

令和元年6月12日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20043

研究課題名(和文) 遺伝子導入脂肪由来幹細胞を用いた脊髄損傷治療効果の検証

研究課題名(英文) Adipose-derived stromal cell transplantation for treatment of acute spinal cord injury

研究代表者

高橋 藍 (Takahashi, Ai)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教

研究者番号：90615303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪由来間質細胞(adipose-derived mesenchymal stromal cell; AD-MSC)は骨髄間質細胞(bone-marrow derived mesenchymal stromal cell; BM-MSC)と類似した表面抗原マーカーを有していたが、培養細胞実験にて異なる外分泌能を有することが示唆された。また、AD-MSCはBM-MSCと比較して低酸素条件や酸化ストレスに対する抵抗性を有しており、移植後の生存率も良好であった。また、AD-MSC移植後に神経再生効果および血管造成が組織学的に観察された。中等度脊髄損傷に対する運動機能改善効果は同等であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪由来間質細胞(AD-MSC)は比較的簡便に多量に採取可能であり、自家移植が可能な材料として有用性が報告されている。今回の研究では、骨髄間質細胞(BM-MSC)と比較した質的な優位性が明らかとなり、脊髄損傷に対する新たな治療法としての有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The use of mesenchymal stromal cell (MSC) transplantation to repair the injured spinal cord has shown consistent benefits in preclinical models. However, the low survival rate of grafted MSC is one of the most important problems. In this study, we revealed these stromal cells exhibited a similar cell surface marker profile, but may express different levels of growth factors and cytokines in vitro. AD-MSCs were more proliferative with greater culture viability under these hypoxic conditions than BM-MSCs. AD-MSCs were also better able to tolerate oxidative stress conditions than BM-MSCs; similarly when transplanted into the spinal cord injury region in vivo, AD-MSCs demonstrated a higher survival rate post transplantation. Furthermore, this increased AD-MSC survival post transplantation was associated with preservation of axons and enhanced vascularization compared with the BM-MSC transplanted group.

研究分野：脊椎脊髄病学

キーワード：急性脊髄損傷 脂肪由来間質細胞 細胞移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性期脊髄損傷の病態は、組織の挫滅や出血などの一次損傷（物理的損傷）と、その後に次ぐ虚血、炎症などの二次損傷（化学的損傷）とから成る。間葉系間質細胞（MSC）移植が脊髄損傷治療効果を有すると考えられているが、その一方では、移植後の細胞生存率が低いことや、MSC の単独移植では有効な治療効果が得られにくいとする報告も散見される。その理由として、移植後の細胞は、二次損傷による低酸素や酸化ストレスの場にさらされ早期に消滅してしまうことが挙げられる。

脂肪由来間質細胞（AD-MSC）は骨髄間質細胞（BM-MSC）と比較して単位容積あたりの幹細胞存在頻度が高く、細胞障害性ストレスへの抵抗性も報告されており、脊髄損傷治療の新たな選択肢となる可能性がある。

2. 研究の目的

AD-MSC と BM-MSC の質的な差異と細胞障害性ストレスに対する抵抗性を明らかにし、移植後の生存率を比較する。また、移植後の細胞生存率の比較および運動機能改善効果について明らかにし、治療効果の機序について免疫組織学的な検討を行う。

3. 研究の方法

(1) AD-MSC および BM-MSC の分離・培養

AD-MSC：8-10 週齢の C57BL/6J マウスより麻酔下に皮下脂肪組織を採取・破砕し、0.075%タイプ I コラゲナーゼで処理し、250g × 5 分間遠心分離したものを 10%FBS + DMEM を用いて初代培養を 7 日間行い、それを第 0 継代と定義し、第 1-5 継代の細胞を実験に用いた。

BM-MSC：同マウス大腿骨および脛骨より骨髄組織を採取し、250g × 5 分間遠心分離したものを 10%FBS + DMEM を用いて同様に培養し実験に用いた。

(2) 表面抗原解析

AD-MSC および BM-MSC の表面抗原について、フローサイトメトリー法にて下記項目の比較解析を行った；CD11b、CD14、CD34、CD44、CD45、CD49d、CD73、CD90.2、CD105、CD106、CD133、Sca-1

(3) mRNA 発現比較

QuantiGene Plex 2.0 Reagent System (Affymetrix 社)を用いて、AD-MSC および BM-MSC の mRNA 発現量の比較を行った。AD-MSC および BM-MSC (第 3 継代) 1×10^5 より total RNA を抽出したのから mRNA の半定量を行い、下記項目の比較解析を行った；CCL2, CCL5, CXCL10, CXCL12, -FGF, VEGF-A, HGF, IGF-1, PDGF-, BDNF, NGF, Ang-1, VEGF-A

