えているので、すぐに臨床応用できる移植細胞源ではない[2,20]。

骨髄間質細胞 (BMSCs: bone marrow stromal cells) とは

BMSCs は骨髄細胞中の血球系細胞を除いた接着系細胞に属し[20]、イヌ BMSCs は容易に識別でき、増殖も可能である[12]。BMSCs が臨床的に優れている点として、自己移植できること、培養が低コストで可能なことおよび腫瘍化するリスクが非常に低いことである[20]。

さらに、BMSCs は骨[1,12]、軟骨組織[14]、脂肪[1]、筋肉[23]、神経[10,24]に分化することが報告されている。近年、人医療ならびに獣医療においても脊髄再生医療に BMSCs が臨床応用され始め、良好な結果を導き出している[11,19,21,22]。移植された BMSCs は、神経栄養因子を産生する、あるいは移植先の組織に取り込まれ融合し、その効果を発揮すると報告されている[4,5]。しかし、他の研究では、BMSCs 移植治療はわずかな機能回復効果しかなかったとするものや[8]、ラットの胸髄挫傷に対して、効果がなかったとするものもある[25]。したがって、現段階での BMSCs の移植効果には限界があり、臨床応用するにはさらなる研究が必要であり、改善の余地が大いにある。

BMSCs の神経分化誘導

BMSCs は外胚葉由来である神経細胞にも分化可能であるという考えから、近年、*in vitro* において BMSCs を神経細胞へと分化誘導させたという研究が数多く報告されている[10,24]。しかし、分化誘導を行うための培地に添加する物質、分化誘導に要する時間、手技は各研究によって様々であり、分化誘導された神経様細胞の形態や発現する神経マーカーも一様ではない。このように、BMSCs の神経細胞への分化誘導は未だ確立されたものではない。また、分化誘導後の神経様 BMSCs を移植に用いたという *in vivo* での報告は *in vitro* での分化誘導の研究報告に比べて極めて少ない。Pedram らはバルーンカテーテルによる胸部脊髄損傷ラットに対して、神経細胞への分化誘導を行った自己ラット神経様 BMSCs を移植したところ、BMSCs 単独移植群よりも神経様 BMSCs 移植または BMSCs と神経様 BMSCs の併

用移植群のほうが、有意にラットの運動機能を回復させていたことから、BMSCs を神経様細胞に分化誘導させた細胞移植法の方が、より治療効果を高めることが期待されている。

脊髄損傷に対するポリエチレングリコール（PEG）を用いた治療法

ポリエチレングリコール(PEG)投与は、げっ歯類の脊髄疾患において有効な治療法であると報告されている[3,7,16]。PEG は、損傷を受けた細胞膜を機械的に修復し、脊髄損傷の急性期に脊髄の二次損傷を軽減する効果があり[3,7,16]、受傷早期における治療でコルチコステロイド治療に代わる治療として注目されている。脊髄損傷の慢性期における外科的介入は、さらなる脊髄損傷を招く危険性があるため、症状を悪化させる可能性がある。このため急性期の外傷を防ぐ目的で神経保護剤は臨床的に有意義であると思われるが、細胞移植治療と神経保護剤を同一実験系で確認した報告はない。したがって、ヒト、げっ歯類のBMSCs 移植、PEG 投与の研究に基づいて、我々は、これらの単独治療に比べ、BMSCs 移植と PEG 投与の併用によって脊髄神経再生が良好な結果を示すのではないかと仮説をたてた。

以上のことを踏まえ、第一章では、脊髄損傷モデルマウスを作製し、犬の BMSCs を脊髄損傷モデルに移植することで中枢神経の機能的再建に対する犬の骨髄由来細胞の効果の検討を行った。第二章では、現在までに数多く報告された神経様細胞への BMSCs 分化誘導の研究の中から、3種類の分化誘導プロトコルを用いてイヌ BMSCs の神経様細胞(NLCs)への分化誘導を行い、各プロトコルを比較検討した。第三章では、BMSCs 移植と PEG 投

与時の脊髄損傷部位におけるニューロンおよびアストロサイトの分布変化を検索するとともに、各種治療が脊髄損傷マウスの運動機能に及ぼす効果を比較検討した。

参考文献

1. Beresford, J.N., Bennett, J.H., Devlin, C., Leboy, P.S. and Owen, M.E. 1992. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J. Cell Sci.* **102** (Pt 2): 341-351.
2. Björklund, A. and Lindvall, O. 2000. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat. Neurosci.* **3**: 537-544.
3. Borgens, R. B., Shi, R. and Bohnert, D. 2002. Behavioral recovery from spinal cord injury following delayed application of polyethylene glycol. *J. Exp. Biol.* **205**: 1-12.
4. Chiba, Y., Kuroda, S., Shichinohe, H., Hokari, M., Osanai, T., Maruichi, K., Yano, S., Hida, K. and Iwasaki, Y. 2010. Synergistic effects of bone marrow stromal cells and a Rho kinase (ROCK) inhibitor, fasudil on axon regeneration in rat spinal cord injury. *Neuropathology* **30**: 241-250.
5. Chopp, M., Zhang, X.H., Li, Y., Wang, L., Chen, J., Lu, D., Lu, M. and Rosenblum, M. 2000. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* **11**: 3001-3005.
6. Doucette, R. 1995. Olfactory ensheathing cells: potential for glial cell transplantation into areas of CNS injury. *Histol. Histopathol.* **10**: 503-507.

7. Duerstock, B. S. and Borgens, R. B. 2002. Three-dimensional morphometry of spinal cord injury following polyethylene glycol treatment. *J. Exp. Biol.* **205**: 13-24.
8. Himes, B.T., Neuhuber, B., Coleman, C., Kushner, R., Swanger, S.A., Kopen, G.C., Wagner, J., Shumsky, J.S. and Fischer, I. 2006. Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord. *Neurorehabil Neural Repair* **20**: 278-296.
9. Iwashita, Y., Kawaguchi, S. and Murata, M. 1994. Restoration of function by replacement of spinal cord segments in the rat. *Nature* **367**: 167-170.
10. Jiang, J., Lv, Z., Gu, Y., Li, J., Xu, L., Xu, W., Lu, J. and Xu, J. 2010. Adult rat mesenchymal stem cells differentiate into neuronal-like phenotype and express a variety of neuro-regulatory molecules in vitro. *Neurosci. Res.* **66**: 46-52.
11. Jung, D.I., Ha, J., Kang, B.T., Kim, J.W., Quan, F.S., Lee, J.H., Woo, E.J. and Park, H.M. 2009. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *J. Neurol. Sci.* **285**: 67-77.
12. Kadiyala, S., Young, R.G., Thiede, M.A. and Bruder, S.P. 1997. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* **6**: 125-134.

13. Kamishina, H., Deng, J., Oji, T., Cheeseman, J.A. and Clemmons, R.M. 2006. Expression of neural markers on bone marrow-derived canine mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* **67**: 1921-1928.
14. Lennon, D.P., Haynesworth, S.E., Young, R.G., Dennis, J.E. and Caplan, A.I. 1995. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* **219**: 211-222.
15. Li, Y., Field, P.M. and Raisman, G. 1997. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science* **277**: 2000-2002.
16. Liu-Snyder, P., Logan, M. P., Shi, R., Smith, D. T. and Borgens, R. B. 2007. Neuroprotection from secondary injury by polyethylene glycol requires its internalization. *J. Exp. Biol.* **210**: 1455-1462.
17. Martin, D., Robe, P., Franzen, R., Delrée, P., Schoenen, J., Stevenaert, A. and Moonen, G. 1996. Effects of Schwann cell transplantation in a contusion model of rat spinal cord injury. *J. Neurosci. Res.* **45**: 588-597.
18. McDonald, J.W., Liu, X.Z., Qu, Y., Liu, S., Mickey, S.K., Turetsky, D., Gottlieb, D.I. and Choi, D.W. 1999. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat. Med.* **5**: 1410-1412.

19. Nishida, H., Nakayama, M., Tanaka, H., Kitamura, M., Hatoya, S., Sugiura, K., Suzuki, Y., Ide, C. and Inaba, T. 2011. Evaluation of transplantation of autologous bone marrow stromal cells into the cerebrospinal fluid for treatment of chronic spinal cord injury in dogs. *Am. J. Vet. Res.* **72**: 1118-1123.
20. Ohta, M., Suzuki, Y., Noda, T., Ejiri, Y., Dezawa, M., Kataoka, K., Chou, H., Ishikawa, N., Matsumoto, N., Iwashita, Y., Mizuta, E., Kuno, S. and Ide, C. 2004. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp. Neurol.* **187**: 266-278.
21. Saito, F., Nakatani, T., Iwase, M., Maeda, Y., Hirakawa, A., Murao, Y., Suzuki, Y., Onodera, R., Fukushima, M. and Ide, C. 2008. Spinal cord injury treatment with intrathecal autologous bone marrow stromal cell transplantation: the first clinical trial case report. *J. Trauma.* **64**: 53-59.
22. Saito, F., Nakatani, T., Iwase, M., Maeda, Y., Murao, Y., Suzuki, Y., Fukushima, M. and Ide, C. 2012. Administration of cultured autologous bone marrow stromal cells into cerebrospinal fluid in spinal injury patients: a pilot study. *Restor. Neurol. Neurosci.* **30**: 127-136.
23. Wakitani, S., Saito, T. and Caplan, A.I. 1995. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* **18**: 1417-1426.

24. Yang, Q., Mu, J., Li, Q., Li, A., Zeng, Z., Yang, J., Zhang, X., Tang, J. and Xie, P. 2008. A simple and efficient method for deriving neurospheres from bone marrow stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **372**: 520-524.
25. Yoshihara, H., Shumsky, J.S., Neuhuber, B., Otsuka, T., Fischer, I. and Murray, M. 2006. Combining motor training with transplantation of rat bone marrow stromal cells does not improve repair or recovery in rats with thoracic contusion injuries. *Brain Res.* **1119**: 65-75.

第一章

脊髄損傷モデルマウスに対するイヌ骨髄間質細胞（BMSCs）移植の効果

緒言

従来、成体哺乳類の脊髄や脳といった中枢神経は障害を受けると再生不能であると考えられてきていた。しかし、再生医療が今後の新しい医療技術、先端医療として期待を集め、急速に発展を続け、従来の考えは否定されつつある。近年、ラットや人でも成体中枢神経系において神経細胞は次々と新生し、さらには新しく回路に組み込まれ、新たな神経回路網として機能することが明らかになってきた。Iwashita らは 1~2 日齢の新生ラットの胸髄に 1.5~2 髄節分の切除手術を行い、その切除部分に胎生 14~16 日齢の胎仔ラットから摘出した相同部髄節を移植する実験を行った。その結果、組織学的に境界を同定できないほどの癒合が認められ、細胞標識を用いた観察から移植髄節を超えて上行性・下行性に神経伝導路が形成されていること、この伝導路を電気生理学的に調査すると正常と同様の活動性を示すことがわかった[7]。

一般的に末梢神経は損傷してもその後、癒合して良好な再生を知られている。これは組織学的に末梢神経の軸索はシュワン細胞に囲まれ、さらにシュワン細胞の表面は基底膜に裏打ちされている。基底膜の外側には神経内膜があり、コラーゲン線維に富んだ結合組織である。末梢神経が再生する際、再生軸索は残存しているシュワン細胞を足がかりとして伸長していく。あるいはマクロファージによるシュワン細胞索の貪食後も基底膜や神経内膜は残存し、再生軸索はこの基底膜を支持組織として伸長していく。一方、中枢神経である

脊髄の軸索はグリア細胞によって覆われており、結合組織が存在しない。また、中枢グリア細胞であるアストロサイトやオリゴデンドロサイトはシュワン細胞と異なり、再生軸索の伸長を補助する機能を有していない。このように脊髄は再生する軸索を支持する周囲の細胞や足場が欠落しているため、再生が起こりにくい要因の一つと考えられている。また、オリゴデンドロサイトが産生するミエリン関連蛋白、脊髄損傷後に形成される瘢痕組織やアストロサイトから産生される細胞外マトリックス分子は軸索伸展阻害因子と呼ばれ、それらが中枢神経の軸索伸展を阻害していると考えられている。このことから ES 細胞[13]、シュワン細胞[12]や嗅神経鞘細胞[10]を移植することで脊髄再生を誘導する研究が報告されている。

ところが臨床的な応用を実施する上で種々の問題を解決する必要がある。それは胎児組織使用に伴う倫理問題、他家移植に起因する拒絶問題などである。これらを解決しうる神経分化能を持つ自己移植可能な細胞のひとつに間葉系幹細胞が挙げられる。現在、間葉系幹細胞を特異的に識別するマーカーが見つかっていないため、間葉系幹細胞のみを使用することは事実上、困難である。また、間葉系幹細胞の由来や性質にはまだ不明な点も多い。そこで現段階では間葉系幹細胞を含んだ亜集団という意味で骨髄間質細胞(以下、BMSCs)が研究に用いられている。BMSCs は骨髄細胞中の血球系細胞を除いた接着系細胞に属し、通常は主に血球系細胞の増殖分化の調節を担っているとされている。しかし、近年の研究によって培養条件によって骨芽細胞や脂肪細胞への分化[2]、さらに外胚葉由来であ

る神経細胞への分化が起こることがわかってきた[8]。BMSCsは骨髄中の全単核細胞の0.001～0.01%しか含んでいないと言われる[4]。しかし、BMSCsは採取・培養が容易であり、必要量を確保しやすいという利点を有している。また、BMSCsを用いた脊髄損傷モデルに対してその効果の有効性も数多く報告されている。WuらはNYU-weight-drop deviceを用いた胸髄損傷ラットモデルを作製し、損傷直後に損傷部へラット由来BMSCsを移植する実験を行い、4週間程度で脊髄が組織学的に修復されることと運動機能が回復することを報告している[18]。

獣医臨床の現場において脊髄疾患に遭遇する機会は数多い。交通事故による外傷、近年の軟骨異栄養性犬種の人気に伴う椎間板ヘルニアなどによる脊髄損傷などが多く見受けられる。そこで将来的な獣医臨床への応用を視野に入れて犬のBMSCsを用いた中枢神経再生効果を検討することは有意義であると思われる。しかし、近年の動物愛護の意識の高まりから獣医臨床への応用のために犬の脊髄損傷モデルの作製は困難である。イヌのBMSCsのマウスへの移植実験の報告は未だなく本研究では自己免疫不全マウスを用いて行うこととした。本研究の目的は自己免疫不全マウスによる脊髄損傷モデルを作製し、イヌのBMSCsを脊髄損傷モデルに移植することで中枢神経の機能的再建に対する犬の骨髄由来細胞の効果を明らかにする事である。また、遺伝子構成が同一であるマウスを使用することで純粋なcontrol群を構成でき、細胞移植による効果を示しやすいと考えた。

材料と方法

供試動物

細胞移植に用いた細胞の採材には健常ビーグル犬(13 ヶ月齢～8 歳齢、♂)を用いた。ビーグル犬をプロポフォル 7mg/kg で導入し、イソフルラン 1.5MAC で維持した。鎮痛薬としてブトルファノール(0.2mg/kg, IM)を使用した。採材後、麻酔から覚醒させた。

脊髄損傷マウスは移植細胞の動態検索においては ICR マウス (8 週齢、BW : 30g、♀8 匹) を使用した。運動機能評価においてはリンパ球系が欠損しているスキッドマウス (9～14 週齢、BW : 20g、♀20 匹) を使用した。

BMSCs の培養

健常ビーグル犬の上腕骨骨頭、大腿骨大転子から麻酔下にて骨髓穿刺針 (13G アキュラ バイオプシーシステム、スーガン株式会社、大阪市) (図 1)を髄腔に向けて刺入させた。ヘパリン 1ml 入りシリンジにて吸引して骨髓液を採取した。BMSCs の培養法についてはラット由来 BMSCs の培養法を参照した[4]。

DMEM 培地の組成は Fetal Bovine Serum (10%;FBS,GIBCO,Invitrogen), Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM/F12,GIBCO,Invitrogen), ストレプトマイシン 50 μ g/ml, アンホテリシン 2.5 μ g/ml で作製した。

採取した骨髓液を無菌的に DMEM 培地に播種して 37°C、5%CO₂ のインキュベーター内に静置した。血球、浮遊細胞を除去する目的で播種 2 日後、その後は 3 日ごとに培地を交換した。細胞が培養皿の 70~80% をしめた時点でトリプシン処理による継代を行った (図 2)。

4 継代目の BMSCs は、CD44 および CD90 の表面抗原は陽性、CD45 の表面抗原は陰性であり、BMSCs とみなした。

移植細胞の標識

細胞移植に先立ち、移植細胞は核をビスベンズイミダゾール色素、細胞質をカルボシアニリン蛍光色素で標識した。4 継代目の BMSCs を培養したフラスコ上の培養液を捨て、PBS で洗浄した後、5ml の DMEM/F12、2.5 μ l の Hoechst33258、25 μ l の DiI (Vybrant DiI cell-labelling solution、Molecular Probes、Invitrogen) を加え、37°C、5%CO₂ で 20 分間静置した。染色液を捨て FBS 添加 DMEM/F12 で 3 回洗浄した。洗浄後は 37°C、5%CO₂ で 30 分間静置してから 2 \times 10⁵ cells/ μ l に調整し、トリプシン処理後、移植に用いた。

