



脊髄損傷に対する磁気ターゲティング法を用いた神経幹細胞投与

(研究課題番号 17591574)

平成17年度～平成18年度

科学研究費補助金（基盤研究（C））研究成果報告書



平成19年3月

研究代表者 田中信弘
(広島大学病院 助手)

はしがき

外傷や疾患により一旦損傷した脊髄は再生せず重篤な後遺症を残す。脊髄損傷患者の肉体的・精神的苦痛は大きくその社会的損失も大きい。近年、再生治療の発達に伴い、脊髄再生の可能性に期待が寄せられている。特に神経前駆細胞は神経細胞やグリア細胞などの中枢神経系の構成細胞のいずれにも分化しうる能力を持ち、損傷脊髄の再生医療への臨床応用が期待されている。我々は神経前駆細胞に磁気ビーズを付着させた神経前駆細胞複合体を作製し、脊髄損傷モデルにその複合体を投与し、磁気を用いて誘導し神経前駆細胞を集積させることにより得られる軸索再生効果を調査した。

研究組織

研究代表者：田中信弘	広島大学	病院	助手
研究分担者：越智光夫	広島大学	大学院医歯薬学総合研究科	教授
研究分担者：安永裕司	広島大学	大学院医歯薬学総合研究科	客員教授
研究分担者：石田 治	広島大学	大学院医歯薬学総合研究科	助教授
研究分担者：望月 由	広島大学	病院	助教授

交付決定額（配分額）（単位千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	2,400	0	2,400
平成18年度	1,100	0	1,100
総計	3,500	0	3,500

研究発表

(1) 学会誌等

○ 濱崎貴彦, 田中信弘, 越智光夫, 磁気ターゲティング法による脊髄再生効果の促進を目指して—集積させた神経前駆細胞磁気ビーズ複合体が軸索伸長に与える影響—, 整形外科, 57 巻 p1320, 2006

○ Takahiko HAMASAKI, Nobuhiro TANAKA, Osamu ISHIDA, Shinobu YANADA, Naosuke KAMEI, Yasushi FUJIWARA, Koji NISHIDA, Kazuyoshi NAKANISHI, Patrick SHARMAN, Seiichi KAWAMATA and Mitsuo OCHI, Characterization of Labeled Neural Progenitor Cells for Magnetic Targeting, NeuroReport, Vol.16, pp 1641-5, 2005

(2) 口頭発表

○ Hamasaki T, Tanaka N, Kamei N, Nakanishi K, Nishida K, Ochi M. Magnetic

ally labeled neural progenitor cells, which are localized by magnetic force, promote corticospinal axon growth in organotypic co-cultures -New cell delivery system using magnetic targeting. 53rd Annual Meeting of ORS 2007. 2. 11

○ 濱崎貴彦 田中信弘 亀井直輔 柳田忍 中西一義 西田幸司 越智光夫 磁気ターゲティング法を目指した神経前駆細胞磁気ビーズ複合体が脊髄軸索伸長に与える影響 第21回日本整形外科学会基礎学術集会 2006. 10. 19

○ Hamasaki T, Tanaka N, Kamei N, Nakanishi K, Nishida K, Ochi M. Magnetically labeled neural progenitor cells, which are localized by magnetic force, promote corticospinal axon growth in organotypic co-cultures -New cell delivery system using magnetic targeting. 21st NASS Annual Meeting 2006. 9. 26

○ 濱崎貴彦 田中信弘 大石陽介 亀井直輔 柳田忍 中西一義 佐々木浩文 西田幸司 當天賢子 山田清貴 越智光夫 神経前駆細胞磁気ビーズ複合体が磁場存在下で脊髄軸索伸長に与える影響 集積させた神経前駆細胞は軸索伸長を促す？

脳・脊髄器官共存培養系を用いた検討- 第35回日本脊椎脊髄病学会 2006. 4. 21

○ 濱崎貴彦 田中信弘 大石陽介 亀井直輔 柳田忍 中西一義 佐々木浩文 西田幸司 當天賢子 山田清貴 越智光夫 神経前駆細胞磁気ビーズ複合体が磁場存在下で脊髄軸索伸長に与える影響 第5回日本再生医療学会総会 2006. 3. 8