(4) 低酸素ストレス、酸化ストレス耐性比較

AD-MSC および BM-MSC (第 3 継代) 1×10^4 を 6 well プレートに播種し、20.5%および 1.0%低酸素条件下に 10%FBS + DMEM を用いてそれぞれ 7 日間培養し、1, 3, 5, 7 日目にトリパンブルー染色にて生細胞数をセルカウンターにて計測した。また、各々の細胞 3×10^3 個を 96well プレートに播種し 24 時間培養したのち、0, 250, 500, 750 μ M, 1mM の H₂O₂ を含有した無血清 DMEM および無血清 DMEM に置換しさらに 24 時間培養した。その後、XTT アッセイ法により細胞活性の比較と、同条件における細胞生死の評価を calcein/EthD-1 染色 (LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity reagent) を用いて行った。

(5) 脊髄損傷モデル作成、細胞移植、移植後の残存細胞数比較

8-10 週齢の C57BL/6J マウスおよび神経組織が発色する同週齢の Thy1-YFP マウスを用いて、麻酔下に第 9-10 胸椎切除を行い、IH インパクターを用いて 60kdyne (中等度損傷モデル)、80kdyne (重度損傷モデル) の圧座を加えた。損傷より 3 日後に、GFP 陽性 AD-MSC および BM-MSC を $1 \times 10^5/3 \mu$ l PBS をマイクロシリンジにてそれぞれ移植し、移植細胞の残存数について蛍光顕微鏡を用いて 1-4 週目まで 1 週ごとに観察した。

(6) 免疫染色

移植後の血管新生効果、神経再生効果の評価目的に、Thy1-YFP マウスを用いて中等度損傷モデルを作成し、AD-MSC および BM-MSC 移植後に還流固定し脊髄凍結切片を作成し CD31 (血管内皮)、PKC (皮質脊髄路) について蛍光免疫染色にて観察した。

(7) 運動機能評価

下肢運動機能について、BMS スコア (Basso Mouse Scale for locomotion) を用いて移植後 1-6 週目まで 1 週ごとに評価した。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

4. 研究成果

(1) 表面抗原解析

AD-MSC および BM-MSC は同様の表面抗原パターンを呈していた; CD11b(-)、CD14(-)、CD34(+)、CD44(+)、CD45(-)、CD49d(-)、CD73(+)、CD90.2(+)、CD105(-)、CD106(+)、CD133(-)、Sca-1(+)

(2) mRNA 発現比較

培養細胞実験にて AD-MSC は BM-MSC と比較し CCL2, CXCL12, PDGF- β , BDNF, VEGF-A を有意に多く発現していた。BM-MSC は BDNF を多く発現していた。

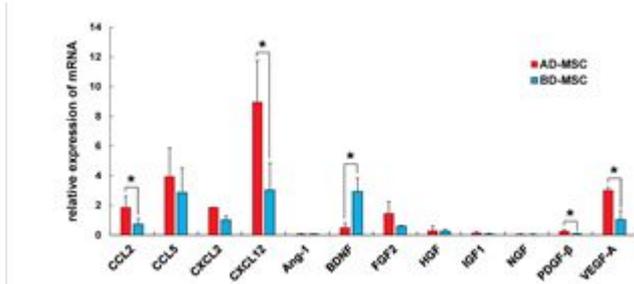


図 1. AD-MSC および BM-MSC の mRNA 発現量比較

(3) 低酸素ストレス、酸化ストレス耐性比較

AD-MSC は BM-MSC と比較し、低酸素条件下においても高分裂能を維持していた。また、 H_2O_2 による酸化ストレス条件下および無血清培地に対しても抵抗性を有しており、生存細胞数が有意に多く、細胞活性も強かった。