外科的手技

8 匹の ICR マウスを用いて以下のような手技で脊髄損傷モデルを作製した。実体顕微鏡下で背側正中切開により第 12 胸椎へアプローチし、棘突起を切除した。その後、電動式骨外科用ドリル (オサダサクセス-40M、長田電機工業株式会社、東京) を用いて背側椎弓切除

を行い、脊髄を露出した。11号メスにて脊髄を完全切断した(図3)。その後、標識した犬由来 BMSC を 2×10^5 cells/ μ l に調整した細胞懸濁液 3 μ l を脊髄損傷部位に注入した。注入は Hamilton syringe(Hamilton Company, NV, U.S.A.)を垂直に刺入させて注入した。その後、定法通りに縫合した。術後7日目で凍結組織標本作製のためにそれぞれ2匹ずつ採材を行った。

凍結組織標本の作製

ペントバルビタール(ソムノペンチル、共立製薬株式会社、東京)を50mg/kgで腹腔内投与して深麻酔下で開胸し灌流固定を行った。先端を鈍にした翼状針(23G:Nipro)を心尖部(左心室)より刺入して生理食塩水を注入した。右心耳を鉗にて切断して放血を行った。続いてザンボニ液を流して灌流を実施した。マウスの手足が黄色に変化して硬直したことを確認後、脊椎のみを取り出してザンボニ液(和光純薬株式会社、大阪)に24時間、浸漬させた。生理食塩水に1~2時間浸漬した後、取り出した。脊椎から脊髄を露出させて病変部位頭尾側約1cmで取り出した。

脊髄を生理食塩水に1~2時間浸漬させた後、脊髄を取り出した。クリオモルド(株式会社テックモルド、大阪府)に脊髄を対角線に静置してドライアイスで冷却しながらOCTコンパウンド(株式会社テックランド、大阪府)で包埋した。その後、 -80°C にて冷却保存した。クリオスタット法により、脊髄を矢状断で10 μ mに薄切してAPSコート付きスライ

ドガラスに付着させてドライヤーにて 30 分間、風乾させた。そして、それらをローダミン色素(549-565nm)、UV(358-461nm)の光を当てて蛍光顕微鏡で観察した。

DNA の抽出と PCR による Sry 遺伝子の検出

(組織の採取)

術後 4 週間の移植 ICR マウス 1 匹 (♀、10 週齢) をペントバルビタール (ソムノペンチル、共立製薬株式会社、東京) 50mg/kg にて深麻酔後、粉碎した氷の上において 4°C を保ちながらそれぞれ頸髄、病変部位の胸髄、腰髄の 3 箇所を 25mg 以上採取した。その後、マウスは安楽死を行った。サンプルをエッペンチューブに入れて 4°C に保った。

(DNA の抽出)

DNA の抽出には QLAamp DNA Mini Kit(株式会社キアゲン、東京都中央区)を使用した。

露出した脊髄を細かくカットし、1.5ml マイクロチューブに Buffer ATL180µl を添加し

た。Proteinase K 20µl を添加後、ボルテックスし、組織が完全に溶解するまで 56°C でインキ

ュベートした。サンプルを拡散させるため、時々ボルテックスを行った。その後、1.5ml

マイクロチューブを数秒間スピンドウンして蓋の内側についた溶液を収集した。200µl の

Buffer AL をサンプルに添加後、15 秒間ボルテックスし、70°C 10 分間インキュベートした。

1.5ml マイクロチューブを数秒間スピンドウンして蓋の内側についた溶液を回収した。エタノール（96～100%）200 μ l をサンプルに添加し、再び 15 秒間ボルテックスした後、1.5ml マイクロチューブを数秒間スピンドウンして蓋の内側に付いた溶液を回収した。その後、この混合液をカラムの縁を濡らさないように注意して QLAamp Spin Column に注入し、キャップを閉めて 8000rpm で 1 分間遠心分離した。QIAamp Spin Column を新しい 2ml コレクションチューブに移し、濾液の入っているチューブを捨てた。注意深く QLAamp Spin Column を開き、カラムの縁を濡らさないように 500 μ l の Buffer AW1 を添加した。キャップを閉めて 8000rpm で 1 分間遠心した。QIAamp Spin Column を新しい 2ml コレクションチューブに移し、濾液の入っているコレクションチューブは捨てた。注意深く QIAamp Spin Column を開き、カラムの縁を濡らすことなく 500 μ l の Buffer AW2 を添加し、キャップを閉めて 20000rpm で 3 分間遠心した。QIAamp Spin Column を新しい 1.5ml マイクロチューブに移し、濾液の入っているコレクションチューブは捨てた。注意深く QIAamp Spin Column を開き、Buffer AE 200 μ l を添加した。室温で 1 分間インキュベート後、8000rpm で 1 分間遠心分離した。

（吸光度測定）

各サンプルの DNA 濃度の測定のために吸光度測定器 (Gene Qutro pro RNA/DNA Calculator、Amersham Pharmacia、Cambridge,UK) を用いた。Control 群は Elution Buffer(Buffer AE) 50 μ l

と超純水 50 μ l の計 100 μ l とした。頸髄、胸髄、腰髄の各サンプル（以下、順不同で C,T,L）50 μ l と超純水 50 μ l の計 100 μ l とした。吸光度測定器で得られた各サンプルの DNA 濃度から PCR 時に均等な濃度になるようにサンプルの濃度を調整した。

(PCR)

PCR を行うために試薬を調整した。10 \times ExTaq Buffer 100 μ l、dNTP₂(2.5mM) 80 μ l、MgCl₂(25M) 80 μ l、DEPC 240 μ l を混合させて 2 \times ExTaq Buffer 500 μ l を作製した。また 2 \times ExTaq Buffer 30 μ l、10 μ M Primer SRY-s 1.2 μ l、10 μ M Primer SRY-As 1.2 μ l、ExTaq 0.3 μ l、超純水 24.3 μ l を混合させて計 57 μ l とした。これを均等に 19.0 μ l ずつに分注した。C：抽出した gDNA 1 μ l T：抽出した gDNA 0.6 μ l と超純水 0.4 μ l L：抽出した gDNA 0.8 μ l と超純水 0.2 μ l をそれぞれ 2 \times ExTaq Buffer 19 μ l に混ぜて計 20 μ l とした。PCR には Program temp. control system PC-701 (株式会社アステック、福岡県)を用いた。95 $^{\circ}$ C 30 秒間、56 $^{\circ}$ C 30 秒間、72 $^{\circ}$ C 30 秒間を 1 サイクルとして計 35 サイクルを行った(表 1、2)。

SCI 急性期スキッドマウスに対する犬由来 BMSC 移植による運動機能の評価

外科的手技

20 匹のスキッドマウスを用いて前述と同様に脊髄損傷モデルを作製した。control 群は 9 匹、移植群が 11 匹とした。移植群は 5×10^5 cells/ μ l に調整した細胞懸濁液 計 3 μ l を損傷部位、

損傷部位の頭尾側の計3カ所に各1 μ lずつ注入した。注入は前述と同様な手技で行った。SCIマウスは1個体ずつ自由採食、自由給水可能な滅菌ケージ内で飼育し、術後2週間は1日2回の圧迫排尿をクリーンベンチ内で行った。ケージ、おが屑、飼料、水はすべてオートクレーブによる滅菌済みを用いた。

運動機能評価

運動機能の指標としてBassoらのBasso-Beattie-Bresnahan (BBB) Locomotor Rating Scaleを参照した(表3)。これは0から21までの数値で後肢の運動機能をスコアリングするもので、その数値をBBBスコアとした。圧迫排尿により膀胱内を空にした後、クリーンベンチ内で1頭ずつ自由空間において観察してスコアリングした。左後肢、右後肢各々で評価を行い、その平均をその個体のBBBスコアとした。スコアリングはSCI直前、1日目、4日目、7日目でその後は1週間ごと28日後まで行った。

統計処理

統計処理はノンパラメトリックな手法としてMann-Whitney検定を用いた。有意水準を0.05%としてそれ未満であれば有意差ありと判定した。

結果

移植細胞の動態検索

術後 7 日後の脊髄の病変部位と思われた部位にローダミン、UV を照射し両方ともが発色している部位を確認した。それらは病変部よりも頭側に多く存在していた。しかし、これらの発色部位は特定部位に集中しておらず、病変部周囲で全体的に分散していた。

また、ローダミンの照射において病変部周囲の広範囲に渡ってカルボシアニン色素が強く発色している部位が観察された(図 4)。この部位はUV照射を行っても Hoechst33342 が発色しなかった。病変部から離れた頭側、尾側の脊髄の部位ではローダミン、UV の照射によって発色が見られた部位は少なく、移植 1 週間の時点において発色部位は病変部周囲に多く存在していた。

PCR による Sry 遺伝子の検出

イヌ Sry 遺伝子の PCR 産物の長さは 267bp であり、ポジティブコントロールであるイヌ gDNA(♂)において確かにこの付近にバンドが確認された。頸髄由来サンプルのバンドは全く検出されなかった。それに対して病変部由来サンプルではバンドがイヌ gDNA(♂)と同様な位置に検出された(図 5)。

SCI 急性期スキッドマウスの移植細胞による運動機能回復評価

11 号メスにて脊髄の完全切断を行ったはずだが覚醒直後において control 群、移植群ともに後肢の完全麻痺を起こしている個体はおらず、術後 1 日目において BBB スコアは control 群において 6.6 ± 4.8 (mean \pm SD)、移植群において 10.0 ± 4.3 であった。

control 群においても時間経過とともに運動機能の自然改善が個体差あるものが見られた。BBB スコアは術後 4 日目で 9.6 ± 4.8 、術後 7 日目で 8.6 ± 4.3 、術後 14 日目で 8.9 ± 3.7 、術後 21 日目で 11.1 ± 3.7 、術後 28 日目において 12 ± 4.4 であった。スコアの上昇は術後 1 日目から 4 日目までの上昇幅が最も大きかった。術後 4 日目から術後 14 日目まではスコアの上昇があまり見られず、21 日目以降に上昇を始めた。

移植群においても時間経過とともに運動機能の改善が見られた。術後 1 日目でスコアは 10.0 ± 4.3 であった。その後も一貫して上昇した。術後 4 日目で 10.8 ± 4.3 、術後 7 日目で 12.3 ± 3.9 、術後 14 日目で 14.3 ± 3.6 、術後 21 日目において 15.8 ± 2.5 であった。術後 28 日目においてスコアの上昇はやや鈍化し、 16.0 ± 2.0 であった。

Mann-Whitney 検定による統計処理において術後 7 日目において危険率 5%未満で control 群に対して移植群は有意に BBB スコアが高かった。術後 14、21、および 28 日目においては危険率 1%未満で control 群に対して移植群は有意に BBB スコアが高かった。

また、移植群において個体によっては術後 14 日目に BBB スコアが 21 に到達した個体もあり、予想以上の運動機能の回復が見られた(表 4)。

考察

移植細胞の動態検索

DiI 染色は親油性の高いカルボシアニン色素を用いて生細胞の細胞膜を標識する染色法であり、最大蛍光波長 565nm の橙赤色光を発する。また、Hoechst33342 染色は細胞膜透過性蛍光核酸染色法であり、DNA と結合して最大蛍光波長 461nm の青色可視光を発する。本研究で DiI 染色、Hoechst 染色で共に蛍光を発色した部位は移植細胞由来の発色であると示唆され、損傷部位に移植細胞を注入したが病変部そのものには少なく周囲に多く発色部位が存在していることは脊髄に注入後、移植細胞が周囲に遊走していたと示唆された。

また、DiI 染色を行った組織を凍結させるとカルボシアニン色素による蛍光発色部位において細胞膜から色素が漏出する可能性があることが知られており、ローダミン照射の図においてカルボシアニン色素のみを強く発色している部位ができたと考えられた。

本研究では術後 2 週間での移植細胞の動態検索しか行っていない。運動機能回復の評価と併せて経時的な動態検索を行うことが出来れば移植細胞の脊髄への作用解明の一助になるかもしれないと考えられた。Ohta らはラット由来 BMSCs を損傷させたラットに移植し、免疫組織化学染色を施したところ、移植 1 週間後には移植細胞が脊髄部分に侵入して生着し、突起を伸ばしていた。しかし、移植後 2 週、3 週となるに従って細胞数はしだいに減少し、5 週目には完全に消失していたと報告している[14]。

PCR による Sry 遺伝子の検出

イヌ Sry (Sex determining region Y) 遺伝子は性染色体である Y 染色体上に存在する遺伝子であり、性差の決定に大きな影響を及ぼすとされている。本研究の電気泳動においてポジティブコントロールと同様の位置でバンドが病変部で検出されたことは病変部において Sry 遺伝子が検出されたと言える。レシピエントであるスキッドマウスは雌を用いたため、Sry 遺伝子は本来、存在し得ない遺伝子である。したがって、今回の検出された Sry 遺伝子はすべて雄ビーグル犬の移植細胞由来のものであることがわかり、遺伝子レベルで病変部に移植細胞が少なくとも移植後 4 週間は存在していると示唆された。

脊損マウスの移植細胞による運動機能回復の評価

移植群が control 群に比べて BBB スコアが術後 7、14、21、および 28 日目で有意に高いということは、移植群の方が脊髄損傷に対する運動機能の回復が起こることが示唆された。したがって、イヌ由来 BMSCs を損傷した脊髄に移植することで脊髄の再生に何らかの一助を担った可能性があることが示唆された。しかし、control 群でも運動機能回復は移植群ほどにないにしても確認された。脊髄の完全切断を行った場合、軸索は全て離断される。よって、神経機能を取り戻すためには損傷した脊髄が損傷部を超えて長い距離を伸展し、2 次ニューロンにシナプスを形成しなければならない。しかし、軸索伸展阻害因子を始めとす

る種々の環境により、これは自然には起こりえない。臨床的に完全麻痺であっても脊髄が不完全切断であった場合、一部の脊髄の連続性は保たれているため、残存する組織において中枢神経の可塑性が起こる。これは損傷を受けた軸索の近位から新たな発芽により側副路が形成され、残存する脊髄固有ニューロンに乗り換えて下位の前角部運動ニューロンへ達する。必ずしも同じ軸索が同じ部分と 1 対 1 対応でつながるわけではないが、ある程度の支配-投射関係が保たれれば機能回復が起こる。今回の control 群でも一部、脊髄が不完全損傷であり、そのため、脊髄の可塑性がおこった可能性が示唆された(図 6)。

外科的手技に関して電動ドリルとロンジュールにて椎弓を切除したが脊髄を側面まで完全に露出させないとメスによる完全切断が難しく、外科的手技の熟練さが要求された。また、多くの類似研究ではラットが用いられている。これはラットがマウスに比べて体重換算で 10 倍程度と大きく、そのため背側椎弓切除術を実施して脊髄を露出した際、損傷が容易に行えるためである。しかし、本研究では免疫不全動物を使うことからコスト面を考慮してラットを使用せず、マウスを使用した。実際、マウスでは肉眼下での脊髄損傷は手技的に不安定であり、マウスの脊髄損傷モデルを作製するには実体顕微鏡下での作製が必須であると考えられた。

脊髄損傷の病態は大きく 1 次損傷と 2 次損傷に分類できる。1 次損傷は直接的な外力による損傷であり、髄内の出血や挫滅などの直接外力による病態である。また、損傷の程度が重傷であるときは脊髄そのものが断裂、挫滅する。2 次損傷は血管損傷による出血と虚血、

浮腫、電解質異常、細胞毒性やフリーラジカルなどによる神経細胞のアポトーシスが起こり、不可逆的な変性が起こる。中心部では出血による壊死が起こり、最終的に空洞形成やグリア瘢痕によって軸索再生に対して排他的な環境が形成される[11]。最新の知見により、移植細胞を脊髄に直接移植する場合、2次損傷が治まっている時期のほうが移植細胞の生着がしやすいということが言える。したがって、BMSCsの最適な移植時期が明らかになってきた。Hofstetterらは受傷直後よりも1週間後の移植の方がBMSCsの生着や神経症状の改善が良好であったとしている[6]。また、Bakshiらも受傷2週間以内の移植がより効果的であったと報告している[1]。よって本研究では手技の問題から脊損直後にBMSCsの移植を行ったが、理想的に言えば1週間後の移植の実施が望ましいと言える。1週間後の移植によってより多くのBMSCsが生着し、運動機能回復を起こすと推測された。また、脊髄の2次損傷時においてアストロサイトから主に分泌されるIL-6が脊髄での局所的な炎症を誘発させ、炎症細胞を浸潤させることがわかっている[9]。Okadaらは脊髄損傷マウスに抗IL-6レセプター抗体の投与したところ、有意に運動機能が回復したと報告した[15]。

また、病変部に浸潤した炎症細胞の数と病変部の損傷程度は一致しているという報告がある[3]。そのため、本研究で用いたリンパ球系が欠損しているスキッドマウスでは通常のICRマウスと比較して脊髄の2次損傷の程度が弱かった可能性がある。そのため、本研究の結果が他の報告と比較してBBBスコアの上昇が速かった可能性が示唆された。

