

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10902

研究課題名(和文)慢性期脊損に対する骨髄幹細胞移植によるplasticity賦活化による機能回復

研究課題名(英文)Functional recovery following intravenous infusion of mesenchymal stem cells via induction of neural plasticity in chronic spinal cord injury

研究代表者

森田 智慶(Morita, Tomonori)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60723343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：われわれはこれまでに、急性期から慢性期にかけての脊髄損傷(SCI)動物モデルに対して骨髄間葉系幹細胞(MSC)を経静脈的に移植し、運動機能の回復が得られることを報告してきた。MSC移植を行った脊髄損傷ラットモデルに対して、大脳皮質運動野から抽出したmRNAの網羅的遺伝子解析を行ったところ、複数の遺伝子の発現量に変化が見られ、これらの遺伝子の多くは神経再生、plasticityの賦活化に関与する可能性がある遺伝子であることを発見した。特にコントロール群と比べてMSC治療群で発現が高かった7個のcoding遺伝子の発現量は、運動機能(BBBスコア)と高い相関があることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄間葉系幹細胞(MSC)は経静脈的な全身投与により、神経保護作用や血管新生作用、損傷軸索の再生といった脊髄局所に限局した作用のみでなく、脳に対しても遺伝子発現の変化を移植後早期に促進することで、損傷上位のplasticityの賦活化を惹起し、機能回復に大きく関与していると考えられた。今後、MSCの協奏的に作用する多彩な治療メカニズムを解明していくことで、治療方法の乏しい脊髄損傷に対する作用効果がさらに優れた新たな治療法の開発や、未だ明確な治療法が確立していない他の難病への適応拡大にも繋がることを期待できると考える。

研究成果の概要(英文)：Intravenous infusion of mesenchymal stem cells (MSCs) has been shown to provide functional improvements in spinal cord injury (SCI) through local therapeutic mechanisms that provide neuroprotection, remyelination, and axonal sprouting. Recent evidence has demonstrated that remote responses in the brain, as well as local responses in the injured spinal cord, can be induced after SCI. In the present study, we examined the brain response that might be associated with the functional improvements induced by the infused MSCs after SCI. Genome-wide RNA profiling was performed in the motor cortex of SCI rats at 3 days post-MSC or vehicle infusion. Then, quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) data revealed that the seven behaviorally-associated differentially expressed genes (DEGs) had significant correlations with the behavioral function. These behaviorally-associated DEGs may be related to the functional recovery after systemic infusion of MSCs in SCI.

研究分野：整形外科学

キーワード：脊髄損傷 骨髄幹細胞 移植 再生医療 神経可塑性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまでの基礎研究において、脊髄損傷動物モデルに骨髄間葉系幹細胞(MSC)を経験静脈的に移植することで、喪失した運動機能に対する治療効果を得られることを報告してきた(Sasaki et al., 2007, 2009, Osaka et al., 2010)。治療効果を発揮するメカニズムとして、MSCの産生する神経栄養因子による神経栄養・保護作用、損傷軸索の再生、損傷髄鞘の修復、免疫調節作用、血管新生作用などが協奏的に作用することを示した(Sasaki et al., 2007, 2009, Osaka et al., 2010)。さらに、ペリサイトを含む血液脊髄関門(blood spinal cord barrier: BSCB)の安定化と修復が強く関与することを、evans blueの組織内漏出の定量、von Willebrand 因子などの免疫組織学的解析、微小血管の直径の変化などで示し、BSCBの安定化・修復が、運動機能の改善に貢献する可能性が示唆された(Matsushita et al., 2015)。また、脊髄損傷に関する研究は急性期をターゲットにしたものが多く、慢性期の治療法の開発を企図した研究は少ないが、近年我々は慢性期実験的脊髄損傷動物モデルに対しても、MSCの経験静脈的移植により上記のような作用機序を確認し、運動機能の回復が得られることを報告した(Morita et al., 2016)。

近年、脊髄損傷後の自然回復過程において、損傷部位のみならず損傷部位より上位においても、新しい神経回路が構築されることが報告されている。しかし、MSC移植によって損傷部より上位の神経回路がどのように変化するかについて報告した研究はほとんど見られない。

2. 研究の目的

本研究では、脊髄損傷動物モデルに対してMSC投与を行い、損傷脊髄および大脳のplasticityの変化を解析し、新しい治療法の開発へ展開することを目的とした。

3. 研究の方法

雄SDラットの第9-10胸椎高位をIHインパクト(IH-0400, Precision Systems and Instrumentation)で圧挫し、重度SCIモデルを作製した後に、無作為にvehicle(対照)群、MSC群に分け、前者には培養液のみを、後者にはMSC 1.0×10^6 個を静脈内投与した。