○ 濱崎貴彦 田中信弘 石田 治 亀井直輔 柳田忍 中西一義 西田幸司 越智光夫 神経前駆細胞磁気ビーズ複合体が外磁場存在下で脊髄軸索伸長に与える影響 -脳・脊髄器官共存培養系を用いた検討- 第24回日本運動器移植・再生医学研究会 2005. 11. 12

○ 濱崎貴彦 田中信弘 石田治 奥田晃章 中西一義 藤原靖 西田幸司 亀井直輔 當天賢子 柳田忍 越智光夫 神経前駆細胞-磁気ビーズ複合体の作製およびその性質-脊髄再生のための磁気ターゲティング法による低侵襲的治療の試み (第一報) - 第20回日本整形外科学会基礎学術集会 2005. 10. 20

(3) 出版物

なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

研究成果

脊髄が損傷することで被る機能的・精神的・社会的影響の大きさから、世界中の多くの施設で脊髄再生を目指した研究が行われている。現在脚光を浴びている治療法の一つに細胞移植療法があり、神経前駆細胞や骨髄間質細胞などの移植が報告されている。細胞の移植方法としては動物モデルにおいて局所投与が行われてきたが、実際の臨床応用を念頭に置くとすでに易損性のある損傷脊髄に対しさらなる傷害を与えかねない。経静脈投与やくも膜下腔投与など、より低侵襲な方法が提唱されているが、局所投与と比較すると細胞自体の homing effect に期待するのみであるため移植効率の低さは否めない。細胞移植による作用機序の解明とともに、安全で効率的な移植方法の開発も重要な課題である。

一方、細胞を磁気で誘導・集積させる磁気ターゲティング法で細胞移植による効果を有効に引き出す研究が、軟骨¹⁾、腫瘍、肝臓²⁾などに対して行われている。その目指すものは、細胞の至適部位への誘導、集積させることでの効果促進、そして外科的手術さえも不要となる低侵襲投与である。

われわれはこの磁気ターゲティング法の脊髄損傷治療への応用を模索し基礎研究を始めた。まず GFP 陽性トランスジェニックラットの胎仔(胎生 15 日)の海馬から採取した細胞を bFGF 存在下に無血清培地にて浮遊培養した。約 2 週間の培養の後 GFP 陽性神経前駆細胞が、緑色の自家蛍光を発する細胞集塊 (Neurosphere) を形成した。続いて、磁気ビーズ (フェリスフェア 100C^R) を活性化させ、その活性化した磁気ビーズに RGDS ペプチドを結合させる。培養した Neurosphere と RGDS ペプチドを結合させた磁気ビーズとを癒合させラベリングした、神経前駆細胞・磁気ビーズ複合体を作製した (図 1)³⁾