運動機能回復の評価法として本研究ではBBBスコアを用いた。これは脊髄損傷モデルで

の運動機能評価として用いる一般的な方法である。しかし、この評価法の問題点は歩行評価を 21 段階でしか分類しておらず、本研究では術後 14 日目で最高スコアの 21 に達した個体が 2 匹存在した。これらの個体では BBB スコアに基づくと 21 を上回るスコアをつかないため、術後 21 日目、28 日目などで移植群のスコアの上昇の伸びが鈍化していると考えられた。今後は BBB スコアのスコアリング基準を更に細分化することなど多少の修正が必要であると考えられた。

本研究結果で移植群の損傷脊髄の運動機能回復効果は示せたが、移植したイヌ由来 BMSCs がどのような働きを行って有意な運動機能回復効果を示せたのかは本研究では明らかにしていない。最新の知見によると、SCI モデルに移植された BMSCs の組織修復のメカニズムについては様々な説がある。移植された BMSCs が直接、神経系細胞の表現型を獲得するという説の場合、ホストの神経細胞との細胞融合が提唱されている[16,19]。しかし、融合した細胞がたどる運命や組織修復に果たす役割は未だ解明されていない。もう一つの BMSCs による組織修復としては種々の成長因子やサイトカインの産生による損傷組織の保護や修復が提唱されている。Garcia らは BMSCs により vascular endothelial growth factor(VEGF), nerve growth factor(NGF)などを産生していることを明らかにした[5]。このように損傷脊髄では軸索伸展阻害因子によって軸索の伸長の阻害をおこしやすい環境であり、それらの因子のコントロールによる損傷脊髄の再生を促す方向での研究も進んでいる。

細胞の移植方法について本研究では移植細胞を背側椎弓切除術で脊髄を露出した上で移植を行った。また、注射針や注入液の圧力による新たな脊髄損傷を起こす可能性も否定できない。実際の臨床応用を考慮すると安全、侵襲度が低く、かつ効果的な移植法を検討すべきである。Ohta らは NYU-weight-drop device を用いて脊髄損傷ラットモデルを作製し、ラット由来 BMSCs を第 4 脳室内に注入移植する実験を行った。それによると間質細胞はクモ膜下腔を移動し、損傷部位へ遊走することが確認された。また、運動機能にも改善が認められた[14]。また、Vaquero らはラット脊髄損傷モデルに BMSCs を経静脈的あるいは直接移植したところ、経静脈的移植により軽度の神経症状の改善が確認されたのに対して直接移植では神経症状の改善がより著しく、長期にわたって BMSCs が脊髄に生着していたと報告した[17]。このように経静脈法、腰椎穿刺法、脳室穿刺法などと本研究結果との比較を今後、行っていく必要があると考えた。

また、本研究での検討結果はイヌ由来骨髄細胞の急性脊髄損傷モデルでの効果であり、実際の臨床例で多く遭遇する慢性経過の症例にはそのまま結果を当てはまることはできない。現在、急性期脊髄損傷の研究報告に比べて慢性期脊髄損傷での研究報告が少ないのが実情である。今後は慢性脊髄損傷モデルでのイヌ由来骨髄細胞の移植効果とその細胞動態も検討するべきであると考えられた。

参考文献

1. Bakshi, A., Barshinger, A. L., Swanger, S. A., Madhavani, V., Shumsky, J. S., Neuhuber, B. and Fischer, I. 2006. Lumber puncture delivery of bone marrow stromal cells in spinal cord contusion: a novel method for minimally invasive cell transplantation. *J. Neurotrauma* **23**: 55-65.
2. Beresford, J. N., Bennett, J. H., Devlin, C., Leboy, P. S. and Owen, M. E. 1992. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J. Cell Sci.* **102** (Pt 2): 341-351.
3. Chalson, S. L., Parrish, M. E., Springer, J. E., Doty, K. and Dossett, L. 1998. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp. Neurol.* **151**: 77-88.
4. Fortier, L. A. 2005. Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applications. *Veterinary Surgery* **34**: 415-423.
5. Garcia, R., Aguiar, J., Alberti, E., de la Cuetara, K. and Pavon, N. 2004. Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**: 753-754.
6. Hofstetter, C. P., Schwarz, E. J., Hess, D., Widenfalk, J. E., Manira, A., Prockop, D. J. and Olson, L. 2002. Marrow stromal cells from guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 2199-2204.

7. Iwashita, Y., Kawaguchi, S. and Murata, M. 1994. Restoration of function by replacement of spinal cord segments in the rat. *Nature* **367**: 167-170.
8. Jiang, J., Lv, Z., Gu, Y., Li, J., Xu, L., Xu, W., Lu, J. and Xu, J. 2010. Adult rat mesenchymal stem cells differentiate into neuronal-like phenotype and express a variety of neuro-regulatory molecules in vitro. *Neurosci. Res.* **66**: 46-52.
9. Leskovar, A., Moriarty, L. J., Turek, J. J., Schoenlein, I. A. and Borgens, R. B. 2000. The macrophage in acute neural injury: changes in cell numbers over time and levels of cytokine production in mammalian central and peripheral nervous systems. *J. Exp. Biol.* **203**: 1783-1795.
10. Li, Y., Field, P. M. and Raisman, G. 1997. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science* **277**: 2000-2002.
11. Liu-Snyder, P., Logan, M. P., Shi, R., Smith, D. T. and Borgens, R. B. 2007. Neuroprotection from secondary injury by polyethylene glycol requires its internalization. *J. Exp. Biol.* **210**: 1455-1462.
12. Martin, D., Robe, P., Franzen, R., Delrée, P., Schoenen, J., Stevenaert, A. and Moonen, G. 1996. Effects of Schwann cell transplantation in a contusion model of rat spinal cord injury. *J. Neurosci. Res.* **45**: 588-597.
13. McDonald, J. W., Liu, X. Z., Qu, Y., Liu, S., Mickey, S. K., Turetsky, D., Gottlieb, D. I. and Choi, D. W. 1999. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in

injured rat spinal cord. *Nat. Med.* **5**: 1410-1412.

14. Ohta, M., Suzuki, Y., Noda, T., Ejiri, Y., Dezawa, M., Kataoka, K., Chou, H., Ishikawa, N., Matsumoto, N., Iwashita, Y., Mizuta, E., Kuno, S. and Ide, C. 2004. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp. Neurol.* **187**: 266-278.

15. Okada, S., Nakamura, M., Mikami, Y., Shimazaki, T., Mihara, M., Ohsugi, Y., Iwamoto, Y., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Toyama, Y. and Okano, H. 2004. Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. *J. Neurosci. Res.* **76**: 265-276.

16. Terada, N., Hamasaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., Meyer, E. M., Morel, L., Petersen, B. E. and Scott, E. W. 2002. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous fusion. *Nature* **416**: 542-545.

17. Vaquero, J., Zurita, M., Oya, S. and Santos, M. 2006. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: systemic or local administration? *Neuroscience letters* **398**: 129-134.

18. Wu, S., Suzuki, Y., Ejiri, Y., Noda, T., Bai, H., Kitada, M., Kataoka, K., Ohta, M., Chou, H. and Ide, C. 2003. Bone marrow stromal cells enhance differentiation of cocultured neurosphere cells and promote regeneration of injured spinal cord. *J. Neurosci. Res.* **72**: 343-351.

19. Ying, Q. L., Nichols, J., Evans, E. P. and Smith, A. G. 2002. Changing potency by spontaneous

fusion. *Nature* **416**: 545-548.

图·表

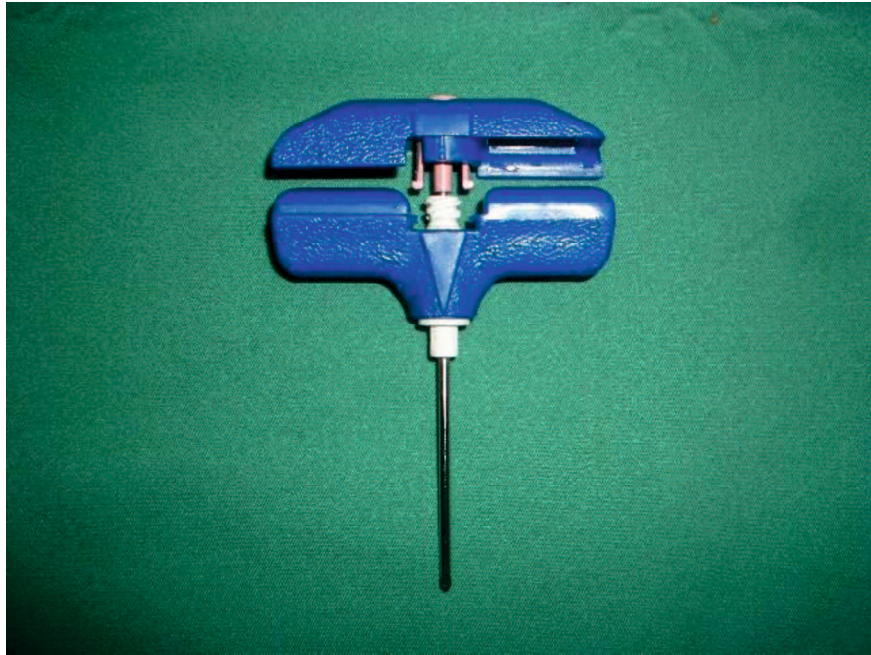


图 1 骨髓穿刺针

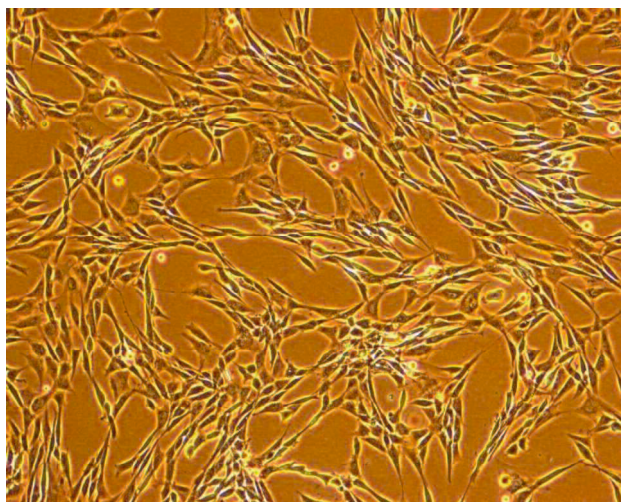


図2 イヌの骨髄由来培養細胞(BMSCs)

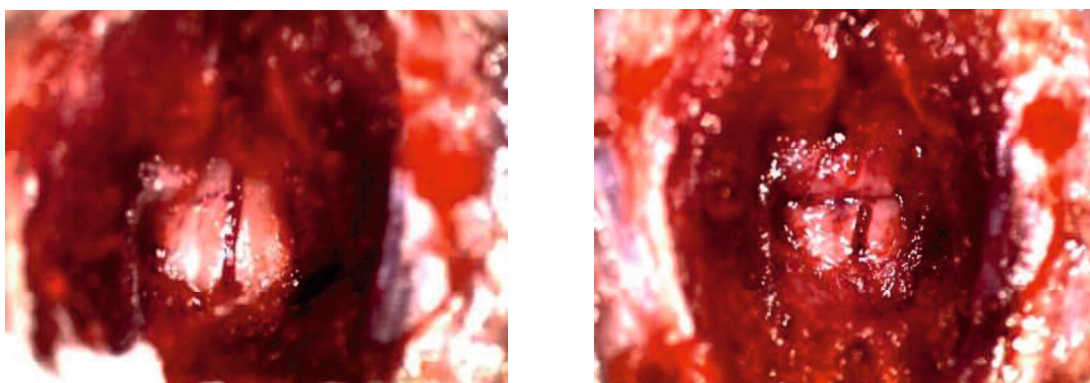


図3 露出した脊髄(左)と切断した脊髄(右)

プライマー	翻訳領域	配列(5' → 3')	予想産物(bp)
DogSry-s (6+)	: 463-483	aagatggctctagagaatccc	267
DogSry-as(6-)	: 729-709	gaagggtagaacctctcatc	267

表 1 プライマーの設計

2×ExTaq Buffer	10 μ l
10 μ M Dog Sry-s primer	0.4 μ l
10 μ M Dog Sry-as primer	0.4 μ l
鋳型 cDNA	1.0 μ l
ExTaq	0.1 μ l
MQ	up to 20 μ l

- ① 94°C 2分
- ② 94°C 30分
- ③ 57°C 30分
- ④ 72°C 30分
- ⑤ 4°C Hold

②~④のサイクルを計 35 回繰り返した。

表 2 PCR 反応溶液(20 μ l スケール)と反応条件

- 0: 後肢の運動が全く見られない。
- 1: 1箇所もしくは2箇所の関節がわずかに動く。
- 2: 1箇所の関節の広範囲に動く。もしくは、1箇所の関節の広範囲に動き、もう1箇所の関節がわずかに動く。
- 3: 2箇所の関節の広範囲に動く。
- 4: 後肢の関節3箇所すべてがわずかに動く。
- 5: 2箇所の関節がわずかに動き、もう1箇所の関節の広範囲に動く。
- 6: 2箇所の関節の広範囲に動き、もう1箇所の関節がわずかに動く。
- 7: 後肢の関節3箇所すべての広範囲に動く。
- 8: 体重支持の見られない **sweeping**、もしくは足底が接地しているが体重支持が見られない。
- 9: 足底が接地しており、静止時は体重支持が見られる、もしくは時々、しばしば、常に体重支持がみられる **dorsal stepping**。
- 10: 前肢後肢の調律はみられないが時々体重支持のみみられる **plantar stepping**。
- 11: 前肢後肢の調律は見られないがしばしば、常に体重支持のみみられる **plantar stepping**。
- 12: 前肢後肢の調律が時々見られ、しばしば、常に体重支持のみみられる **plantar stepping**。
- 13: 前肢後肢の調律がしばしば見られ、しばしば、常に体重支持のみみられる **plantar stepping**。
- 14: 前肢後肢の調律、体重支持が常にみられる **plantar stepping** もしくは前肢後肢の調律が常に見られる、しばしばの **plantar stepping** と時々 **dorsal stepping**。
- 15: 前肢後肢の調律が常に見られる **plantar stepping** で、前肢が全身する際に足の向きが体幹に対して平行である。
- 16: 前肢後肢の調律が常に見られる **plantar stepping** で、前肢が前進する際に **toe clearance** がしばしば見られる。後肢が接地する際は足の向きが体幹に対して平行であるが、挙上する際は歪んでいる。
- 17: 前肢後肢の調律が常に見られる **plantar stepping** で、前肢が前進する際に **toe clearance** がしばしば見られる。後肢が接地、挙上する際に共に足の向きが体幹に対して平行である。
- 18: 前肢後肢の調律が常に見られる **plantar stepping** で、前肢が前進する際に **toe clearance** が常にみられる。後肢が接地、挙上する際に共に足の向きが体幹に対して平行である。
- 19: 前肢後肢の調律が常に見られる **plantar stepping** で、前肢が前進する際に **toe clearance** が常に見られる。後肢が接地、挙上する際に共に足の向きが体幹に対して平行である。尾が下がっていることがある。
- 20: 前肢後肢の調律が常に見られる **plantar stepping** で、前肢が前進する際に **toe**

clearance が常に見られる。後肢が接地、挙上する際に足の向きが体幹に対して平行である。尾が常に挙上している。体幹が不安定である。

- 21: 前肢後肢の調律が常に見られる **plantar stepping** で、前肢が前進する際に **toe clearance** が常に見られる。後肢が接地、挙上する際に足の向きが体幹に対して平行である。尾が常に挙上している。体幹が安定している。

定義

- *1 「わずかに」：関節の可動域の半分以下の関節運動。
- *2 「広範囲に」：関節の可動域の半分以上の関節運動。
- *3 「sweeping」：屈曲、伸展を繰り返す周期的な後肢の運動。たいてい動物は横たわっており、後肢で体重を支持していないことは明らかである。
- *4 「体重支持のみられない」：後肢の足底が接地している間、伸筋の収縮がみられない。もしくは後肢半部を挙上している。
- *5 「体重支持のみられる」：後肢の足底が接地している間、伸筋の収縮が見られる。もしくは、後肢半部を挙上している。
- *6 「plantar stepping」：体重を支持して後肢の足底が接地しており、前進して再び接地する際も足底で体重を支持して接地する。
- *7 「dorsal stepping」：歩行周期のいくつかの時点で足の背側面での体重支持が見られる。
- *8 「前肢後肢の調律」：全ての前肢の一步に対して後肢の一步がある。
- *9 「時々」：50%以下
- *10 「しばしば」：51~94%
- *11 「常に」：95~100%
- *12 「体幹の不安定性」：よたよた歩きをおこす側面への重心の移動

表 3 Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) Locomotor Rating Scale