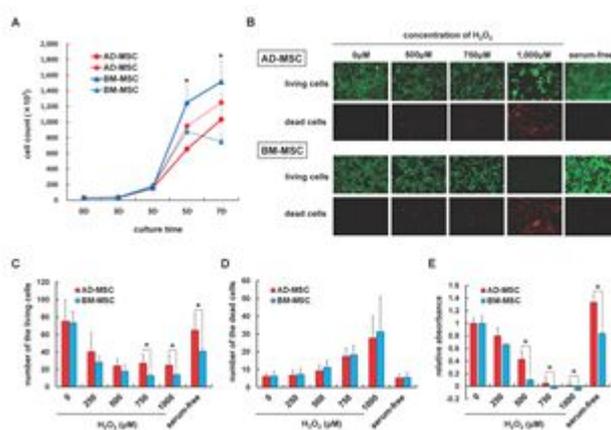


図 2. AD-MSC および BM-MSC のストレス耐性比較

(4) 移植後の残存細胞数比較

AD-MSC は BM-MSC と比較し、移植後の残存細胞数について有意に良好であった。

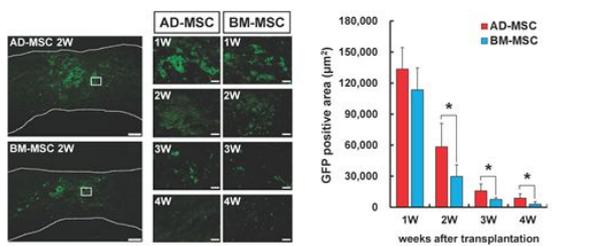


図 3. GFP 陽性 AD-MSC および GFP 陽性 BM-MSC の移植後の残存数比較

(5) 免疫染色

AD-MSC 移植後、移植部にて CD31 陽性細胞数の増加、PKC 陽性軸索面積の増加が観察され BM-MSC と比較し良好であった。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

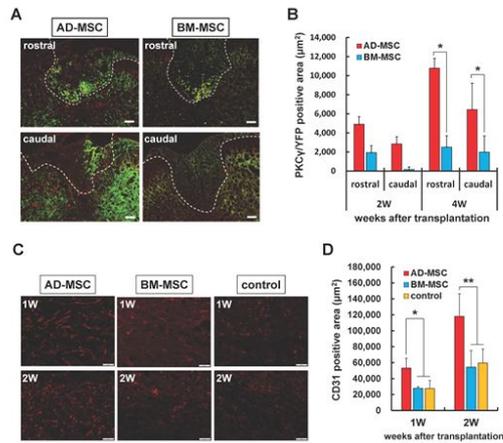


図 4. AD-MSC および BM-MSC の移植後の CD31 陽性面積、PKC 陽性面積比較

(6) 運動機能評価

中等度損傷モデルでは AD-MSC および BM-MSC 移植群はコントロール群と比較し有意な機能回復を認めた。重度損傷モデルでは有意差は認めなかった。

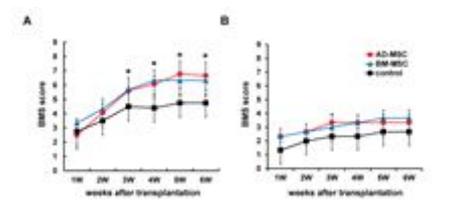


図 5. 細胞移植後の運動機能評価

本研究の結果から、AD-MSC は BM-MSC は同様の表面抗原パターンを有していたが、外分泌能については差異を認めた。また、AD-MSC はストレス耐性について優位性があり、移植後の残存細胞数も良好であった。移植後には血管新生効果、神経再生効果を有することが示唆された。運動機能については AD-MSC および BM-MSC は中等度損傷に対しては同等の効果を有していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Takahashi A, Nakajima H, Uchida K, Takeura N, Honjoh K, Watanabe S, Kitade M, Kokubo Y, Johnson WEB, Matsumine A. Comparison of Mesenchymal Stromal Cells Isolated from Murine Adipose Tissue and Bone Marrow in the Treatment of Spinal Cord Injury. *Cell Transplant.* 2018 ; 27 : 1126-1139. (査読有) doi: 10.1177/0963689718780309
2. 高橋 藍, 中嶋秀明, 山本悠介, 小久保安朗, 松峯昭彦: 脂肪由来間質細胞と骨髄間質細胞のストレス耐性比較および脊髄損傷に対する治療効果. *J Spine Res.* 2018 ; 9 : 157-161. (査読有) J-GLOBAL ID : 201802210726851926
3. 高橋 藍, 中嶋秀明, 山本悠介, 松峯昭彦: 脂肪由来間質細胞による脊髄損傷治療. *臨床整形外科.* 2018 ; 53 : 7-12. (査読無) DOI <https://doi.org/10.11477/mf.1408200994>

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 高橋 藍, 中嶋 秀明, 本定 和也, 北出 誠, 山本 悠介, 小久保 安朗, 松峯 昭彦: 脂肪由来幹細胞と骨髄由来幹細胞の遺伝子発現解析および急性脊髄損傷に対する治療効果. 第 46 回 日本脊椎脊髄病学会, 2017 年
2. 高橋 藍, 中嶋 秀明, 竹浦 直人, 本定 和也, 北出 誠, 内田 研造: 脂肪由来幹細胞と骨髄由来幹細胞の質的比較および脊髄損傷に対する治療効果. 第 46 回 日本脊椎脊髄病学会, 2017 年
3. 高橋 藍, 中嶋 秀明, 本定 和也, 北出 誠, 山本 裕介, 小久保 安朗: 脂肪由来幹細胞と骨髄由来幹細胞のストレス耐性比較および脊髄損傷に対する治療効果. 第 31 回 日本整形外科学会基礎学術集会, 2016 年

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。