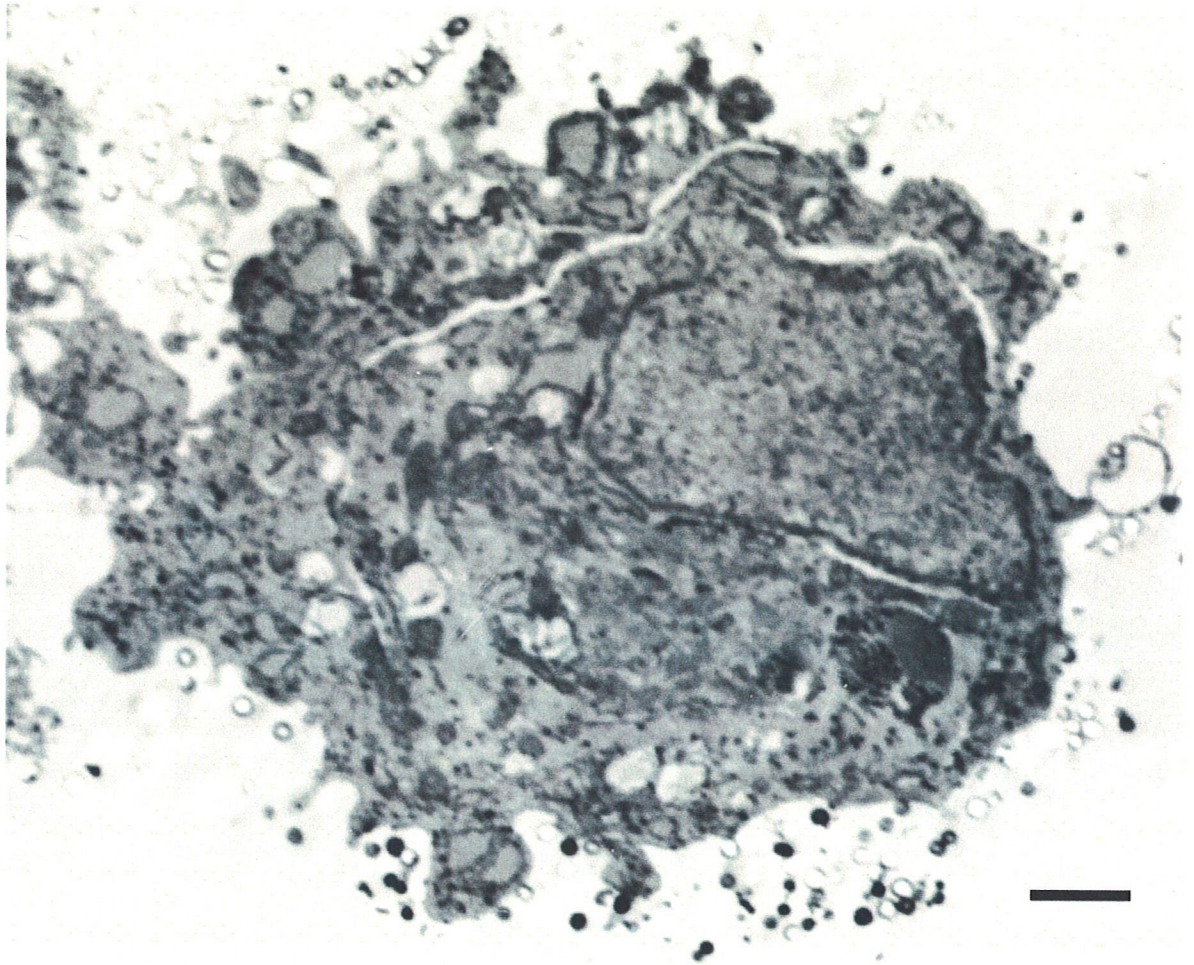


図1 神経幹細胞磁気ビーズ複合体 (Bar = 1 μm)

磁気ビーズは細胞内に取り込まれるのではなく、神経前駆細胞の表面に存在して複合体を形成し、そのほぼすべてが *nestin* 陽性であった。同数の複合体と非複合体を培養し比較した生存率では、有意差を認めなかった (図2)。

