

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16561

研究課題名(和文) ヒト頭蓋骨髄間質細胞は重症神経疾患に対する新しい再生治療ソースとなるか？

研究課題名(英文) Development of cell therapy for severe CNS disease using cranial bone mesenchymal stem cells

研究代表者

光原 崇文(Mitsuhara, Takafumi)

広島大学・医系科学研究科(医)・助教

研究者番号：80571801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らは、これまで独自に樹立した神経堤由来の頭蓋骨由来間葉系幹細胞を、脳脊髄疾患の神経再生細胞療法へ応用するため、その特性解析とともに脳梗塞モデル及び脊髄損傷モデルへの投与効果の検証をおこなった。骨髄間葉系幹細胞等に比べ、頭蓋骨由来間葉系幹細胞は神経細胞生存に有利なパラクライン効果が確認され、いずれの疾患モデルにおいても神経機能回復が優れている結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経再生細胞療法の最適な細胞ソースの候補として、これまで我々は頭蓋骨由来間葉系幹細胞を樹立した。本研究では、頭蓋骨由来間葉系幹細胞の分子生物学的特徴を解析し、実際の神経再生治療への応用を見据えて脳梗塞及び脊髄損傷モデルラットを用いた研究を行い、優れた特性・効果を立証した。本研究を通じ、頭蓋骨由来間葉系幹細胞を応用して今後期待される神経再生医療の細胞療法について、多面的な重要知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We have established cranial bone-derived mesenchymal stem cells (CMSC) originate from neural crest. We have provided novel evidence showing that cell-based therapy using CMSC results in excellent functional recovery in cerebral infarction and spinal cord injury rat models. We have also shown that CMSC exert paracrine effects such as anti-apoptotic and anti-necroptotic effects, suggesting that CMSC may be a new therapeutic agent in cell-based therapy for CNS disease.

研究分野：再生医療

キーワード：神経再生 間葉系幹細胞 脳梗塞 脊髄損傷 パラクライン効果 頭蓋骨由来間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、これまでに脳神経外科手術において穿頭あるいは開頭手術に際し発生する前頭側頭部の骨組織や骨髄から、ヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞(human cranial Mesenchymal Stem Cells : hcMSC)を樹立することに成功した。血清培地にてhcMSCを増殖培養し、神経分化誘導を行うと従来の腸骨骨髄由来MSCと比較し、より神経細胞へ分化しやすいことを明らかにした(Neuroscience Letters, 606:161-166, 2015)。

そもそも、元来間葉系幹細胞の特徴として、間葉系幹細胞の多くが中胚葉由来と考えられるにも関わらず外胚葉・内胚葉にも胚葉を超えて分化することが知られているが、発生学的見地から、神経堤細胞由来である頭蓋骨骨髄に我々は着目した。

2. 研究の目的

頭蓋骨由来間葉系幹細胞(hcMSC)の神経再生治療における有効性の検証と、無血清培地での細胞樹立法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

初年度(2018年度)はヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞(hcMSC)の効率的な樹立と分子生物学的検討を行い、hcMSCを安定的に無血清培地で樹立培養する方法を確立し、その特性解析、分化能の確認を行った。またラットcMSCを用いて神経保護作用や栄養サイトカインの検討を行い、*in vivo*で脳梗塞モデルラットに投与しその効果を確認した。

次年度(2019年度)は初年度に確認したラット細胞での脳梗塞治療効果の検討を、ヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞(hcMSC)での効果検証へと拡大し、効果を検証した。

最終年度(2020年, 2021年度)はWeight drop methodによりラット脊髄損傷モデルを作成し、脊髄損傷作成翌日にラットcMSC投与をおこない、約1ヶ月間の運動機能評価の後、組織を固定摘出し、免疫染色などを用いて各種分子生物学的・組織学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞(hcMSC)の無血清培地での樹立培養

無血清培地を用いたヒト頭蓋骨骨髄間質細胞の培養樹立と特性解析を行った。ヒト頭蓋骨MSCは血清培地と同程度に増殖し、CD73, CD90, CD105の高発現を確認した。