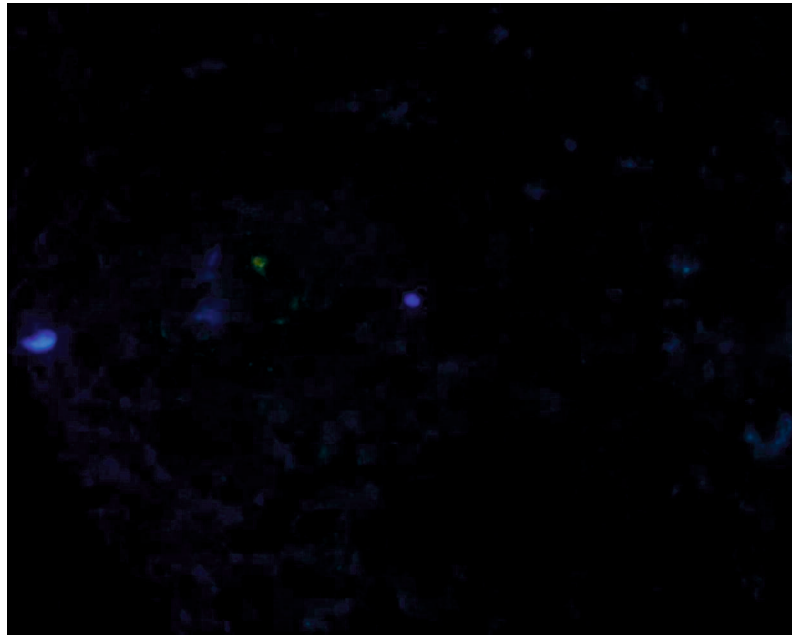
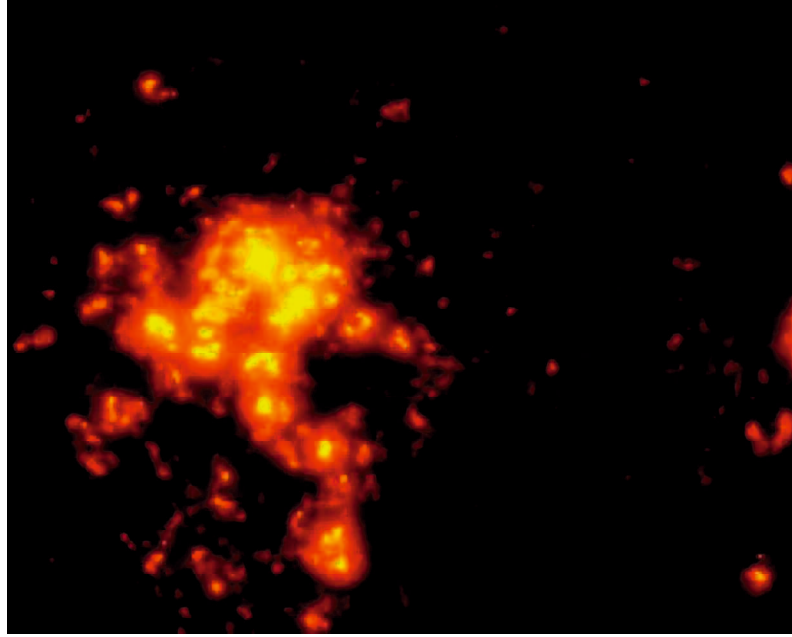
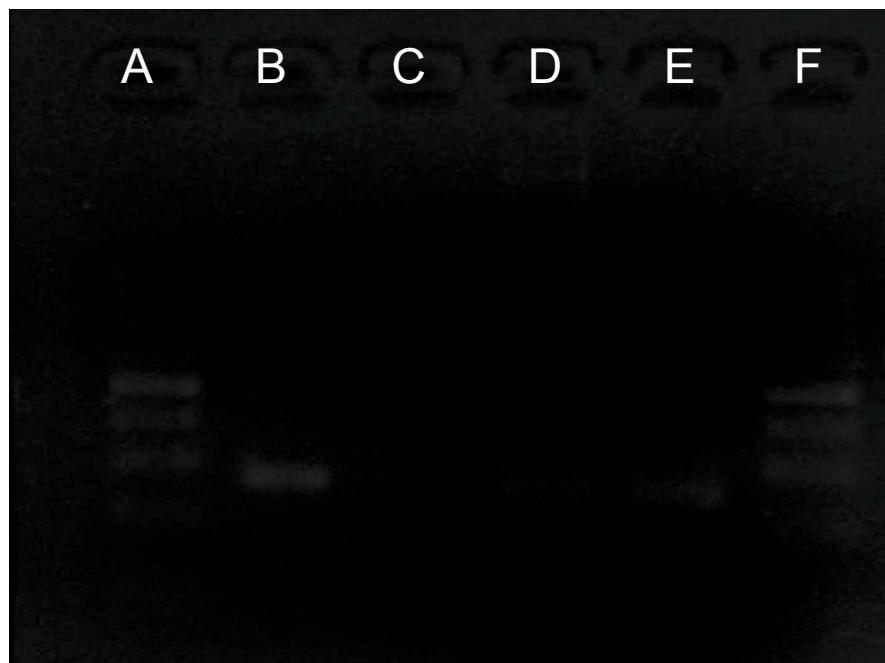


図 4 DiI 染色(上)と Hoechst 染色(下)を行った同一病変部位 (術後 1 週間)



A: Ladder Marker 100bp

B:イヌ gDNA(♂)

C:頸髄から抽出した gDNA

D:病変部から抽出した gDNA

E:腰髄から抽出した gDNA

F:Ladder Marker 100bp

図5 PCR 後の電気泳動によるバンドの検出

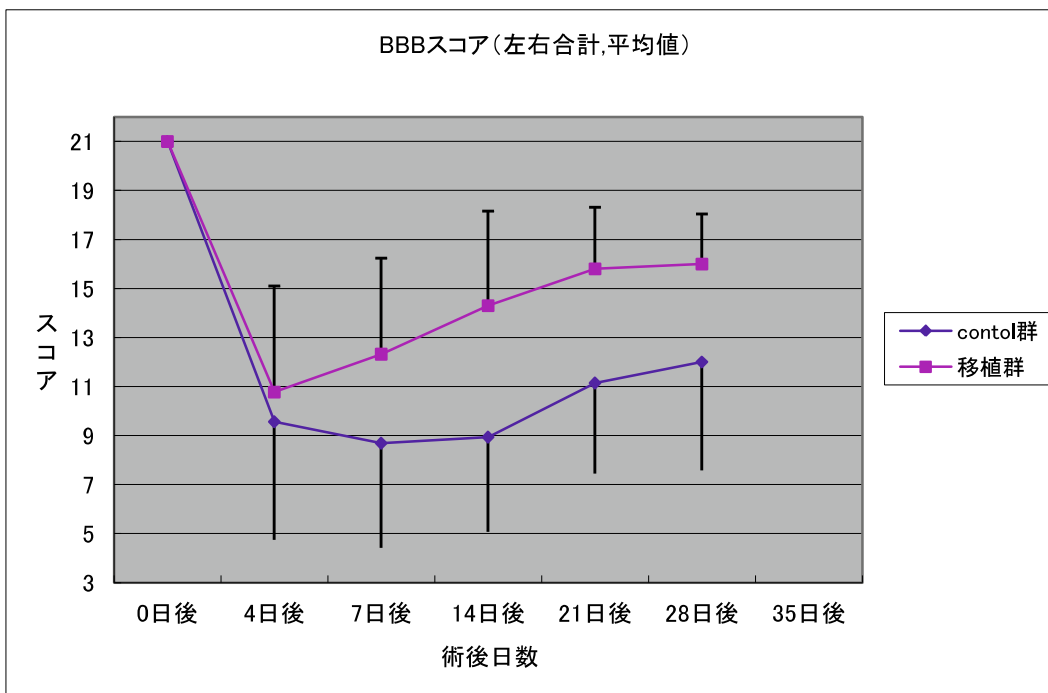


表 4 BBB スコア(左右合計、平均値)



損傷後の脊髄の可塑性

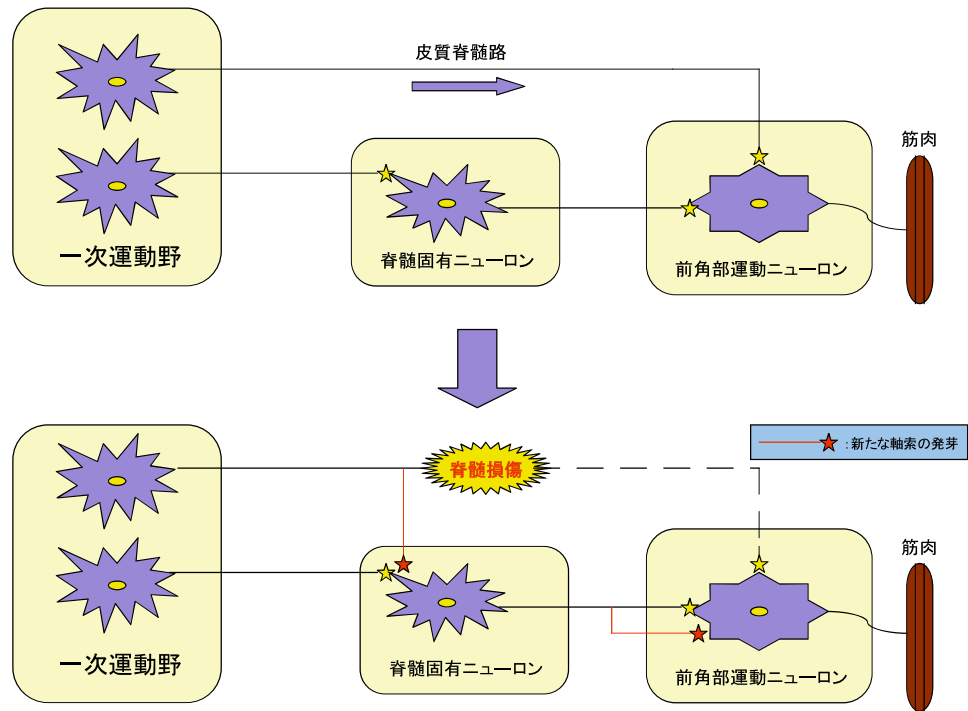


図 6 脊髄損傷後の脊髄の可塑性

第二章

イヌ由来骨髄間質細胞（BMSCs）を用いた

神経様細胞（NLCs）の評価

緒言

脊髄損傷(SCI: spinal cord injury)の治療において、神経幹細胞[13]、シュワン細胞[20]、嗅神経鞘細胞[9,19]、骨髄間質細胞(BMSCs)[24]などが脊髄神経再生を促す移植材料として長年研究がなされてきたにもかかわらず、重度の不全麻痺の治療はいまだに困難である。

様々なタイプの細胞が SCI の治療に試されてきたが、ES 細胞(embryonic neural stem cells)の胎児由来や胚性の幹細胞を用いた移植法はその分化能から期待されている[21]。しかし、倫理上の問題、移植技術、免疫拒絶反応、腫瘍化、費用、ドナー不足など臨床応用に至るまでには未だ多くの問題を抱えているので、すぐに臨床応用できる移植細胞源ではない[3,24]。

BMSCs は骨髄細胞中の血球系細胞を除いた接着系細胞に属し[24]、イヌ BMSCs は容易に識別でき、増殖も可能である[16]。BMSCs が臨床的に重要な優れている点として、自己移植できること、培養が低コストで可能なことおよび腫瘍化するリスクが非常に低いことである[24]。さらに、BMSCs は骨[2,16]、軟骨組織[18]、脂肪[2]、筋肉[29]、神経[14,31]に分化することが報告されている。近年、人医療ならびに獣医療においても脊髄再生医療に BMSCs が臨床応用され始め、良好な結果を導き出している[1,15,22,26,27]。移植された BMSCs は、神経栄養因子を産生する、あるいは移植先の組織に取り込まれ融合し、その効果を発揮すると報告されている[4,5]。しかし、他の研究では、BMSCs 移植治療はわずかな機能回復効

果しかなかったとするものや[11]、ラットの胸髄挫傷に対して、効果がなかったとするものもある[32]。したがって、現段階での BMSCs の移植効果には限界があり、臨床応用するにはさらなる研究が必要であり、改善の余地が大いにある。最近になって、ヒト ES 細胞由来の神経細胞がドパミン作動性ニューロンとして機能し、霊長類の運動機能改善に効果をもたらした、とする報告がされた[7]。したがって、イヌ BMSCs 由来の神経様細胞(NLCs)は、脊髄疾患治療において BMSCs と比較し、より有効な移植細胞源になり得ると考えた。しかし、イヌ NLCs についての報告はほとんどなく[10,17]、移植治療源とするには、NLCs の基礎的な研究が必要であると考えた。

そこで本研究では、過去に報告された BMSCs から NLCs への分化誘導方法のうち三通りの方法で NLCs 作製を試み、形態的特徴、生産性、長期生存性、継代可能か、の点から評価し、移植実験への適合性を推察した。

材料と方法

BMSCs の供試動物

すべての実験行程において山口大学動物実験の基準に基づいて行った。

BMSCs の採材には健常ビーグル犬（雄,10.8kg,8 カ月齢）を用いた。

骨髓採材と BMSCs の培養

ビーグル犬をプロポフォール 7mg/kg を静脈注射して麻酔導入し、鎮痛薬として塩酸ブプレノルフィン 20 μ g/kg を筋肉注射した。2%イソフルラン吸入にて麻酔を維持した。骨髓吸引は腸骨稜から無菌的に行い、BMSCs の培養は過去の報告に従った手順で行った[12]。採取した骨髓液を無菌的に 10ml の Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, CA, U.S.A.)に 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, CA, U.S.A.), Pen/Strep(penicillin 50 U/ml and streptomycin 50 μ g/ml), 2.5 μ g/ml アンホテリシン B を添加した細胞培養ボトルの培地に播種した。それらの BMSCs を含む培養液を 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂のインキュベーター内に静置した。血球、浮遊細胞を除去する目的で播種 3 日後、その後は 4 日ごとに培地を交換した。細胞が培養ボトルの 70~80%をしめた時点で tryple Express (Invitrogen, CA, U.S.A.)溶液にて 37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートし、このトリプシン処理を二回行い、三継代目を実験に用いた。

今回得られた三継代目の細胞は、CD44 および CD90 の表面抗原は陽性、CD45 の表面抗

原は陰性であり、BMSCs とみなした[8,30]。

イヌ由来 BMSCs から NLCs への分化

過去の報告に基づいて、いくつかの改変を加えて、3 種類のイヌ由来 BMSCs から NLCs への培養プロトコールを比較検討した。プロトコール 1 (n=3) [17]、プロトコール 2 (n=3) [31]およびプロトコール 3 (n=3) [14]とした。

プロトコール 1

三継代目の BMSCs の神経分化には、low-glucose (1 g/l)DMEM (Invitrogen, CA, U.S.A.)に 20% FBS と抗菌薬(100 U/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin sulfate, 0.25 µg/ml amphotericin B)を添加した培養液 (以下、完全培養液)と神経誘導培養液を用いた。神経誘導培養液はDMEM/F12 (Invitrogen, CA, U.S.A.)に0.5 nmol/l isobutylmethylxanthine (IBMX, Sigma Aldrich Co., MO, U.S.A.)、1 mmol/l dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP, Sigma Aldrich Co., MO, U.S.A.)ならびに 1% N-2 supplements を添加した培養液とした。

免疫細胞化学染色による分析は以下の手順により実施した。細胞数を 1×10^4 個/100µl に調整し、完全培養液で懸濁した三継代目の BMSCs を 12 ウェルの培養プレート上に播種した。

12 時間のインキュベート後、900 µl の完全培養液を加え、細胞数が細胞プレートの 70%に達するまで培養した。続いて培養液を捨て、1 ml の神経誘導培養液を加えて 37°C、5%CO₂ のインキュベーター内に 5 時間静置した。

プロトコール 2

三継代目の BMSCs をトリプシン処理にて剥離し、25cm² プラスチックフラスコに細胞数が 1×10⁵ 個/cm² になるように DMEM/F12 (Invitrogen, CA, U.S.A.) に 2% B₂₇、20 ng/ml、basic fibroblast growth factor (bFGF, Sigma Aldrich Co., MO, U.S.A.)、20 ng/ml epidermal growth factor (EGF, Sigma Aldrich Co., MO, U.S.A.) および Pen/Strep (100 U/ml、100 µg/ml) を添加した培養液に播種した。この培養液と成長因子は 1 週間に 3 回交換した。BMSCs は細胞同士が次第に集まっていき、培養液に播種して 7 日後、巨大ニューロン球体としてその形態を観察できるようになるが、この巨大ニューロン球体を含む培養液をさらに 5 回継代培養した後、このニューロン球体を poly-L-lysine でコーティングされた 24 ウェルの培養プレートに播種し、4 時間後に免疫細胞化学染色のために固定した。ニューロン球体を神経細胞やグリア細胞に分化させるためにニューロン球体は、DMEM/F12 に 10% FBS、2% B₂₇、10 ng/ml bFGF、10 ng/ml EGF および Pen/Strep (100 U/ml、100 µg/ml) を添加した培養液と poly-L-lysine でコートされた 24 ウェルの培養プレートに播種し、5 日間分化誘導させた。

プロトコール 3

三継代目の BMSCs を 5000 個/cm² の濃度に細胞数を調整して、DMEM に 10% FBS、Pen/Strep (100 U/ml、50 µg/ml)、ならびに 2.5 µg/ml amphotericin B を添加した培養液と共に 0.01% poly-L-lysine コートされたチェンバーズライド上に播種した。それから 24 時間後に神経分化培養液に交換した。細胞はまず誘導前培養液として DMEM に 0.1 mmol/l 2-mercaptoethanol および 2% dimethylsulfoxide を添加した培養液で 5 時間インキュベートし

た後、誘導前培養液を捨て、PBS で洗浄した。続いて DMEM に 10% FBS、10 $\mu\text{g/l}$ bFGF、10 $\mu\text{g/l}$ EGF、1mmol/l dbcAMP および 0.5 mmol/l IBMX を添加した神経誘導培養液にて 7 日間または 14 日間培養した。