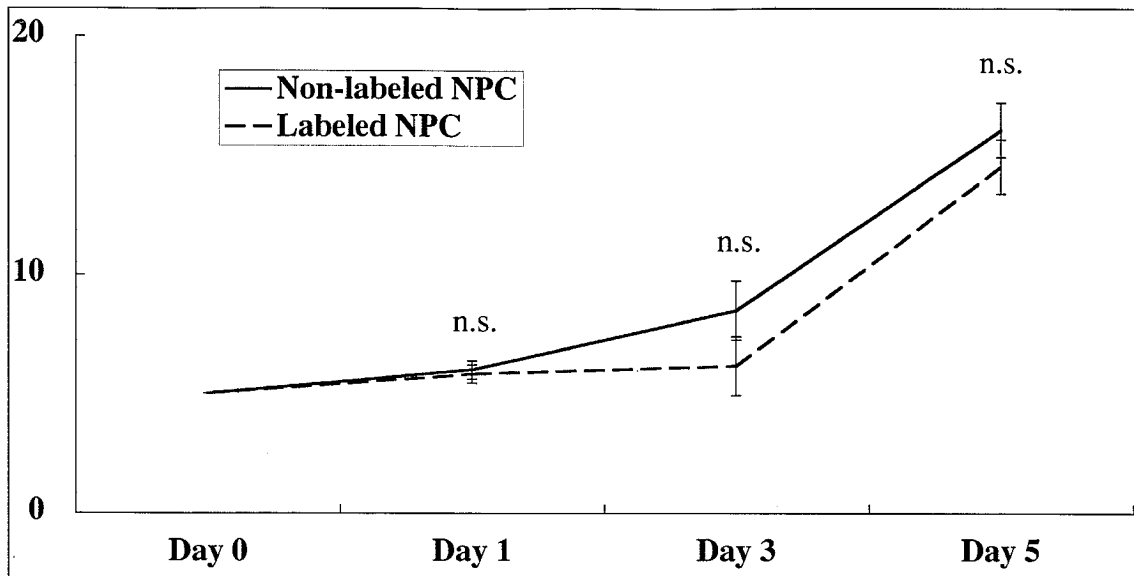


図 2

この複合体の neuron, oligodendrocyte, astrocyte への分化能は, 磁気ビーズを反応させていない非複合体と同様であった (図 3).