(1) 行動学的評価:

経時的にBasso Beattie Bresnahan (BBB) スコアを用いて行った。

(2) 組織学的解析:

経時的に組織採集を行い、作製した凍結切片に免疫染色を行い、超解像共焦点顕微鏡(Zeiss LSM780, ELYRAS.1)を用いて解析した。また、エボン封埋によりプラスチック切片を作製し、電子顕微鏡による超微細構造の解析を行った。

(3) Ex vivo MRI Diffusion Tensor Imaging (DTI)

動物用MRI(Varian社製7.0T)を用いたEx vivo MRI Diffusion Tensor法により、軸索の進展・損傷を検出した。

(4) マイクロアレイ解析

MSCの経験静脈的投与を行った脊髄損傷ラットの脳運動野からRNAを抽出し、ClariomTM D/Gene Chip_Rat Transcriptome Array (RTA1.0., Affymetrix, Santa Clara, CA)によるマイクロアレイ解析を行った。

(5) qRT-PCR

マイクロアレイ解析でMSCによる発現変動遺伝子(differential expressed genes: DEGs)について、TaqMan_Gene Expression assayを用いてqRT-PCRによる発現解析を行った(PRISM7500, 7500 software v2.3, Thermo Fisher Scientific Inc.)。

4. 研究成果

(1) 行動学解析:

実験的脊髄損傷モデル作製後にMSCを経験静脈的投与した結果、運動機能の改善が得られた。

(2) 組織学的解析:

投与されたMSCにより損傷軸索のsprouting、再有髄化が生じていることを、免疫組織学的手法などにより確かめた(図1, 2)。

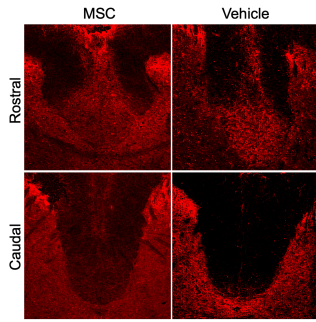


図 1. 免疫組織学的に観察した皮質脊髄路 (未発表)

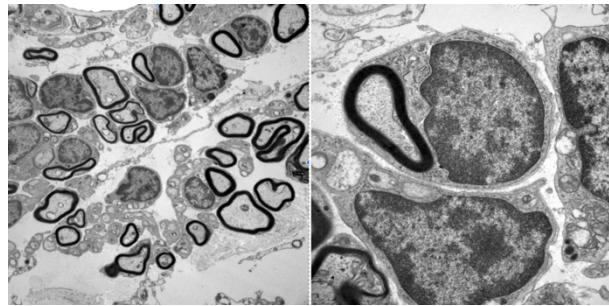


図 2. 電子顕微鏡で観察した再有髄化軸索 (未発表)

(3) Ex vivo MRI DTI

Axial diffusivity の低下は軸索損傷を示しており、Tract number の増加や Axial diffusivity の増加から、MSC 移植による軸索伸長や Sprouting が生じていると考えられた。一方、Radial diffusivity は脱髄を示しており、MSC 群で低下していることから、脱髄抑制効果や浮腫抑制効果が関与していることが示唆された。

(4) 遺伝学解析

MSC の経静脈的投与ののち 3 日目の大脳運動野の脳組織から mRNA を抽出して、Microarray 解析(68,842 遺伝子)を行った。

スクリーニングされた differentially expressed genes (DEGs) 38 遺伝子のうち、Coding gene は 15 遺伝子であった(図 3, 4)。

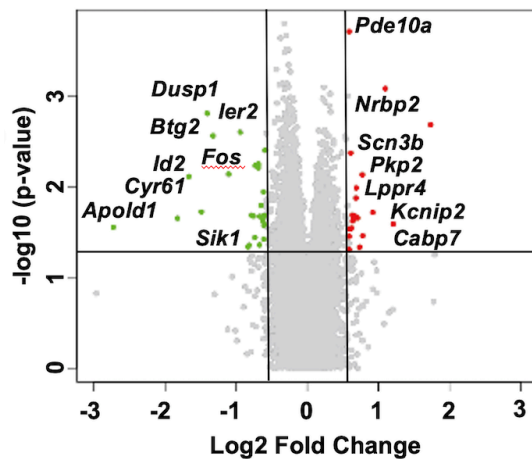


図 3. MSC 移植と関連する遺伝子のボルケーノプロット (Oshigiri, et al., J. Neurotrauma, 2019)