蛍光免疫細胞化学染色

三継代目の BMSCs をトリプシン処理にて細胞をフラスコからはがし、poly-L-lysine コートされた 8 ウェルチェンバースライド (LAB-TEK II-CC2 CHAMBER SLIDE SYSTEM, Nunc, Slangerup, Denmark) の各ウェルに対して、5000 個/cm² の濃度に細胞数を調節して DMEM 培地と共に播種した。神経分化が終了した時点で蛍光免疫細胞化学染色を行い、NLCs が発現する神経マーカーを評価した。まず、培養液を捨て、培養スライド上の細胞を PBS にて調整した 0.05% TWEEN20 (PBS-T) で各 5 分間 3 回ずつ丁寧に浸漬・洗浄した。続いて、4% パラホルムアルデヒドによって室温で 30 分間固定を行い、同様に PBS-T にて洗浄 (5 分間 3 回)。PBS-T で調整した 1% Triton X-100 にて室温で 10 分間浸漬させ、細胞の透過性を高めた。その後、同様に PBS-T にて洗浄 (5 分間 3 回) 後、非特異的反応を阻止する目的で、PBS-T で調整した 3% スキムミルクで室温に 1 時間適用した。再び PBS-T で洗浄し (5 分 3 回)、1 次抗体を加えた。1 次抗体は、抗 microtubule-associated protein-2 (MAP-2; 1:100, Polyclonal rabbit anti-MAP-2, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.)、nestin (1:100, Polyclonal rabbit anti-nestin, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.)、glial fibrillary

acidic protein (GFAP; 1:50, Monoclonal mouse anti-GFAP, Progen, Heidelberg, Germany)、および β III-tubulin protein (1:200, Monoclonal mouse anti- β -tubulin III, Millipore, 東京)を使用し、各スライドを 4°C で一晩インキュベートさせた。また、PBS を各 1 次抗体の陰性対照として用いた。2 次抗体はそれぞれ、anti-rabbit IgG-rhodamine (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.)、goat anti-mouse IgG2a-rhodamine (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.)、または goat anti-mouse IgG₁-Rhodamine (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.)を使用し、室温にて 1 時間インキュベートした。それから各スライドは核染色のために Hoechst 33258 (1:1000, Dojindo Molecular Technologies Inc, 熊本)を室温にて 15 分間反応させた。また、これらのスライドのインキュベートの際は、それぞれ 5 分間 3 回ずつの PBS-T による洗浄を行った。細胞は蛍光顕微鏡(Eclipse TE2000-U, Nikon, 東京)を用いて各蛍光色素に適したフィルターで観察した。

結果

BMSCs 由来の分化細胞の形態学的評価

プロトコール 1

イヌ BMSCs の神経分化誘導において BMSCs の形態は、誘導開始 5 時間後までに、線維芽細胞様形態から多数の枝分かれした突起をもつ神経様細胞形態に経時的変化が観察された(図 1a)。細胞全体の NLCs の割合は $84.33 \pm 1.70\%$ であった。しかし、この NLCs はこれまでの継代方法では継代不可能であり、細胞は徐々に神経様の形態を崩し、誘導開始 24 時間後までには、周囲の細胞と凝集したり、フラスコから剥がれ、細胞死の様相を示した(図 1b)。誘導開始 48 時間後には、ほとんどすべての細胞がフラスコから剥がれた。

プロトコール 2

初期誘導培養液にて 4 日後には、BMSCs 同士が次第に集まり巨大化し、巨大ニューロン球体として観察された(図 2a)。しかし、約 50%のこれらの巨大ニューロン球体は、誘導開始 11 日後には、完全に紡錘形の BMSC 様に形態が戻り、残りの半数も形を崩し始めていた(図 2b)。この状態で 5 回の継代を行ったところ、巨大ニューロン球体は認められず、元の BMSC の形態を示す細胞が認められるのみであった(図 2c)。さらに、プロトコールに従って、次の誘導培養液にて誘導を試みたが、これらの細胞は形態学的変化を示さなかった(図 2d)。

プロトコール 3

BMSCs を誘導前培養液にて 5 時間誘導させたが、過去の報告とは異なり、BMSCs の形態に特に変化が認められなかった(図 3a)[14]。続いて、神経誘導培養液にて誘導後、3 日間で神経細胞の特徴である、屈折性の細胞体と、長く枝分かれした突起が観察された。これらの NLCs は、神経誘導培養 7 日後から 14 日後までの間で細胞数全体の $91.33 \pm 2.49\%$ であった(図 3b)。また NLCs は誘導 14 日後までの観察において、形態的变化とともに増殖を繰り返した。さらに、継代すると新しいフラスコに再び接着し神経様形態を維持した。

免疫細胞化学染色

プロトコール 3 の分化誘導にて得られた NLCs の免疫細胞化学染色において未成熟な神経マーカー(nestin, 84.7%)と成熟した神経マーカー(MAP-2, 95.7%; β III-tubulin, 12.9%; GFAP, 9.2%)の両方を発現した(図 4a-d)。したがって、分化誘導によって得られた NLCs は、成熟した神経細胞と未成熟な神経細胞で構成されていた。

考察

本実験の結果から *in vitro* の適切な環境下でイヌ BMSCs から神経特有の形態を持ち、神経マーカーを持つ細胞を能率的に分化誘導して作り出せることが示唆された。

近年、ラット、マウス、およびヒトの BMSCs が *in vitro* で分化、転位によって神経の形態を発現する能力を持つことがいくつか報告されている[6,14,17,23,25,28,30,31]。しかしながら、イヌでの報告はほとんどない[10,17]。したがって、我々は今回、イヌ BMSCs を使用して NLCs に分化誘導可能かどうか、過去の3つの報告の方法に基づいて試みた。これらの3通りの方法は、最新の報告であることと、それぞれ異なった手法であることから選択した。また、分化誘導によって得られた NLCs の適性は、NLCs の移植可能かどうか推測する視点から、形態的特徴、長期生存性、大量生産性および継代培養が可能かという点において評価した。

本実験のプロトコール1によって得られた NLCs は、組織生着性と長期間生存性の乏しさから移植細胞には適していないと推察した。過去の報告においても、神経分化誘導期間中に培養フラスコから細胞が剥がれやすくなった、という今回の結果と同様な事象が示唆されている[17]。さらに、kamishina らは、dbcAMP や IBMX を使用すると、イヌの線維芽細胞でも BMSCs と同様な神経様形態変化が起こるので、神経様形態変化については過大評価すべきではない、とも報告している。また、ヒト BMSCs の誘導プロトコールにおいて、dbcAMP や IBMX は細胞内 cAMP 濃度の上昇によって急速な神経様形態変化を起こすとさ

れている[31]。プロトコール2は、プロトコール1および3と異なり、細胞移植において毒性をもつ可能性のある物質である 2-mercaptoethanol、dimethylsulfoxide、IBMX および dbcAMP などを使用していない。今実験での結果は、初期誘導培養液にて培養後4日目までに巨大ニューロン球体が観察された点では過去の報告と一致したが、誘導開始11日後には、完全に紡錘形の BMSC 様に形態が戻り、残りの半数も形を崩し始めていた点では過去の報告と異なった[31]。その後の誘導培養手順においてもプロトコール2ではNLCsを得ることはできなかった。この結果から、過去の報告ではラット BMSCs を使用しているのに対し、本実験ではイヌを使用したことから、種差によって分化誘導の結果が異なる可能性が示唆された。しかしながら、プロトコール3において、過去の報告においてはラット BMSCs の使用であったが[14]、本実験ではイヌ BMSCs から NLCs を得ることができた。イヌ BMSCs が神経様形態変化を示したのは、上述した理由から、dbcAMP や IBMX の役割が重要であったのかもしれない。

以上をまとめると、プロトコール3で得られたNLCsが神経様形態学的特徴をもつこと、長期間生存可能であること、少数のイヌ BMSCs から大量に増殖可能であることおよび継代培養可能であることから、細胞移植には最適であると考えられた。したがって、プロトコール3によって得られたNLCsにおいてのみ免疫細胞化学染色を行った。過去の報告によると、ラット由来のNLCsで免疫細胞化学染色を行ったところ、成熟した神経細胞から構成されていた[14]。本実験におけるイヌNLCsの神経マーカー発現はラットNLCsに類似する結

果でもあったが、相違点としてイヌ NLCs は、成熟した神経細胞と未成熟な神経細胞から構成されていた。この相違はラットとイヌの種差によるところはあるかもしれないが、神経マーカー発現強度やどの神経マーカーが発現するかの差異についてはこれまでの研究で不明のままである。

本実験における限界、問題点は二つある。まず、分化誘導で得られた NLCs は未熟な神経細胞と成熟した神経細胞で構成されていることから、恐らく完全な神経細胞に分化できていないであろうということである。次に、分化誘導で得た NLCs の機能について研究していないことである。このことについては、過去の報告に、神経様細胞(NLCs)が神経マーカーと共に神経制御分子を発現した、とするものがある[14,17,31]。したがって、NLCs の臨床応用の可能性について評価するならば、イヌ由来 NLCs の機能性についてのさらなる研究は必要不可欠であろう。

NLCs への分化誘導は、BMSCs に比べ、長期間の培養が必要であり、添加する薬剤による有害作用が起こる可能性、長期間培養中に汚染が起こる可能性および複雑な分化誘導手順の必要性がある。しかし、今後さらなる研究により、より効率的に容易に NLCs を入手できる方法が確立されたなら、イヌ NLCs は、ヒトあるいはイヌの神経疾患に対しての新規かつ進歩した治療戦略となり得るかもしれない。

本研究において、*in vitro* での適切な培養環境下で、イヌ由来 BMSCs は、神経様形態を示し神経マーカーを発現する細胞を効率的に分化させることが可能であることが示された。

イヌ NLCs の機能を含めたさらなる研究が進めば、イヌ NLCs は移植治療源となり得るであろう。

参考文献

1. Azari, M.F., Mathias, L., Ozturk, E., Cram, D.S., Boyd, R.L. and Petratos, S. 2010 Mesenchymal stem cells for treatment of CNS injury. *Curr. Neuropharmacol.* **8**: 316-323.
2. Beresford, J.N., Bennett, J.H., Devlin, C., Leboy, P.S. and Owen, M.E. 1992. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J. Cell Sci.* **102** (Pt 2): 341-351.
3. Björklund, A. and Lindvall, O. 2000. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat. Neurosci.* **3**: 537-544.
4. Chiba, Y., Kuroda, S., Shichinohe, H., Hokari, M., Osanai, T., Maruichi, K., Yano, S., Hida, K. and Iwasaki, Y. 2010. Synergistic effects of bone marrow stromal cells and a Rho kinase (ROCK) inhibitor, fasudil on axon regeneration in rat spinal cord injury. *Neuropathology* **30**: 241-250.
5. Chopp, M., Zhang, X.H., Li, Y., Wang, L., Chen, J., Lu, D., Lu, M. and Rosenblum, M. 2000. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* **11**: 3001-3005.

6. Deng, W., Obrocka, M., Fischer, I. and Prockop, D.J. 2001. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**: 148-152.
7. Doi, D., Morizane, A., Kikuchi, T., Onoe, H., Hayashi, T., Kawasaki, T., Motono, M., Sasai, Y., Saiki, H., Gomi, M., Yoshikawa, T., Hayashi, H., Shinoyama, M., Refaat, M.M., Suemori, H., Miyamoto, S. and Takahashi, J. 2012. Prolonged maturation culture favors a reduction in the tumorigenicity and dopaminergic function of human ESC-derived neural cells in a primate model of Parkinson's disease. *Stem Cells* **30**: 935-945.
8. Dominici, M., Le, Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. and Horwitz, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**: 315-317.
9. Doucette, R. 1995. Olfactory ensheathing cells: potential for glial cell transplantation into areas of CNS injury. *Histol. Histopathol.* **10**: 503-507.
10. Edamura, K., Kuriyama, K., Kato, K., Nakano, R., Teshima, K., Asano, K., Sato, T. and Tanaka, S. 2012. Proliferation capacity, neuronal differentiation potency and microstructures after the differentiation of canine bone marrow stromal cells into neurons. *J. Vet. Med. Sci.* **74**: 923-927.

11. Himes, B.T., Neuhuber, B., Coleman, C., Kushner, R., Swanger, S.A., Kopen, G.C., Wagner, J., Shumsky, J.S. and Fischer, I. 2006. Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord. *Neurorehabil Neural Repair* **20**: 278-296.
12. Hiyama, A., Mochida, J., Iwashina, T., Omi, H., Watanabe, T., Serigano, K., Tamura, F. and Sakai, D. 2008. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. *J. Orthop. Res.* **26**: 589-600.
13. Iwashita, Y., Kawaguchi, S. and Murata, M. 1994. Restoration of function by replacement of spinal cord segments in the rat. *Nature* **367**: 167-170.
14. Jiang, J., Lv, Z., Gu, Y., Li, J., Xu, L., Xu, W., Lu, J. and Xu, J. 2010. Adult rat mesenchymal stem cells differentiate into neuronal-like phenotype and express a variety of neuro-regulatory molecules in vitro. *Neurosci. Res.* **66**: 46-52.
15. Jung, D.I., Ha, J., Kang, B.T., Kim, J.W., Quan, F.S., Lee, J.H., Woo, E.J. and Park, H.M. 2009. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *J. Neurol. Sci.* **285**: 67-77.
16. Kadiyala, S., Young, R.G., Thiede, M.A. and Bruder, S.P. 1997. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* **6**: 125-134.

17. Kamishina, H., Deng, J., Oji, T., Cheeseman, J.A. and Clemmons, R.M. 2006. Expression of neural markers on bone marrow-derived canine mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* **67**: 1921-1928.
18. Lennon, D.P., Haynesworth, S.E., Young, R.G., Dennis, J.E. and Caplan, A.I. 1995. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* **219**: 211-222.
19. Li, Y., Field, P.M. and Raisman, G. 1997. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science* **277**: 2000-2002.
20. Martin, D., Robe, P., Franzen, R., Delrée, P., Schoenen, J., Stevenaert, A. and Moonen, G. 1996. Effects of Schwann cell transplantation in a contusion model of rat spinal cord injury. *J. Neurosci. Res.* **45**: 588-597.
21. McDonald, J.W., Liu, X.Z., Qu, Y., Liu, S., Mickey, S.K., Turetsky, D., Gottlieb, D.I. and Choi, D.W. 1999. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat. Med.* **5**: 1410-1412.
22. Nishida, H., Nakayama, M., Tanaka, H., Kitamura, M., Hatoya, S., Sugiura, K., Suzuki, Y., Ide, C. and Inaba, T. 2011. Evaluation of transplantation of autologous bone marrow stromal cells into the cerebrospinal fluid for treatment of chronic spinal cord injury in dogs. *Am. J. Vet. Res.* **72**: 1118-1123.

23. Ogita, H., Nakagawa, T., Sakamoto, T., Inaoka, T. and Ito, J. 2010. Transplantation of bone marrow-derived neurospheres into guinea pig cochlea. *Laryngoscope* **120**: 576-581.
24. Ohta, M., Suzuki, Y., Noda, T., Ejiri, Y., Dezawa, M., Kataoka, K., Chou, H., Ishikawa, N., Matsumoto, N., Iwashita, Y., Mizuta, E., Kuno, S. and Ide, C. 2004. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp. Neurol.* **187**: 266-278.
25. Pedram, M.S., Dehghan, M.M., Soleimani, M., Sharifi, D., Marjanmehr, S.H. and Nasiri, Z. 2010. Transplantation of a combination of autologous neural differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells into injured spinal cord of rats. *Spinal Cord* **48**: 457-463.
26. Saito, F., Nakatani, T., Iwase, M., Maeda, Y., Hirakawa, A., Murao, Y., Suzuki, Y., Onodera, R., Fukushima, M. and Ide, C. 2008. Spinal cord injury treatment with intrathecal autologous bone marrow stromal cell transplantation: the first clinical trial case report. *J. Trauma.* **64**: 53-59.
27. Saito, F., Nakatani, T., Iwase, M., Maeda, Y., Murao, Y., Suzuki, Y., Fukushima, M. and Ide, C. 2012. Administration of cultured autologous bone marrow stromal cells into cerebrospinal fluid in spinal injury patients: a pilot study. *Restor. Neurol. Neurosci.* **30**: 127-136.
28. Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T.B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D.R. and Sanberg, P.R. 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol.* **164**: 247-256.

29. Wakitani, S., Saito, T. and Caplan, A.I. 1995. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* **18**: 1417-1426.
30. Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J. and Black, I.B. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* **61**: 364-370.
31. Yang, Q., Mu, J., Li, Q., Li, A., Zeng, Z., Yang, J., Zhang, X., Tang, J. and Xie, P. 2008. A simple and efficient method for deriving neurospheres from bone marrow stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **372**: 520-524.
32. Yoshihara, H., Shumsky, J.S., Neuhuber, B., Otsuka, T., Fischer, I. and Murray, M. 2006. Combining motor training with transplantation of rat bone marrow stromal cells does not improve repair or recovery in rats with thoracic contusion injuries. *Brain Res.* **1119**: 65-75.