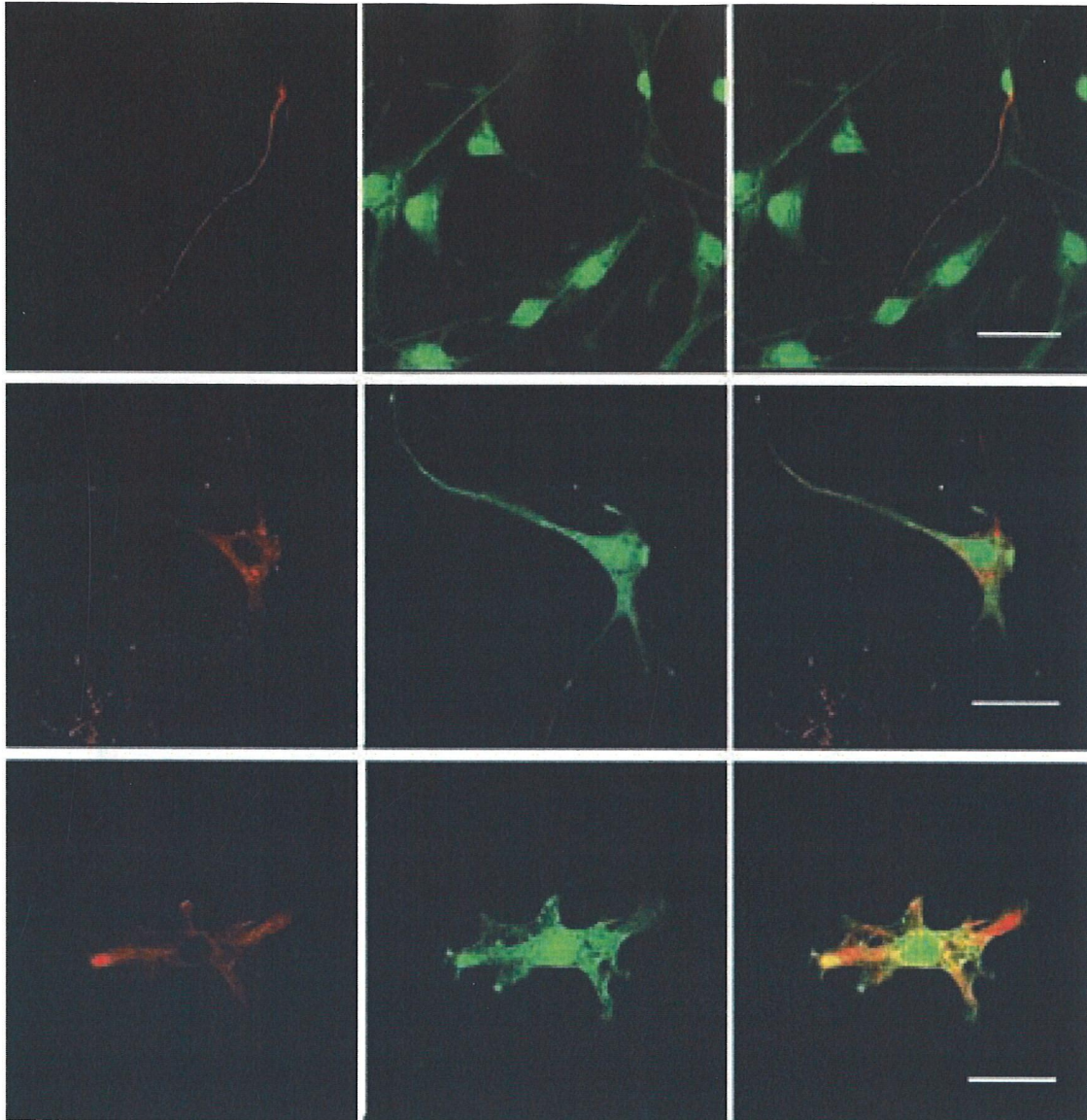


図 3

この複合体を *in vitro* で外磁場存在下に播種すると、外磁場により複合体は誘導されて磁石設置部へと集積した。つまり磁気ビーズでラベリングすることによる毒性や副作用を認めず、生存率、増殖能、分化能を保ちながら、外磁場による誘導能を獲得していることが確認できた。

続いて Oishi ら⁴⁾の開発した脊髄への軸索伸長を定量的に評価できる脳・脊髄器官共存培養法 (図 4 a) を用いて、複合体の軸索伸長に与える影響を検討した。この共存培養組織に外磁場なしで複合体と非複合体を移植すると、どちらの細胞も組織近傍に散在し (図 4 b, c), 組織内で伸長した軸索数はほぼ同等で有意差を認めず、磁気ビーズでラベリングすることによる影響が軸索伸長能力においても存在しなかった。