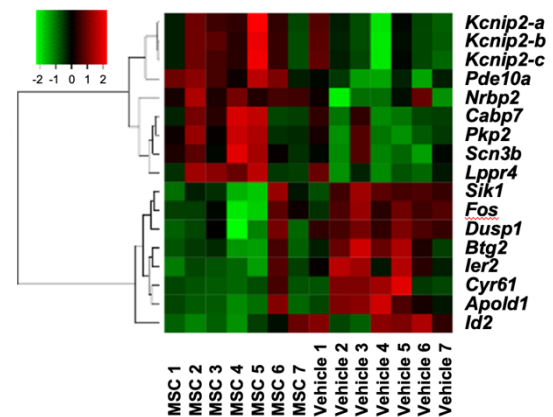


図 4. Coding gene15 遺伝子のヒートマップ (Oshigiri, et al., J. Neurotrauma, 2019)

(5) qRT-PCR

運動機能の改善との相関のある 7 coding 遺伝子を”behavior associated DEGs”とした。これらの遺伝子の発現を qRT-PCR で発現を確認した。これらの 7coding 遺伝子は、脊髄損傷により発現が軽度増加し、MSC の経静脈的投与により、さらに発現が増加していることがわかった(図 5)。

また、運動機能の改善と相関の低かった残りの 8 つの”non-behavior associated DEGs”は、qRT-PCR による発現解析の結果、脊髄損傷により発現が増加したが、MSC の経静脈的投与により低下していた(図 6)。これらの 8 遺伝子の protein-protein interactions 解析によると、これらの遺伝子は、immediate early response に関与していると推定された。

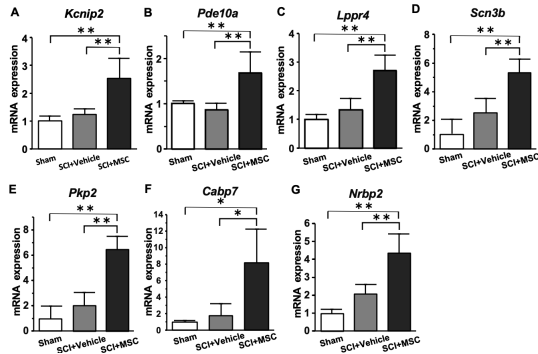


図 5. Behaviorally-associated DEGs の遺伝子発現量 (Oshigiri, et al., J. Neurotrauma, 2019)

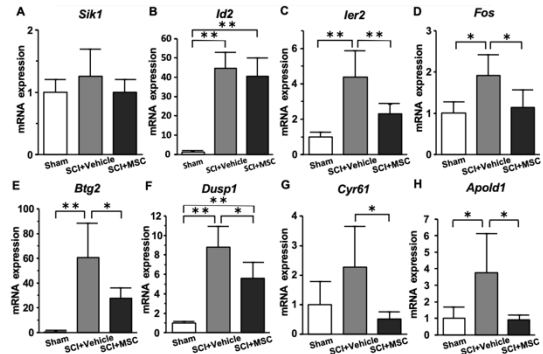


図 6. non-behaviorally-associated DEGs の遺伝子発現量 (Oshigiri, et al., J. Neurotrauma, 2019)

また、上記 15 個の DEGs は、Day7 の PCR では発現量の変化が減少していることから、DEGs 発現量は day3 がピークであり、一過性の遺伝子発現の変化により、治療効果を発揮するメカニズムに参与する遺伝子と考えられた(図 7)。

(6)考察および結論

SCI ラットモデルの脳マイクロアレイ解析から、大脳皮質における特定の遺伝子発現の一過性の変化により、細胞の増殖や分化、脳の活性化が生じることで、運動機能回復に参与していることが示唆され、運動機能の改善に貢献している可能性が考えられた。

MSC は、経静脈的な全身投与により、脊髓局所だけでなく脳に対しても神経機能の回復を促進させる効果があり、この脳における遺伝子発現の変化は、移植後早期の機能回復の治療メカニズムの一つと考えられた。さらにこれらの DEGs は治療効果判定にも有用である可能性が示唆された。

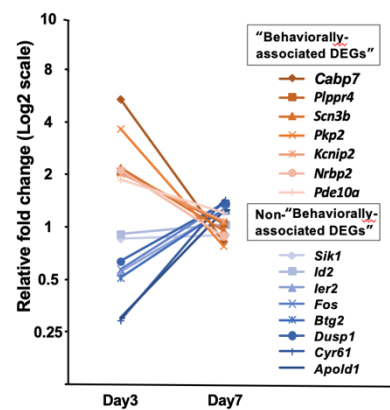


図 7. Coding-DEGs の遺伝子発現の経時的变化 (Oshigiri, et al., J. Neurotrauma, 2019)