図・表

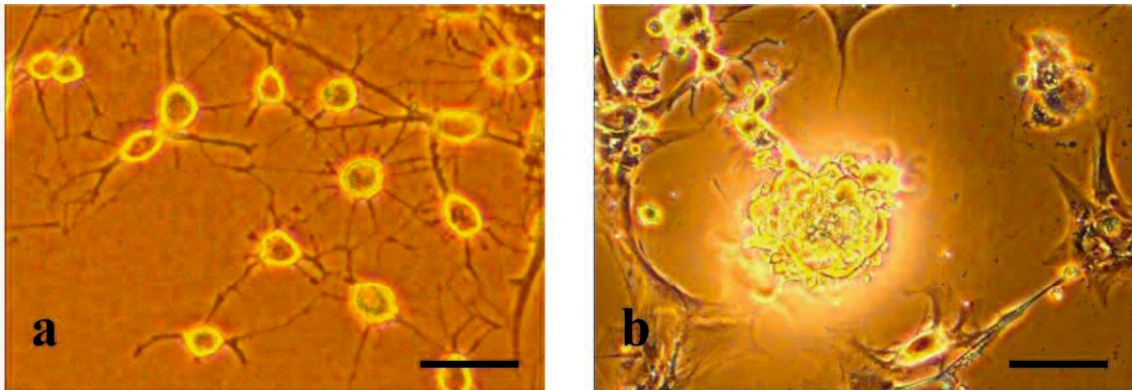


図 1 プロトコール 1 を用いた犬 BMSCs の神経分化 Bars = 50 μm

- a 分化誘導開始 5 時間後には、多極性の突起を持つ神経様特徴の細胞が観察された。
- b 分化誘導開始 24 時間後には、周囲の細胞と凝集したり、フラスコから剥がれ、細胞死の様相が観察された。

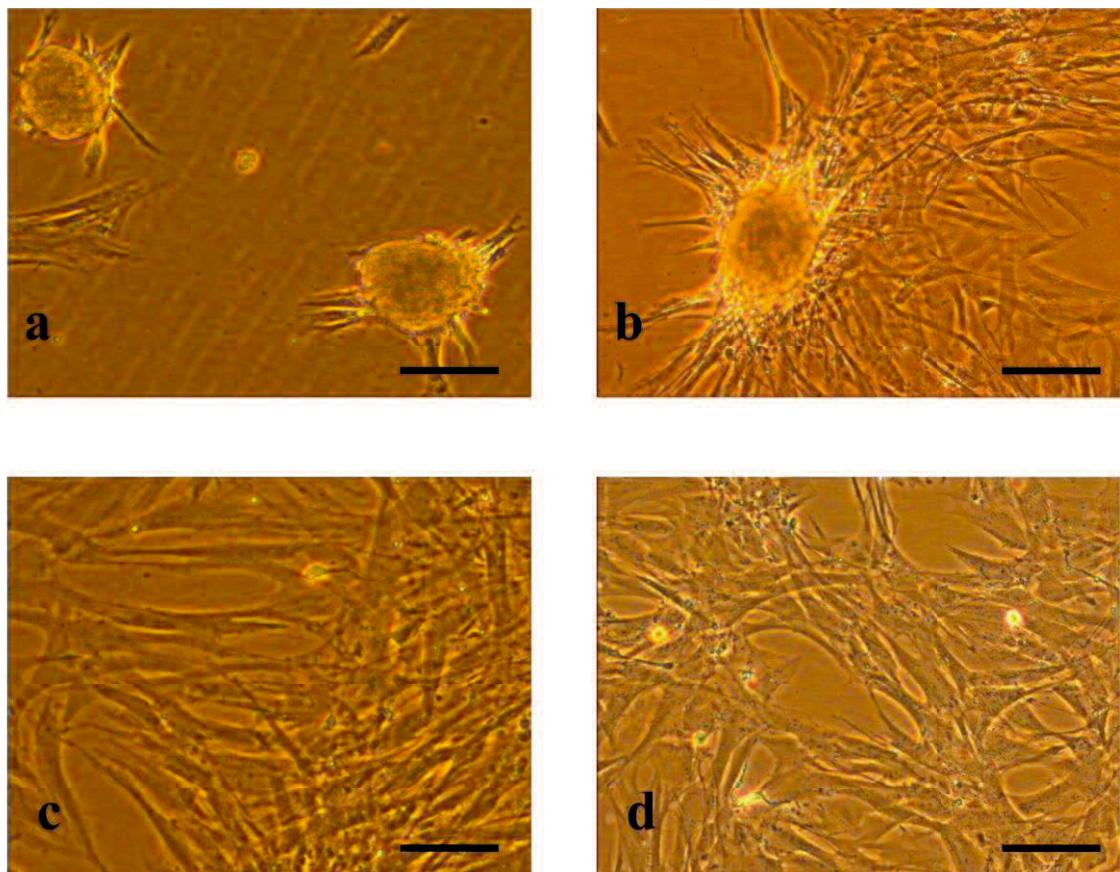


図 2 プロトコール 2 を用いた犬 BMSCs の神経分化 Bars = 50 μ m

- a 初期誘導培養液にて 4 時間後の細胞
- b 初期誘導培養液にて 11 日後の細胞
- c 5 継代行った後の細胞
- d 後期誘導培養液にて培養後の細胞

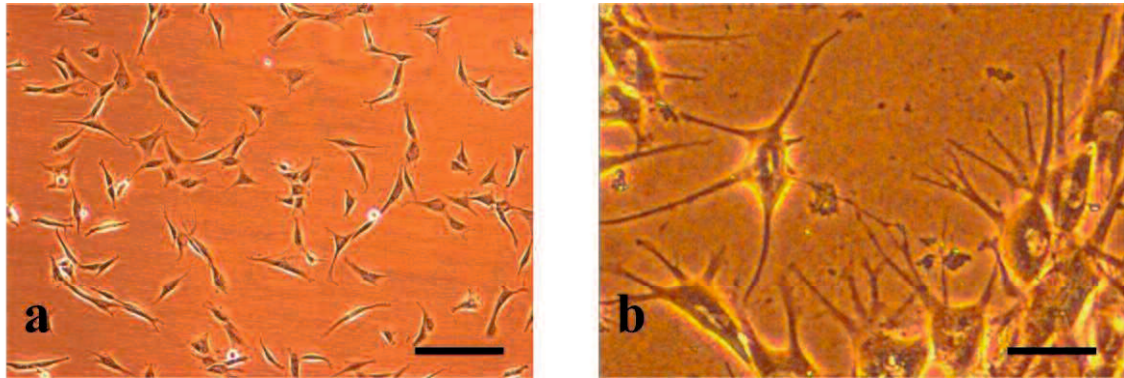


図3 プロトコール3を用いた犬BMSCsの神経分化

a 初期誘導培養液にて5時間後の細胞 Bar = 100 μ m

b 後期誘導培養液にて7日後の細胞 Bar = 25 μ m

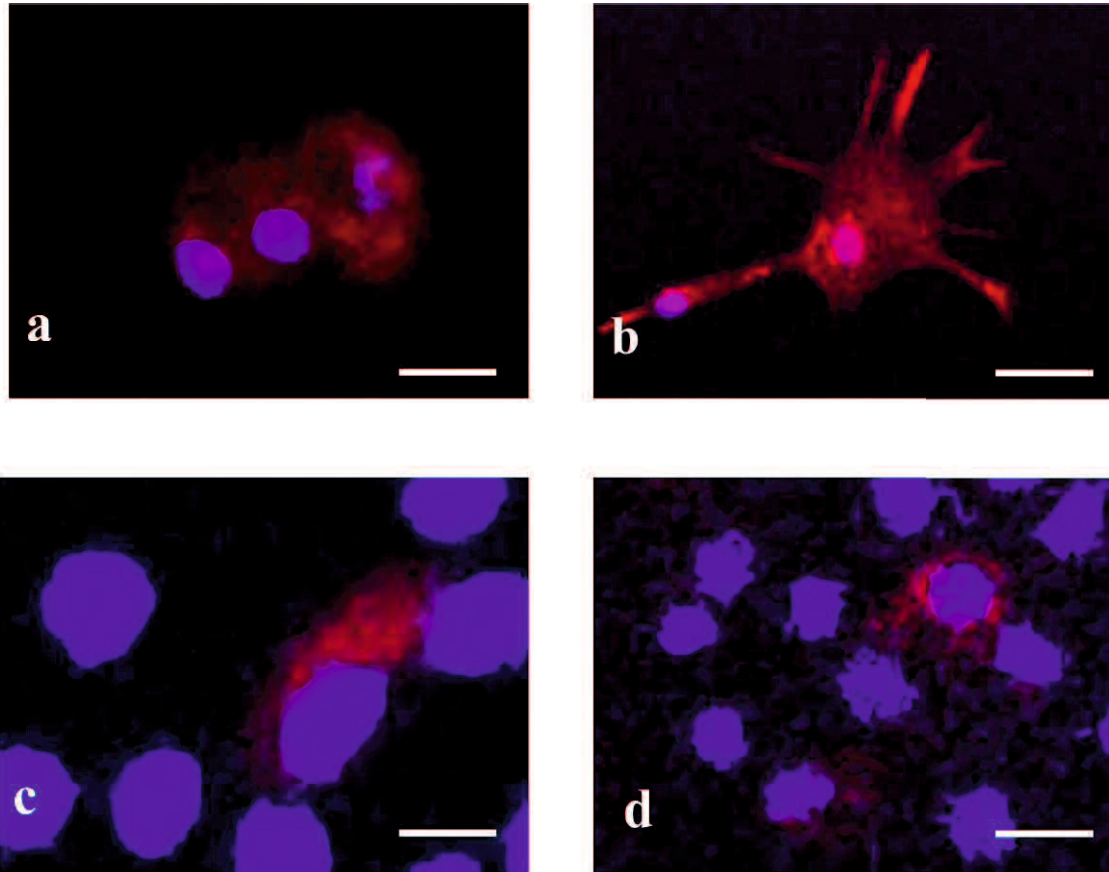


図4 プロトコール3を用いて得られたNLCsの免疫細胞化学染色の結果

a nestin. Bar = 50 μ m; **b** MAP-2. Bar = 50 μ m; **c** β III-tubulin. Bar = 20 μ m; **d** GFAP. Bar = 50 μ m

第三章

脊髄損傷モデルマウスを用いた骨髄間質細胞（BMSCs）移植と

ポリエチレングリコール（PEG）投与治療法の効果

緒言

脊髄損傷(SCI: spinal cord injury)の治療において、神経幹細胞[13]、シュワン細胞[21]、嗅神経鞘細胞[19]、骨髄間質細胞(BMSCs)[25]などが脊髄神経再生を促す移植材料として長年研究がなされてきたにもかかわらず、重度の不全麻痺の治療はいまだに困難である。

様々なタイプの細胞が SCI の治療に試されてきたが、ES 細胞(embryonic neural stem cells)の胎児由来や胚性の幹細胞を用いた移植法はその分化能から期待されている[22]。しかし、倫理上の問題、移植技術、免疫拒絶反応、腫瘍化、費用、ドナー不足など臨床応用に至るまでには未だ多くの問題を抱えているので、すぐに臨床応用できる移植細胞源ではない[4,25]。

BMSCs は骨髄細胞中の血球系細胞を除いた接着系細胞に属し[25]、イヌ BMSCs は容易に識別でき、増殖も可能である[16]。BMSCs が臨床的に重要な優れている点として、自己移植できること、培養が低コストで可能なことおよび腫瘍化するリスクが非常に低いことである[25]。さらに、BMSCs は骨[3,16]、軟骨組織[18]、脂肪[3]、筋肉[29]、神経[14]に分化することが報告されている。近年、人医療ならびに獣医療においても脊髄再生医療に BMSCs が臨床応用され始め、良好な結果を導き出している[1,23,26]。移植された BMSCs は、神経栄養因子を産生する、あるいは移植先の組織に取り込まれ融合し、その効果を発揮すると

報告されている[6]。しかし、他の研究では、BMSCs 移植治療はわずかな機能回復効果しかなかったとするものや[9]、ラットの胸髄挫傷に対して、効果がなかったとするものもある[32]。これらの SCI に対する BMSCs 移植治療効果の相違は、さらなる研究によって解決が求められるであろう。

ポリエチレングリコール(PEG)投与は、げっ歯類の脊髄疾患において有効な治療法であると報告されている[5,8,20]。PEG は、損傷を受けた細胞膜を機械的に修復し、脊髄損傷の急性期に脊髄の二次損傷を軽減する効果がある[5,8,20]。したがって、ヒト、げっ歯類の BMSCs 移植、PEG 投与の研究に基づいて、我々は、これらの単独治療に比べ、BMSCs 移植と PEG 投与の併用によって脊髄神経再生が良好な結果を示すのではないかと仮説をたてた。

そこで本研究では、SCI の急性期モデルマウスにおいて BMSCs 移植と PEG 投与の併用がどのような治療効果をもたらすかを、運動機能、脊髄の免疫組織化学染色によって評価した。

材料と方法

骨髄採取と BMSC の培養

細胞移植に用いた細胞の採材には ICR マウス（6 週齢、雄）を用いた。ICR マウスはペントバルビタール（ソムノペンチル、共立製薬株式会社）50mg/kg を腹腔内投与して深麻酔下で両後肢を採取し、大腿骨と脛骨の近位端と遠位端を切断し、23G の注射針、DMEM 培地 2.0ml 入りシリンジを用いて、髄腔内の骨髄液を押し出し無菌的に採取した。BMSCs の培養法についてはラット由来 BMSCs の培養法を参照した[10]。採取した骨髄液を無菌的に 10ml の Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, CA, U.S.A.)に 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, CA, U.S.A.), Pen/Strep(penicillin 50 U/ml and streptomycin 50 µg/ml), 2.5µg/ml アンホテリシン B を添加した細胞培養ボトルの培地に播種した。それらの BMSCs を含む培養液を 37°C、5%CO₂ のインキュベーター内に静置した。血球、浮遊細胞を除去する目的で播種 3 日後、その後は 4 日ごとに培地を交換した。細胞が培養ボトルの 70~80% をしめた時点で tryple Express (Invitrogen, CA, U.S.A.)溶液にて 37°C で 10 分間インキュベートし、このトリプシン処理を二回行い、三継代目を実験に用いた。

今回得られた三継代目の細胞は、CD44 および CD90 の表面抗原は陽性、CD45 の表面抗原は陰性であり、BMSCs とみなした[7,30]。

移植細胞の調整と標識

細胞移植に先立ち、移植細胞は carboxyfluorescein diacetate-succinimidyl ester (CFDA-SE) cell tracer kit (Invitrogen, CA, U.S.A.)を用いて標識した。まず、CFDA-SE(500 μ g)に 90 μ l の DMSO を加え、さらに PBS を 0.9ml 加え 1 μ M に調整した。BMSCs を培養したボトル内の培養液を捨て、PBS で洗浄した後、トリプシン処理により細胞をボトルから剥がした。その後、準備した試薬を加えて、15 分 37 $^{\circ}$ C でインキュベーター内に静置し、遠心分離後に上澄みを捨て、培養液を加え 30 分 37 $^{\circ}$ C でインキュベーター内に静置した。この作業をもう一度行い、細胞に標識した。その後、フェノールレッド不含の培養液を加え、 5×10^4 cells/ μ l に調整し、移植に用いた。細胞移植 2 週間後、4 週間後に蛍光標識細胞は蛍光顕微鏡にて観察した。

外科的手技

ICR マウス (8 週齢、BW: 30g、雌 36 匹) を用いて以下のような手技で脊髄損傷 (SCI: spinal cord injury) モデルを作製した。ICR マウスはペントバルビタール 50mg/kg を腹腔内投与して麻酔下にて実体顕微鏡下で背側正中切開により第 10 胸椎へアプローチし、棘突起をロンジュールを用いて切除した。その後、電動式骨外科用ドリル (オサダサクセス-40M、長田電機工業株式会社) を用いて背側椎弓切除を行い、脊髄を露出させ、11 号メスにて脊髄を

完全切断させた。マウスは無作為にそれぞれ 8 匹ずつ 4 つの実験群に分けた。control 群は、SCI 後に 10 μ l の DMEM を注入した群とし、BMSCs 移植群は、SCI 後に BMSCs 移植をした群とし、PEG 移植群は、SCI 後に PEG を投与した群とし、BMSCs と PEG を併用した群は、SCI 後に BMSCs 移植と PEG 投与を併用した群とし、それぞれ control 群、BMSCs 群、PEG 群、BMSCs+PEG 群とした。細胞移植は 1 \times 10⁵cells/ μ l の BMSC を 12 μ l の DMEM に懸濁し、Hamilton syringe (Hamilton Company, NV, U.S.A.) を用いて脊髄損傷部位の頭側、尾側のそれぞれ 3 箇所、計 6 箇所に SCI 後ただちに注入した(それぞれの注入箇所に 2 μ l ずつ計 12 μ l)。PEG (Polyethylene glycol 4000、50% w/v in PBS、Sigma Aldrich、U.S.A.) は 10 μ l を前述の 6 箇所に注入した (10 μ l を 6 箇所に等分)。BMSCs+PEG 群において BMSCs 移植は上述のように行い、PEG 投与は 10 μ l を脊髄損傷部に滴下した。