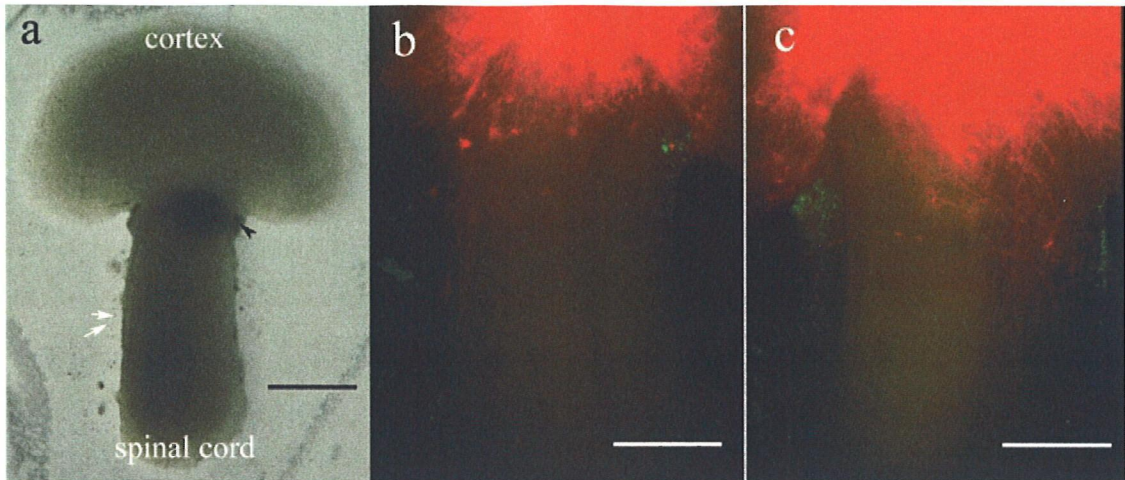


図 4

それに対し複合体を外磁場により組織周辺に集積させると軸索伸長は有意に（約 1.5 倍）促進されていた（図 5）。

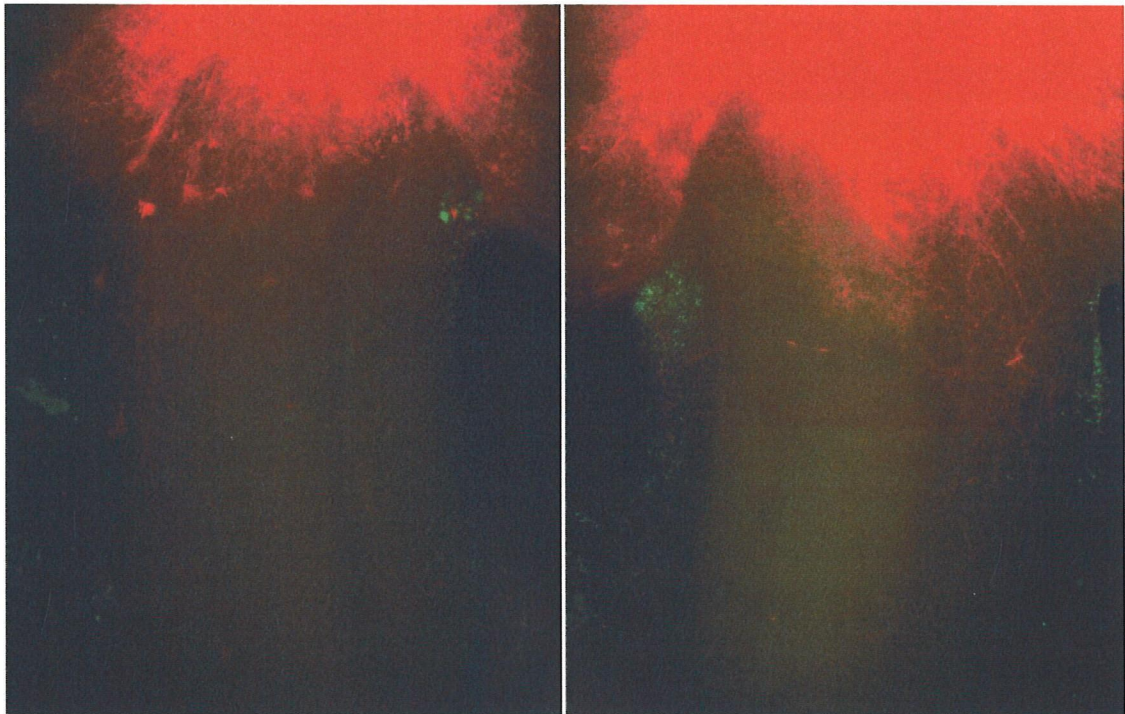


図 5

つまり供給に限界のある神経幹細胞を脊髄損傷部に集積させることで、より高い脊髄再生能力を発揮させる可能性があることが示された。さらに当科の西田らは脊髄損傷のない健常ラットのくも膜下腔に磁気ビーズでラベリングした骨髄間質細胞を投与し、胸椎椎弓切除部に設置した磁石周辺部に細胞を集積させることに成功している⁵⁾。

今後 *in vivo* で脊髄損傷モデルを用いる必要があるが、磁気ターゲティング法は脊髄損傷部へ細胞を誘導・集積させ、その効果を増幅させる有効な細胞移植方法の一つとなりうるものと期待される。

文献

1. Ochi M, Adachi N, Nobuto H et al: Articular cartilage repair using tissue engineering technique--novel approach with minimally invasive procedure. *Artif Organs* 28: 28-32, 2004
2. Arbab AS, Jordan EK, Wilson LB et al: In vivo trafficking and targeted delivery of magnetically labeled stem cells. *Hum Gene Ther* 15: 351-360, 2004
3. Hamasaki T, Tanaka N, Ishida O et al: Characterization of labeled neural progenitor cells for magnetic targeting. *Neuroreport* 16: 1641-1645, 2005
4. Oishi Y, Baratta J, Robertson RT et al: Assessment of factors regulating axon growth between the cortex and spinal cord in organotypic co-cultures: effects of age and neurotrophic factors. *J Neurotrauma* 21: 339-356, 2004
5. Nishida K, Tanaka N, Nakanishi K et al: Magnetic targeting of bone marrow stromal cells into spinal cord: through cerebrospinal fluid. *Neuroreport* 17: 1269-1272, 2006