<図表説明>

図 1. 脊髄後索の皮質脊髄路 (損傷部吻側・尾側) を抗 PKC- γ 抗体で染色した。MSC 群は Vehicle 群と比較し、側枝形成が生じていた。

図 2. 電子顕微鏡により、MSC 移植を行ったラットの脊髄損傷部を観察した。末梢神経型の髄鞘を伴った再有髓化軸索が多数認められた。

図 3. MSC 移植により 1.5 倍または 1.5 倍以上の変化があった発現変動遺伝子をした。38 遺伝子のうち Coding gene は 15 遺伝子であった。

図 4. SCI+MSC, SCI+vehicle のサンプル内の、15 coding DEGs の発現レベルを示した。

図 5. Behaviorally-associated DEGs の遺伝子発現量を Sham 群、Vehicle 群、MSC 移植群で比較した。脊髄損傷により増加する発現量が MSC 移植によりさらに増加しており、MSC による運動機能回復に参与していると考えられた。

図 6. 運動機能回復に相関しなかった 8 遺伝子を non-behaviorally-associated DEG として、遺伝子発現量を 3 群で比較した。脊髄損傷で増加した発現量が MSC 移植により抑制されており、8 つの Immediate early genes が脊髄損傷の興奮毒性を抑制する神経保護作用に参与することが示唆された。

図 7. 遺伝子発現量の経時的变化は、3 日目で変化のあった発現量が 7 日目で正常化することか

ら、一過性の遺伝子発現の変化であることが示唆された。

<引用文献>

Matsushita T, Lankford KL, Arroyo EJ, et al. Diffuse and persistent blood-spinal cord barrier disruption after contusive spinal cord injury rapidly recovers following intravenous infusion of bone marrow mesenchymal stem cells. *Exp Neurol* 2015 267:152-64.

Morita T, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, et al. Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells Promotes Functional Recovery in a Model of Chronic Spinal Cord Injury. *Neuroscience* 2016 335:221-31.

Osaka M, Honmou O, Murakami T, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. *Brain Res* 2010 1343:226-235.

Sasaki M, Li B, Lankford KL, et al. Remyelination of the injured spinal cord. *Prog Brain Res*, 2007 161:419-33.

Sasaki M, Radtke C, Tan AM, et al. BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury. *J Neurosci* 2009 29:14932-14941.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsutomu Oshigiri, Toru Sasaki, Masanori Sasaki, Yuko Kataoka-Sasaki, Masahito Nakazaki, Shinichi Oka, Tomonori Morita, Ryosuke Hirota, Mitsunori Yoshimoto, Toshihiko Yamashita, Kazue Hashimoto-Torii, Osamu Honmou	4. 巻 36
2. 論文標題 Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells Alters Motor Cortex Gene Expression in a Rat Model of Acute Spinal Cord Injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of neurotrauma	6. 最初と最後の頁 411, 420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/neu.2018.5793	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森田智慶, 本望修, 山下敏彦	4. 巻 27
2. 論文標題 脊髄損傷患者に対する自家骨髄間葉系幹細胞移植療法	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 647, 650
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 押切勉, 佐々木祐典, 廣田亮介, 森田智慶, 吉本三徳, 本望修, 山下敏彦
2. 発表標題 急性期実験的脊髄損傷に対する骨髄間葉系幹細胞の経静脈的移植後の大脳皮質運動野の遺伝子発現変化の検討
3. 学会等名 第48回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 押切勉, 佐々木祐典, 廣田亮介, 森田智慶, 吉本三徳, 本望修, 山下敏彦
2. 発表標題 急性期実験的脊髄損傷に対する骨髄間葉系幹細胞の経静脈的移植後の大脳皮質運動野の遺伝子発現変化の検討
3. 学会等名 第92回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐々木 祐典 (Sasaki Masanori) (20538136)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	
研究分担者	押切 勉 (Oshigiri Tsutomu) (70754612)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	廣田 亮介 (Hirota Ryosuke) (10815434)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	
研究分担者	中崎 公仁 (Nakazaki Masahito) (70722461)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	
研究分担者	鱒淵 昌彦 (Wanibuchi Masahiko) (30343388)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	
研究分担者	本望 修 (Honmou Osamu) (90285007)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	山下 敏彦 (Yamashita Toshihiko) (70244366)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	