(2) 無血清培地での樹立培養したヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞(hcMSC)の分化能検討

骨, 脂肪, 軟骨への分化をそれぞれ確認した。

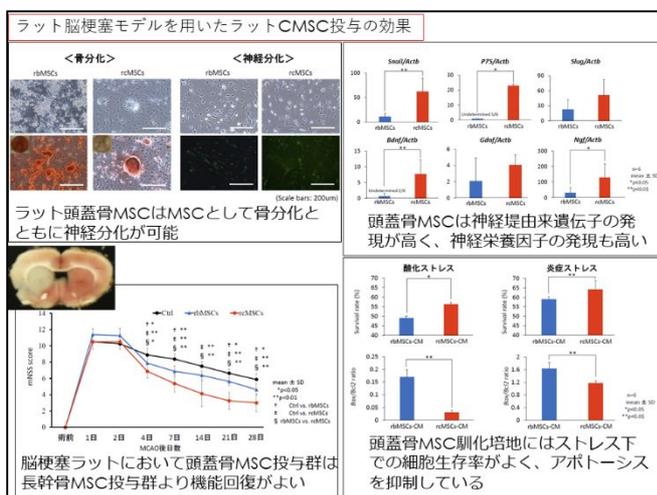
(3) 疾患モデルでの頭蓋骨間葉系幹細胞療法の効果

ラットcMSCの特性解析と脳梗塞モデルへの投与効果の検証

(Stem Cells Dev 27: 1053-1061, 2018)【図1】

頭蓋骨間葉系幹細胞の特性解析および移植効果確認のため、ラットcMSCを樹立し、

四肢長幹骨から樹立した間葉系幹細胞をコントロールとして研究をおこなった。real-time PCRにて双方の遺伝子発現を解析すると、ラットcMSCは神経堤のマーカーである*snail*, *p75*を有意に高発現しており、神経栄養因子である*Bdnf*や*Ngf*も有意に高発現であった。神経保護効果についてラットcMSC馴化培地を用いてNG108-15を培養し検討したところ、酸化ストレス下および炎症ストレス下でもアポトーシスが抑制されることで、コントロールにくらべて生存率が有意に高く、神経系細胞生存に有利なパラクライン効果も確認された。また*in vivo*



【図1】ラット脳梗塞モデルを用いたラット頭蓋骨間葉系幹細胞投与効果

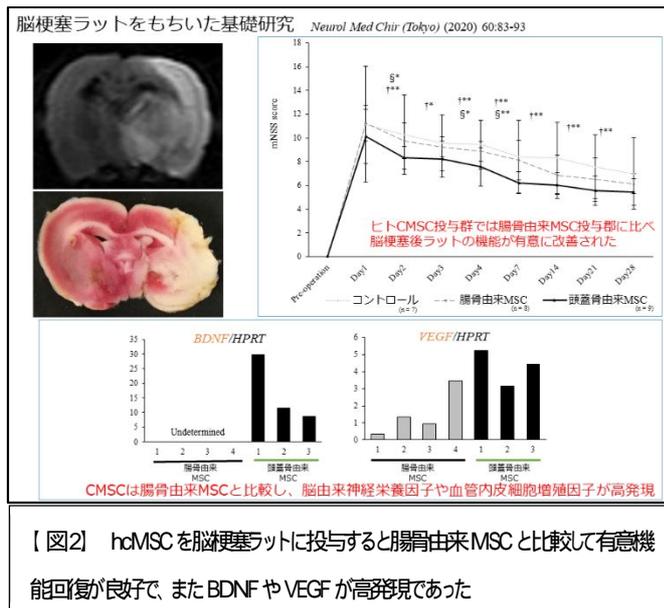
でラット中大脳動脈閉塞モデルに、脳梗塞後24時間で尾静脈からラットcMSC細胞移

植を行うと、mNSS (modified neurological severity score)を用いた神経機能評価において、脳梗塞作成後 4 日目以降でコントロールに比較して、有意な機能回復を示した。

ヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞(hcMSC)の脳梗塞後の機能回復効果

(Neurologia Medico-Chirurgica, Volume 60, Issue 2, 2020, Pages 83-93) 【図2】

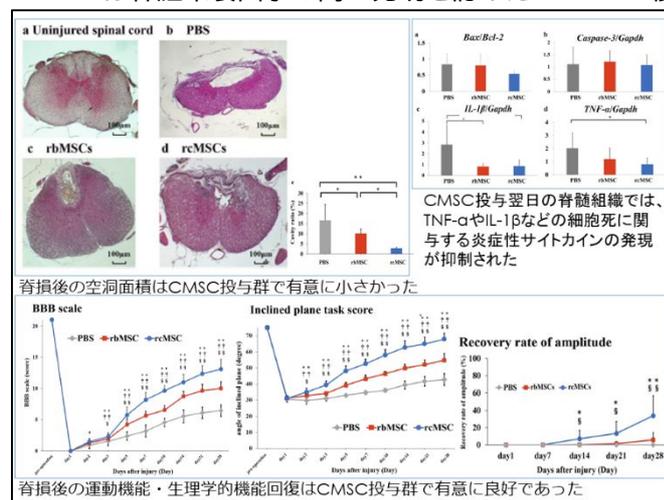
hcMSC の特性解析および移植効果確認のため、hcMSC の細胞学的特徴と脳梗塞モデルラットへの移植効果について、ヒト腸骨骨髓由来 MSC (hiMSC) と比較検討した。本研究結果の概要は、(ア)細胞学的特徴を検討するため、神経堤マーカー、神経栄養因子の遺伝子発現を real-time PCR 法を用いて解析したところ、神経堤マーカー、神経栄養因子の発現は hiMSC に比べ hcMSC で高かった。(イ)脳梗塞モデルラット作製後 3 時間または 24 時間で、1,000,000 個の hcMSC もしくは hiMSC を尾静脈から投与し、非投与のコントロール群も含め、神経機能の評価したところ、脳梗塞モデルラットの神経機能は、脳梗塞 3 時間後の投与では、hiMSC やコントロール群に比べ、hcMSC の投与で神経機能が改善した。(ウ) *in vitro* での神経保護効果を検討するため、NG108-15 を脳梗塞後の二次的損傷を模した炎症あるいは酸化ストレスに 3 時間もしくは 24 時間曝露した後、hcMSC もしくは hiMSC の馴化培地を加え、24 時間後の NG108-15 の生存率を、馴化培地を加えないコントロール群も含め解析したところ、馴化培地を加えることで、ストレス曝露後の細胞生存率が改善した。



脊髄損傷ラットに対するラット cMSC 投与効果 (Sci Rep, 11(1):21907, 2021) 【図3】

ラット頭蓋骨よりラット cMSC (rcMSC)を、比較対象としてのラット骨髄由来MSC (rbMSC)を脛骨および大腿骨骨髄より樹立し、遺伝子発現解析による特性評価を行った。脊髄損傷モデルラットを作成し、脊髄損傷 1 日後に rcMSC または rbMSC、PBS のみの 3 群に分けて投与を行った。移植効果の判定には運動機能評価および電気生理学的評価として motor evoked potential の測定を用いた。脊髄損傷 28 日後に脊髄組織を回収し、組織学的評価による損傷領域の比較を行った。また、MSC 移植翌日の脊髄組織を用いて遺伝子解析を実施し、MSC の作用機序を検討した。

結果では、rbMSC と比較し、rcMSC は神経栄養因子の高い発現を認めた。rcMSC 移植を行った脊髄損傷モデルラットでは、運動機能評価、電気生理学的評価ともに有意な神経機能回復が認められ、損傷領域の有意な縮小が認められた。rcMSC 移植後翌日の脊髄組織では、TNF- α や IL-1 などの細胞死に関する炎症性サイトカインの発現が抑制された。