PCR による雄由来の BMSCs の検出

移植後 2 週間と 4 週間の雌 ICR マウスと control 群の雌 ICR マウスをペントバルビタール 50mg/kg を腹腔内投与して深麻酔後、粉碎した氷の上において 4 $^{\circ}$ C を保ちながらそれぞれ頸髄、病変部位の胸髄、腰髄 (以下、順不同で C,T,L) のサンプルを 25mg 以上採取した。サンプルは 1.5ml エッペンチューブに入れて 4 $^{\circ}$ C に保った。

DNA の抽出には QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用し、PCR 法によってレシピエント雌マウスの sex determination region on the Y chromosome (*Sry*) gene の有無の

判定を行った。*Sry* gene のプライマーは (sense primer; TGTCACAGAGGAGTGGCATT and antisense primer; CAGGCTGCCAATAAAAGCTTTG) を使用し、162bp に増幅した。PCR の条件は 94°C 2 分間のインキュベーション後、94°C 30 分間、57°C 30 分間、72°C 30 分間を 1 サイクルとして計 38 サイクルを行い、最後に 4°C 99 分間のインキュベーションをした。PCR 産物はそれぞれ別の 2%アガロースゲル電気泳動を使用し、エチジウムブロマイドにて染色した。評価にはそれぞれ、陽性 (雄マウスゲノム DNA) 対照と陰性 (雌マウスゲノム DNA) 対照を使用した。

免疫染色の分析

既存または再生した神経細胞を評価するために、術後 4 週間のマウスにペントバルビタールを 50mg/kg で腹腔内投与して深麻酔下で経心的にザンボニ液 (和光純薬株式会社, 大阪) を用いて灌流固定を行った。病変部位頭尾側約 1cm で脊椎を取り出してザンボニ液中に一晩浸漬させてから、脊椎から脊髄を露出させた。その後、10%スクロース/0.1M PBS(4°C)で浸漬した後、15%スクロース/0.1M PBS(4°C)、最後に、20%スクロース/0.1M PBS(4°C)に浸漬させた。浸漬完了は組織が沈みきったことを目安とした。組織はドライアイスで冷却しながら OCT コンパウンド (Sakura Finetek, 東京) で包埋し、凍結切片作製まで -80°C にて冷却保存した。クリオスタット法により、脊髄を矢状断で 8 μ m に薄切して Amino Silane (APS) コート付きスライドガラス (松浪ガラス株式会社, 大阪) に付着させてドライヤー

にて 30 分間、風乾させ免疫組織化学染色に使用することとした。非特異的反応を阻止するため、凍結切片を PBS で調整した 3% スキムミルクで室温に 30 分間適用した。1 次抗体は抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1:50, Monoclonal mouse anti-GFAP, Progen, Heidelberg, Germany)、microtubule-associated protein-2 (MAP-2; 1:100, Polyclonal rabbit anti-MAP-2, Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.) を使用し、各スライドを 4°C で一晩インキュベートさせた。2 次抗体はそれぞれ、goat anti-rabbit IgG-FITC (1:100, Santa Cruz Biotechnology) と donkey anti-rabbit IgG-Rhodamine (1:100, Santa Cruz Biotechnology) を使用し、室温で 1 時間インキュベートした。続いて Hoechst 33258 (1:1,000, Dojindo Molecular Technologies Inc., 熊本) を室温にて 15 分間反応させ、核の染色をした。Goat anti-rabbit IgG-FITC (1:100) と goat anti-mouse IgG2a-Rhodamine (1:100) はそれぞれ二重染色のための 2 次抗体として用いた。ブロッキング処理の前後、1 次抗体反応、2 次抗体反応、核染色後は PBS-T (0.05% Tween20 加 PBS) で 3 回各 5 分間浸漬し洗浄した。細胞は蛍光顕微鏡 (Eclipse TE2000-U, Nikon, 東京) を用いて各蛍光色素に適したフィルターで観察した。また、脊髄損傷部位での神経細胞の評価をするために、グリア瘢痕内で無作為に選んだ重複しない 5 箇所における神経陽性細胞数を数値化した。

運動機能評価

運動機能は両後肢を Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) Locomotor Rating Scale (以下 BBB スコ

ア) [2] を用いて脊髄損傷後、1、7、14、21、28 日で各実験群 8 匹ずつ評価した。

統計処理

すべてのデータは平均±標準誤差で示しており、4 群間を比較するものとして Kruskal-Wallis 検定を用いた。有意水準を 0.05%としてそれ未満であれば有意差ありと判定した。

結果

移植蛍光標識細胞の動態

移植後 2 週間では蛍光標識細胞は脊髄損傷部付近で認められたが、GFAP 陽性細胞と接してはいなかった。移植後 4 週間では蛍光標識細胞は認められなかった (図 1)。

PCR による雄由来の BMSCs の検出

BMSCs 移植後 2 週間では *sry* 遺伝子はレシピエント雌マウスの損傷部位である胸髄に検出され、腰髄でもわずかに検出された。移植後 4 週間では *sry* 遺伝子は損傷部位である胸髄のみ検出された (図 2)。

免疫組織化学的分析

正常マウスの胸髄の免疫組織化学染色では GFAP 陽性細胞は灰白質、白質全域に認められたが、特に中心管周囲に顕著に存在した。MAP-2 陽性細胞は白質には認められなかったが、灰白質には全域に分布した。

control 群において GFAP 陽性細胞は灰白質、白質全域に認められ、灰白質の頭側から損傷部位に向かって徐々に増加した。MAP-2 陽性細胞は白質に認められず、灰白質に全域で

認められた。ごく少数の神経細胞がグリア瘢痕内に認められた (図 3 および 4)。BMSCs 群において control 群と比較し、神経細胞が損傷部位頭側からグリア瘢痕内にかけて多数存在する傾向が確認された (図 3 および 4)。PEG 移植群において GFAP 陽性細胞、MAP-2 陽性細胞の分布数は control 群と類似していたが、control 群と比較すると、より多くの神経細胞がグリア瘢痕内に認められた (図 3 および 4)。BMSC+PEG 群において、GFAP 陽性細胞と MAP-2 陽性細胞の分布数は BMSCs 群と類似していたが、control 群と比較すると、有意に多数の神経細胞が損傷部位頭側からグリア瘢痕内に存在することが認められた (図 3 および 4)。

運動機能評価

BBB スコアによる評価は SCI 後 28 日まで行った。後肢の運動機能の有意な改善は PEG 群および BMSCs+PEG 群で control 群と比較し、損傷後 28 日目に認められた。BMSCs 群においても control 群と比較し、後肢の運動機能の改善傾向は認められたが、有意差は認められなかった。BMSCs+PEG 群において BMSCs 群および PEG 群と比較して有意な BBB スコアの上昇は認められなかった (図 5)。

考察

本実験において急性期の SCI モデルマウスに対する BMSCs 移植、PEG 投与および BMSCs 移植と PEG 投与の併用はそれぞれ運動機能の改善、回復に効果的であった。しかし BMSCs 移植と PEG 投与の組み合わせで、我々が期待していたような運動機能の改善や神経細胞の動態変化は BMSCs 単独移植と比較して認められなかった。

移植された BMSCs の働きについてはいまだに不明なことが多いが、いくつかの研究で BMSCs は、塩基性線維芽細胞成長因子、神経成長因子、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) およびインスリン様成長因子 I などを含む神経栄養因子や成長因子を分泌することによって間接的に神経保護効果を示しているのではないかと報告されている[6,11]。近年では、BDNF や GDNF は損傷した中枢神経 (CNS) において広範な軸索の発芽を誘発すると報告された[11]。一方、移植された BMSCs は移植先の脊髄に組み込まれて軸索や軸索機能の再建に寄与するという報告もある[6]。さらに、神経と共培養すると約 30%の BMSCs は細胞融合の根拠なしに神経の形質を獲得することも報告されている[11]。また、BMSCs は神経と同様な電気生理学的機能も獲得することができる[17]ことや、神経特異的な受容体の発現も報告されている[31]ことから、移植された BMSCs による運動機能改善効果は複数の機序が関わっているかもしれない[11]。本実験で BMSCs 群およ

び BMSCs+PEG 群において多数の神経細胞が損傷部位頭側からグリア瘢痕にかけて存在したのは、神経再生を示唆し、BMSCs 移植の有益な効果によると考えた。実際に細胞移植 2 週間後に雄由来の BMSCs はレシピエントである雌の損傷部位の胸髄で検出された。移植 BMSCs はマトリックスプロテアーゼなどのいくつかのプロテアーゼを分泌することにより、グリア瘢痕内の細胞外マトリックスを分解して脊髄神経からの神経突起伸長を促進する [28]。したがって、移植された BMSCs は間接的に神経保護効果を果たし [27]、移植蛍光標識細胞も神経細胞と密接していなかったことから、分化して神経の形質を得たと可能性は低いと思われる。

PEG は細胞膜をシールすることで損傷を受けた細胞膜の機械的修復をし、外傷性の脳損傷や SCI において二次的な軸策切断（二次損傷）を軽減することが示されている [5,20]。これらの作用結果は SCI 後のげっ歯類の運動機能の回復や対麻痺のイヌにおける臨床症例で証明されている [5]。さらに、SCI における急性期の PEG 治療は無損傷な脊髄実質の容量を有意に増やし、嚢胞性空洞形成の容量を有意に減少させる [5,8]。本実験で PEG 群において運動機能の改善は認められたが、その改善は細胞膜の修復と関連があるのかもしれないと考えられる。言い換えれば、運動機能の改善は脊髄の二次損傷の軽減と関連するのかもしれない。その理由としてグリア瘢痕内における神経細胞の存在が少数であったことから、神経細胞が PEG によってシールされたことが示唆された。

本実験で BMSC+PEG 群と BMSC 群において後肢の運動機能改善に有意差が認められな

かった理由として、BMSCs と PEG の神経再生と神経保護の機序が関係あるのかもしれないと考えられる。移植 BMSCs は神経栄養因子や成長因子を分泌し、間接的に神経保護をし、神経再生を促す[6,11,28]。PEG は SCI の急性期において細胞膜をシールし、損傷を受けた細胞膜を機械的に修復することによって二次損傷を軽減する[5,20]。結局、移植 BMSCs は細胞膜を PEG にシールされたことで、神経栄養因子や成長因子を分泌し、間接的に神経保護をし、神経再生を促すという機能が十分に果たせなかった可能性がある。我々の実験結果により、急性期の SCI において PEG 投与は BMSCs の十分な効果を発揮させられないことが示唆された。また、過去の研究で BMSCs の移植はラットにおいて SCI 後の急性期、亜急性期ならびに慢性期においても有効だとする報告がある[12,25,33]。したがって、SCI 後の急性期に PEG を投与し、細胞をシールした PEG の効果が消失した時期に遅れて BMSCs 移植をすれば、より相加的な効果により SCI マウスの運動機能の改善を導けるかもしれない。マウスやラットにおいて SCI 後 7-14 日での細胞移植が運動機能改善に効果的であるという報告の一方、急性期や慢性期での細胞移植は運動機能改善がほとんど認められないという報告がある[12,24]。

本研究は、急性期の SCI モデルマウスに対する BMSCs 移植、PEG 投与および BMSC 移植と PEG 投与の併用における運動機能の改善効果についてであるが、BMSCs も PEG も運動機能の改善が認められたものの、相加効果は認められなかった。また、急性期の SCI において PEG 投与が BMSCs の運動機能改善効果を妨げることはなかった。本研究は、急

性期の SCI マウスに BMSCs と PEG の併用治療の効果について評価した初めての報告であるが、BMSCs の移植時期についてはさらなる研究が必要であり、さらに長期間での実験も必要である。本研究は、臨床における SCI の細胞移植治療戦略の科学的検証の一助になるかもしれない。

参考文献

1. Azari, M. F., Mathias, L., Ozturk, E., Cram, D. S., Boyd, R. L. and Petratos, S. 2010. Mesenchymal stem cells for treatment of CNS injury. *Curr. Neuropharmacol.* **8**: 316-323.
2. Basso, D. M., Beattie, M. S. and Bresnahan, J. C. 1995. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma* **12**: 1-21.
3. Beresford, J. N., Bennett, J. H., Devlin, C., Leboy, P. S. and Owen, M. E. 1992. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J. Cell Sci.* **102** (Pt 2): 341-351.
4. Björklund, A. and Lindvall, O. 2000. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat. Neurosci.* **3**: 537-544.
5. Borgens, R. B., Shi, R. and Bohnert, D. 2002. Behavioral recovery from spinal cord injury following delayed application of polyethylene glycol. *J. Exp. Biol.* **205**: 1-12.
6. Chiba, Y., Kuroda, S., Shichinohe, H., Hokari, M., Osanai, T., Maruichi, K., Yano, S., Hida, K. and Iwasaki, Y. 2010. Synergistic effects of bone marrow stromal cells and a Rho kinase (ROCK) inhibitor, fasudil on axon regeneration in rat spinal cord injury. *Neuropathology* **30**: 241-250.

7. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. and Horwitz, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**: 315-317.
8. Duerstock, B. S. and Borgens, R. B. 2002. Three-dimensional morphometry of spinal cord injury following polyethylene glycol treatment. *J. Exp. Biol.* **205**: 13-24.
9. Himes, B. T., Neuhuber, B., Coleman, C., Kushner, R., Swanger, S. A., Kopen, G. C., Wagner, J., Shumsky, J. S. and Fischer, I. 2006. Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord. *Neurorehabil. Neural Repair* **20**: 278-296.
10. Hiyama, A., Mochida, J., Iwashina, T., Omi, H., Watanabe, T., Serigano, K., Tamura, F. and Sakai, D. 2008. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. *J. Orthop. Res.* **26**: 589-600.
11. Hokari, M., Kuroda, S., Shichinohe, H., Yano, S., Hida, K. and Iwasaki, Y. 2008. Bone marrow stromal cells protect and repair damaged neurons through multiple mechanisms. *J. Neurosci. Res.* **86**: 1024-1035.
12. Ide, C., Nakai, Y., Nakano, N., Seo, T.B., Yamada, Y., Endo, K., Noda, T., Saito, F., Suzuki, Y., Fukushima, M. and Nakatani, T. 2010. Bone marrow stromal cell transplantation for treatment of sub-acute spinal cord injury in the rat. *Brain Res.* **1332**: 32-47.

13. Iwashita, Y., Kawaguchi, S. and Murata, M. 1994. Restoration of function by replacement of spinal cord segments in the rat. *Nature* **367**: 167-170.
14. Jiang, J., Lv, Z., Gu, Y., Li, J., Xu, L., Xu, W., Lu, J. and Xu, J. 2010. Adult rat mesenchymal stem cells differentiate into neuronal-like phenotype and express a variety of neuro-regulatory molecules in vitro. *Neurosci. Res.* **66**: 46-52.
15. Jung, D. I., Ha, J., Kang, B. T., Kim, J. W., Quan, F. S., Lee, J. H., Woo, E. J. and Park, H. M. 2009. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *J. Neurol. Sci.* **285**: 67-77.
16. Kadiyala, S., Young, R. G., Thiede, M. A. and Bruder, S. P. 1997. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant.* **6**: 125-134.
17. Kohyama, J., Abe, H., Shimazaki, T., Koizumi, A., Nakashima, K., Gojo, S., Taga, T., Okano, H., Hata, J. and Umezawa, A. 2001. Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* **68**: 235-244.
18. Lennon, D. P., Haynesworth, S. E., Young, R. G., Dennis, J. E. and Caplan, A.I. 1995. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* **219**: 211-222.

19. Li, Y., Field, P. M. and Raisman, G. 1997. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science* **277**: 2000-2002.
20. Liu-Snyder, P., Logan, M. P., Shi, R., Smith, D. T. and Borgens, R. B. 2007. Neuroprotection from secondary injury by polyethylene glycol requires its internalization. *J. Exp. Biol.* **210**: 1455-1462.
21. Martin, D., Robe, P., Franzen, R., Delrée, P., Schoenen, J., Stevenaert, A. and Moonen, G. 1996. Effects of Schwann cell transplantation in a contusion model of rat spinal cord injury. *J. Neurosci. Res.* **45**: 588-597.
22. McDonald, J. W., Liu, X. Z., Qu, Y., Liu, S., Mickey, S. K., Turetsky, D., Gottlieb, D. I. and Choi, D. W. 1999. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat. Med.* **5**: 1410-1412.
23. Nishida, H., Nakayama, M., Tanaka, H., Kitamura, M., Hatoya, S., Sugiura, K., Suzuki, Y., Ide, C. and Inaba, T. 2011. Evaluation of transplantation of autologous bone marrow stromal cells into the cerebrospinal fluid for treatment of chronic spinal cord injury in dogs. *Am. J. Vet. Res.* **72**: 1118-1123.
24. Nishimura, S., Yasuda, A., Iwai, H., Takano, M., Kobayashi, Y., Nori, S., Tsuji, O., Fujiyoshi, K., Ebise, H., Toyama, Y., Okano, H. and Nakamura, M. 2013. Time-dependent changes in the

microenvironment of injured spinal cord affects the therapeutic potential of neural stem cell transplantation for spinal cord injury. *Mol. Brain* **6**: 3.

25. Ohta, M., Suzuki, Y., Noda, T., Ejiri, Y., Dezawa, M., Kataoka, K., Chou, H., Ishikawa, N., Matsumoto, N., Iwashita, Y., Mizuta, E., Kuno, S. and Ide, C. 2004. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp. Neurol.* **187**: 266-278.