【図3】 脊髄損傷モデルラットへrcMSC投与効果

脊髄損傷でも、rcMSC投与は機能回復及び組織修復も高い有効性を有する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計24件（うち査読付論文 19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 光原, 崇文 弓削, 類 栗栖, 薫	4. 巻 3
2. 論文標題 研究者の最新動向 頭蓋骨由来間葉系幹細胞を用いた神経再生細胞治療	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 777-782
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 -
1. 著者名 OSHITA Jumpei, OKAZAKI Takahito, MITSUHARA Takafumi, IMURA Takeshi, NAKAGAWA Kei, OTSUKA Takashi, KUROSE Tomoyuki, TAMURA Takayuki, ABIKO Masaru, TAKEDA Masaaki, KAWAHARA Yumi, YUGE Louis, KURISU Kaoru	4. 巻 60
2. 論文標題 Early Transplantation of Human Cranial Bone-derived Mesenchymal Stem Cells Enhances Functional Recovery in Ischemic Stroke Model Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 83 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.oa.2019-0186	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 光原 崇文、猪村剛史、弓削類、栗栖薫	4. 巻 8
2. 論文標題 頭蓋骨由来間葉系幹細胞の可能性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 別冊BIO Clinica 慢性炎症と疾患	6. 最初と最後の頁 114-119
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 -
1. 著者名 光原 崇文、猪村剛史、弓削類、栗栖薫	4. 巻 34
2. 論文標題 神経再生医療における頭蓋骨由来間葉系幹細胞を用いた挑戦	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 1367-1372
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 -

1. 著者名 Abiko, M. Mitsuahara, T. Okazaki, T. Imura, T. Nakagawa, K. Otsuka, T. Oshita, J. Takeda, M. Kawahara, Y. Yuge, L. Kurisu, K.	4. 巻 27
2. 論文標題 Rat Cranial Bone-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Promotes Functional Recovery in Ischemic Stroke Model Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells Dev	6. 最初と最後の頁 1053-1061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2018.0022	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 Maeda Yuyo, Otsuka Takashi, Mitsuahara Takafumi, Okazaki Takahito, Yuge Louis, Takeda Masaaki	4. 巻 11
2. 論文標題 A novel bone-thinning technique for transcranial stimulation motor-evoked potentials in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-91780-5	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 Maeda Yuyo, Otsuka Takashi, Takeda Masaaki, Okazaki Takahito, Shimizu Kiyoharu, Kuwabara Masashi, Hosogai Masahiro, Yuge Louis, Mitsuahara Takafumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Transplantation of rat cranial bone-derived mesenchymal stem cells promotes functional recovery in rats with spinal cord injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-01490-1	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 前田雄洋、光原崇文、大塚貴志、岡崎貴仁、武田正明、清水陽元、桑原正志、細貝昌弘、河原裕美、辻 紘一郎、飯田幸治、弓削類
2. 発表標題 ラット頭蓋骨由来間葉系幹細胞の脊髄損傷への移植効果
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takafumi Mitsuhashi, Takeshi Imura, Takashi Ohtsuka, Junpei Ohshita, Masaru Abiko, Kaori Iwamoto, Takahito Okazaki, Yumi Kawahara, Louis Yuge, Kaoru Kurisu
2. 発表標題 THE NEUROPROTECTIVE AND NEUROREGENERATIVE POTENTIAL OF HUMAN CRANIAL BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research (ISSCR) Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 光原崇文、猪村剛史、大塚貴志、大下純平、阿美古将、岩本佳央梨、岡崎貴仁、河原裕美、弓削類、栗栖薫
2. 発表標題 頭蓋骨由来骨髄間葉系幹細胞の神経再生・保護効果～新しい間葉系幹細胞ソースとして～
3. 学会等名 第77回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 光原崇文、栗栖薫	4. 発行年 2018年
2. 出版社 三輪書店	5. 総ページ数 190
3. 書名 再生医療とリハビリテーション	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>広島大学大学院医系科学研究科 脳神経外科学 神経再生研究グループ https://shinkeisaisei.hiroshima-u.ac.jp/</p>
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------