26. Saito, F., Nakatani, T., Iwase, M., Maeda, Y., Murao, Y., Suzuki, Y., Fukushima, M. and Ide, C. 2012. Administration of cultured autologous bone marrow stromal cells into cerebrospinal fluid in spinal injury patients: a pilot study. *Restor. Neurol. Neurosci.* **30**: 127-136.

27. Sarnowska, A., Braun, H., Sauerzweig, S. and Reymann, K. G. 2009. The neuroprotective effect of bone marrow stem cells is not dependent on direct cell contact with hypoxic injured tissue. *Exp. Neurol.* **215**: 317-327.

28. Shichinohe, H., Kuroda, S., Tsuji, S., Yamaguchi, S., Yano, S., Lee, J. B., Kobayashi, H., Kikuchi, S., Hida, K. and Iwasaki, Y. 2008. Bone marrow stromal cells promote neurite extension in organotypic spinal cord slice: significance for cell transplantation therapy. *Neurorehabil. Neural Repair* **22**: 447-457.

29. Wakitani, S., Saito, T. and Caplan, A. I. 1995. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* **18**: 1417-1426.

30. Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J. and Black, I. B. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* **61**: 364-370.
31. Yano, S., Kuroda, S., Shichinohe, H., Seki, T., Ohnishi, T., Tamagami, H., Hida, K. and Iwasaki, Y. 2006. Bone marrow stromal cell transplantation preserves gammaaminobutyric acid receptor function in the injured spinal cord. *J. Neurotrauma* **23**: 1682-1692.
32. Yoshihara, H., Shumsky, J. S., Neuhuber, B., Otsuka, T., Fischer, I. and Murray, M. 2006. Combining motor training with transplantation of rat bone marrow stromal cells does not improve repair or recovery in rats with thoracic contusion injuries. *Brain Res.* **1119**: 65-75.
33. Zurita, M. and Vaquero, J. 2004. Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation. *Neuroreport* **15**: 1105-1108.

図・表

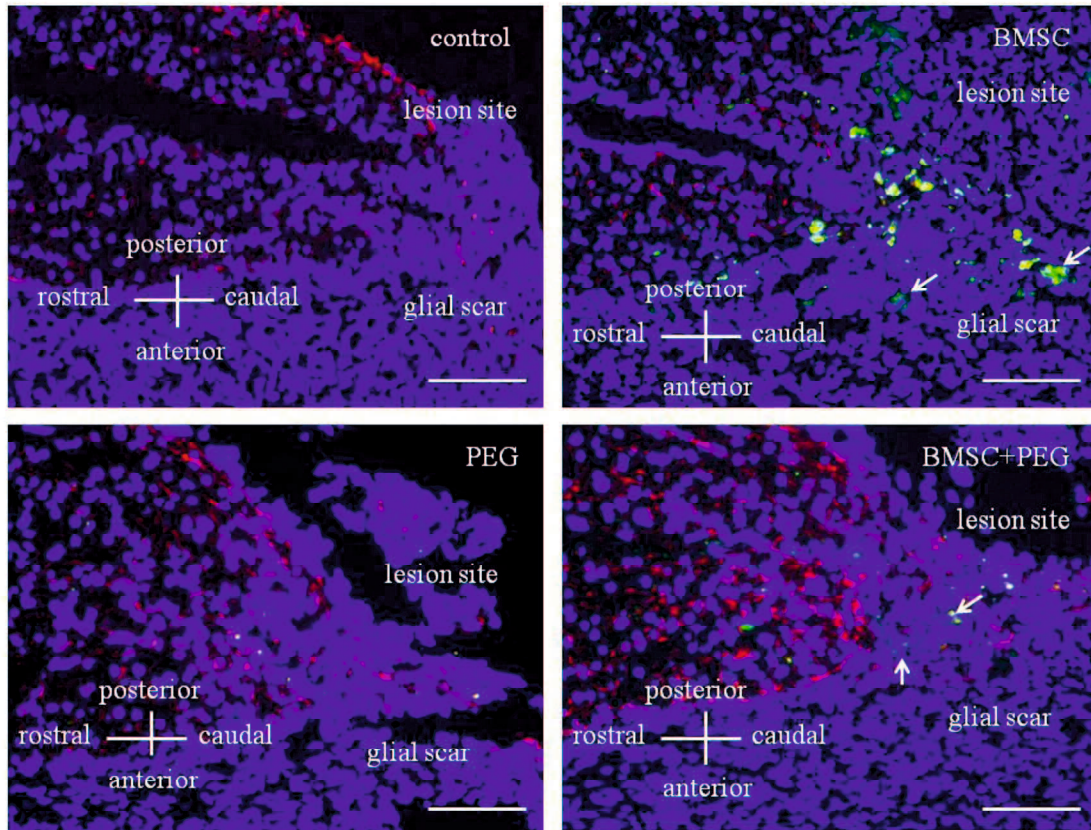


図1 外科手術後2週目における移植蛍光標識細胞の動態: GFAP (赤色) および核 (青色)

ControlおよびPEG群において蛍光標識細胞はグリア搬痕内に認められなかった。BMSCお

よびBMSC+PEG群において蛍光標識細胞はグリア搬痕内に認められた(矢印)。Bar=500 μm

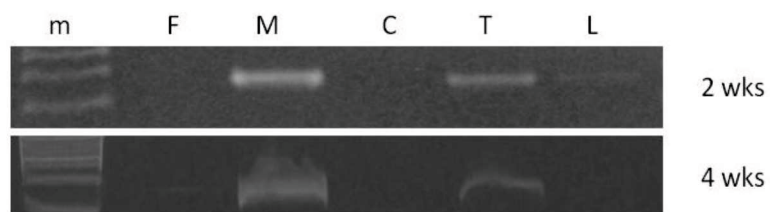


図2 PCRによるBMSCs移植後2および4週目のレシピエント雌マウスにおけるドナー雄の *sry* 遺伝子検出の結果

(m) Marker, (F) Genomic DNA (female), (M) Genomic DNA (male), (C) Genomic DNA extracted from cervical cord, (T) Genomic DNA extracted from lesion site, (L) Genomic DNA extracted from lumber cord.

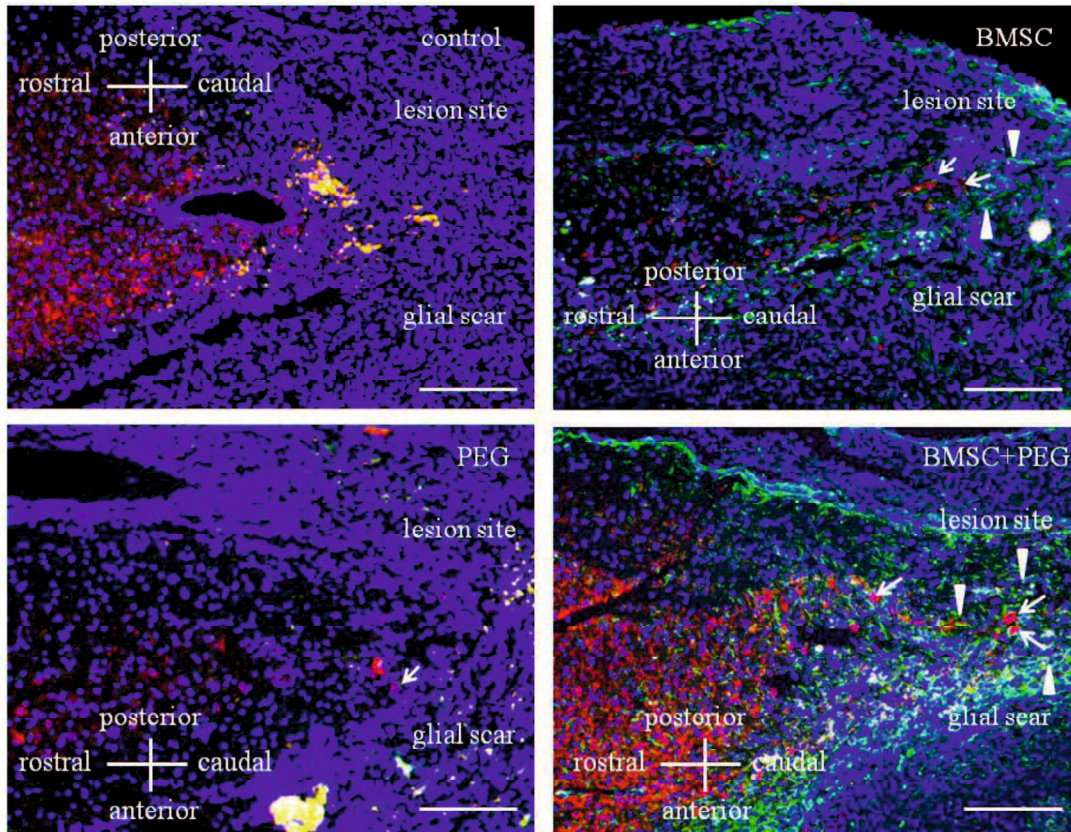


図3 外科手術後4週目の胸髄における免疫組織化学染色の結果

脊髄は二重染色によってGFAP (緑色)、MAP-2(赤色)、および核(青色)を示す。Bars=750 μm

control群においてごく少数の神経細胞がグリア瘢痕内に認められた。BMSCs群においてcontrol群と比較し、神経細胞が損傷部位頭側からグリア瘢痕内にかけて多数存在する傾向が確認された。MAP-2陽性細胞(矢印)、 GFAP陽性細胞(矢頭)。PEG移植群においてcontrol群と比較すると、より多くの神経細胞がグリア瘢痕内に認められた。MAP-2陽性細胞(矢印)。

BMSC+PEG群において、control群と比較すると、有意に多数の神経細胞が損傷部位頭側からグリア瘢痕内に存在することが認められた。MAP-2陽性細胞(矢印)、GFAP陽性細胞(矢頭)。

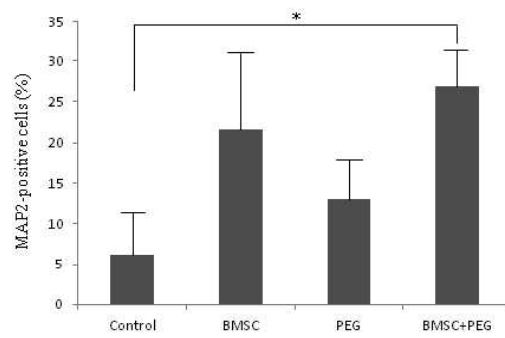


図4 外科手術後4週目のグリア搬痕内におけるMAP-2陽性細胞の割合 Bars indicate means

± SEM. * = Significantly ($P < 0.05$) different from control value

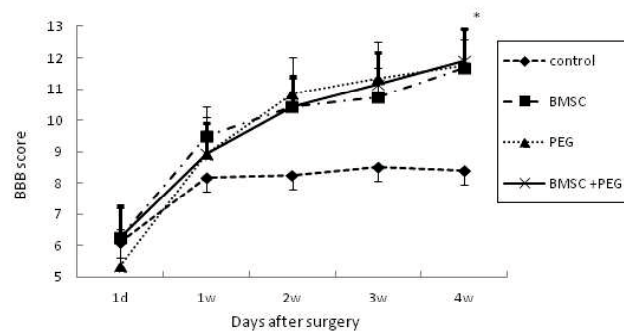


図5 外科手術後4週目までのBBBスコアによる運動機能評価

Bars indicate means \pm SEM. * = Significantly ($P < 0.05$) different PEG and BMSC+PEG value from control value.

総合考察

脊髄損傷(SCI)に対してこれまでに様々な治療法が研究されてきたが、周囲組織の安定化以外に有用な治療法は確立されていない。近年、中枢神経の再生を促す治療として、生体の幹細胞を用いた再生医療が注目され、中でも骨髄間質細胞(BMSCs)移植治療法の試みが数多くなされている。しかし、犬の BMSCs に関する報告は少なく、移植治療効果やその作用機序など不明な点が多い。

本研究の第一章では、犬の BMSCs の性状解析を実施し、人・マウスで報告されている骨髄間質細胞表面抗原と比較したところ、犬 BMSCs は CD29⁺, CD44⁺, CD90⁺, CD11b⁻, CD45⁻ の接着細胞群であることが確認できた。また、犬 BMSCs は脂肪細胞および骨細胞にも分化誘導可能であることが確認できた。さらに、*in vivo* での治療効果を検討するために、重症免疫不全マウスを用いた SCI モデルに犬 BMSCs 異種移植治療を実施し、マウスのロコモーターニューロン運動機能について検討した。犬 BMSCs 治療群は未治療群に比べて、マウスの運動機能が有意に改善した。移植 BMSCs の動態を検索するために、ドナーには雄犬をレシピエントには雌マウスを用い、さらに犬 BMSCs を蛍光標識させたところ、レシピエントマウス脊髄中には少なくとも 2 週間は犬 BMSCs が存在し、雄犬由来 Sry 遺伝子に対する PCR 検査では移植 4 週間後でも検出可能であった。以上の結果から、犬 BMSCs は、SCI マウス

に対して運動機能回復効果をもつことが示された。

BMSCs は外胚葉由来である神経細胞にも分化可能であり、神経細胞に分化誘導させた細胞源を用いた方が、より治療効果を高めるかもしれないことから、近年、*in vitro* において BMSCs を神経細胞へと分化誘導させたという研究が数多く報告されている。そこで、本研究の第二章では、現在までに数多く報告された NLCs への BMSCs 分化誘導の研究を参考にして犬 BMSCs の NLCs への分化誘導を行い、移植可能な細胞であるか、推測する視点から、形態的特徴、長期生存性、大量生産性および継代培養が可能かという点において評価した。本実験の結果から *in vitro* の適切な環境下で犬 BMSC から神経特有の形態を持ち、Nestin, MAP-2, β III-tubulin および GFAP などの神経マーカーを持つ細胞を能率的に分化誘導して作り出せることが示唆された。分化誘導した細胞の多くは Nestin 陽性であり、その後も数継代可能であったことから、未熟な細胞群であることが明らかになった。この結果は、移植治療先の標的組織内で増殖可能な細胞群が得られたという意味はあるかもしれないが、いっぽうで分化誘導が制御できていない可能性が示唆された。

第三章では、BMSCs 移植治療の効果をより高めるために、分化誘導に依らない方法を検討した。ポリエチレングリコール(PEG)は、脊髄損傷モデル動物における急性期の神経組織の修復と機能回復に有用であり、犬の椎間板ヘルニア症に対して有用であると報告されている。SCI 急性期における BMSCs 細胞自体の保護、損傷脊髄の保護効果を期待して、BMSCs 移植治療と PEG 治療との併用効果について検討した。実験群として、無治療群、BMSCs 移

植群、PEG 投与群および BMSCs +PEG 併用群に別け、移植細胞の動態検索、PCR による移植細胞の検出、免疫組織化学染色による神経細胞の評価および運動機能評価について比較検討した。無治療群以外のすべての治療群で運動機能の改善が認められた。しかし BMSCs+PEG 併用群では、相乗作用も相加作用も認められなかった。移植 BMSCs は細胞膜を PEG にシールされたことで、神経栄養因子や成長因子を分泌し、間接的に神経保護をし、神経再生を促すという機能が十分に果たせなかった可能性があり、急性期の SCI において PEG 投与は BMSCs の十分な効果を発揮させられないことが示唆された。BMSCs 移植と PEG 投与は BMSCs 移植時期を遅らせることで相加作用を惹起し、SCI マウスの運動機能の改善を導けるかもしれないと考えられた。

以上の結果から、犬 BMSCs は SCI に対する有力な治療法であることが確認された。また、犬 BMSCs は *in vitro* の適切な環境下で神経様特徴をもち、神経マーカーを発現する細胞に効率よく分化誘導可能なことも確認されたが、これらの NLCs は成熟神経細胞ではないことや、機能については不明であることから、移植細胞源とするためには、さらなる研究が必要である。今回の研究では、PEG 治療は BMSCs 移植治療効果を増強する効果は認められなかったが、BMSCs 移植時期を遅らせた研究が必要であり、さらに長期間の観察が必要であると考えられた。マウス異種移植モデルは、これらの機能を明らかにしていく上で有用な実験系であると考えられた。

本研究で、SCI に対する BMSCs 移植治療は一定の効果が認められるものの、その治療効

果や作用機序および移植時期などには様々な不明な点があり、さらなる研究により、改善の余地が大いにあるであろう。本研究は SCI に対する、より効率的な BMSCs 移植治療の一助となり得るであろう。

謝辞

本稿を終えるに臨み、長期にわたり終始懇切なるご指導をいただきました、山口大学共同獣医学部臨床獣医学講座外科分野の田浦保穂教授、谷健二准教授、仲澤宏助教に深く感謝いたします。

また、遠方よりご指導をいただきました、鳥取大学共同獣医学科臨床獣医学講座獣医外科学研究室の岡本芳晴教授に感謝の意を表すとともに、深く御礼申し上げます。

山口大学共同獣医学部臨床獣医学講座獣医放射線学分野の中市統三教授、同動物医療センター伴侶動物医療分野の板本和仁准教授、原口友也助教の叱咤激励に感謝し、心より御礼申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたり、ご協力をいただいた臨床獣医学講座外科分野の研究室の卒業生、在校生の皆様から心から感謝するとともに、本研究に供した動物たちのご冥福を心からお祈りいたします。