

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09477

研究課題名(和文) 脂肪組織由来幹細胞分泌因子を用いた新たな神経保護療法の研究と開発

研究課題名(英文) Development of a novel neuroprotective therapy using adipose-derived stem cells secreted factor

研究代表者

江頭 裕介 (Egashira, Yusuke)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50547677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織由来幹細胞(ADSCs)を含む幹細胞移植による、種々の脳神経疾患における神経傷害軽減の主たるメカニズムは分泌因子の神経保護作用であると推定される。本研究では、ADSCsに特異的な分泌因子を同定したこと、種々の脳卒中モデル動物が、ADSCs分泌因子の神経傷害に対する保護作用とメカニズムを解析に適切であることを確認したこと、新たなin-vitro脳血管障害モデルを確立したことが成果として挙げられる。これらの成果をもとに、ADSCsの臨床応用の可能性、また分泌因子を用いた神経保護療法の確立に向けた有用な知見が、今後も継続的に得られることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

われわれの研究成果を含むこれまでの報告からは、ADSCs分泌因子は有望な神経保護効果を有している可能性が高い。各々の幹細胞分泌因子が異なる作用メカニズムを有している可能性がある。今回の研究より得られた知見からは、今後もADSCsの分泌因子の作用をin vivo, in vitro両者の実験系より解明することにより、現在なお治療困難である種々の疾病による神経傷害に対する複数の新規治療法、新規薬剤の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the secreting factor of adipose-derived stem cells (ADSCs), which is considered as the major pathways for ameliorating neuronal injury caused by various neuronal diseases. We successfully identified major secreting factors of mouse ADSCs, for example, tissue inhibitor metalloproteinase-1, or progranulin. Both of them have been reported as neuroprotective factor for various neuronal diseases. These findings support our hypothesis; the trophic factors of ADSCs may exert neuroprotective effect against various neuronal diseases including ischemic and hemorrhagic stroke.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脂肪組織由来幹細胞 神経傷害 脳卒中モデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最新の医学においても、脳卒中をはじめとする疾病によって傷害を受けた神経組織に対する有効な治療法はなく、幹細胞による再生医療に期待が寄せられている。しかし、種々の基礎実験での幹細胞移植による治療効果はいずれも速やかに認められ、かつ劇的であるのに対し、移植された幹細胞自身の分化による神経再生はごく限定的であることが多くの報告で示されている。このことから、今回の研究対象とした脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived stem cells: ADSCs) を含めた種々の幹細胞移植による神経傷害軽減の主たるメカニズムは幹細胞分泌因子の神経保護作用であると考えられている。幹細胞を用いた神経再生が再生医学の理想であることに疑いはないが、分泌因子を用いた神経保護療法、薬剤開発はより早期に臨床応用できる可能性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、ADSCs の分泌因子およびその直接的・間接的な神経保護作用を詳細に検討することで、新たな神経保護療法や薬剤の開発につなげることを目的とした。われわれの研究成果を含むこれまでの報告からは、幹細胞分泌因子は極めて有望な神経保護効果を有している可能性が高い。さらに先述したとおり、現時点においては幹細胞移植による神経傷害軽減、機能改善の主たるメカニズムは分泌因子によるところが大きいと考えられる。これらの解明により複数の新規薬剤や新規治療法の開発につながる可能性が想定された。

3. 研究の方法

(1) 通常の条件下でマウスおよびヒト ADSCs を培養し、その上清を採取した。対照として同時に採取、培養した成熟脂肪細胞培養上清を用い、抗体アレイを使用しそれぞれの上清中に含まれる因子を比較し、特に ADSCs 培養上清中に高濃度で含まれる因子を同定した (表 1: マウス ADSCs の主要分泌因子)。本検討は複数回繰り返し行い、同様の傾向が得られることを確認した。

(2) マウス ADSCs 培養上清そのものがマウス脳虚血モデルに対し保護作用を示すこと (Egashira Y, et al. *Brain Res* 2012)、マウス ADSCs より分泌される因子は、結果に示す通り、既に実験的脳神経傷害に対し保護作用を示すことが報告されていた。本研究の仮説を裏付けるものと考えられたが、新規性の高い研究成果とはならない可能性が考えられた。

(3) このため、新規のターゲットとして、脳卒中後の微小血管の変化に着目し、ヒト脳微小血管内皮細胞 (Human Brain Microvascular Endothelial Cells: HBMVECs) を用い、低酸素負荷、トロンビン処置を行うことで *in vitro* での新たな微小血管クモ膜下出血 (SAH) モデルの確立を試みた。

4. 研究成果

(1) マウス ADSCs の主要分泌因子の検討: 表 1 の通り、ADSCs、成熟脂肪細胞を通常の条件下で培養し、特に ADSCs 培養上清中に高濃度で含まれる因子を同定した (表 1: マウス ADSCs の主要分泌因子)。本検討は複数回繰り返し行い、同様の傾向が得られることを確認した。

表 1: マウス ADSCs の主要分泌因子 (単位は成熟脂肪細胞培養上清との比較)

因子	成熟脂肪細胞分泌量に対する 幹細胞分泌量の比
Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)	41.45
Progranulin	37.81
Tumor necrosis factor receptor 1	25.82
Glemlin	25.03
Osteopontin	23.92

(2) マウス ADSCs 分泌因子の神経保護作用の検討: このうち、Progranulin については、以前にマウス脳虚血-再灌流モデルに対し、抗炎症作用により神経傷害を軽減させることを既に報告している (Egashira Y, et al. *J Neuroinflammation* 2013)。TIMP-1, Osteopontin についても実験的脳卒中に対し、神経保護作用を示すとの既報があった。本研究の仮説を裏付けるものと考えられたが、新規性の高い研究成果とはならない可能性が考えられた。

(3) HBMVECs を用いた新たな *in vitro* 脳血管傷害モデルの作成: HBMVECs に低酸素負荷 (94% N₂, 5% CO₂, 1% O₂) およびトロンビン負荷 (5 単位/ml) を加えることで、*in vitro* SAH モデルを作

成した。この系において、低酸素・トロンビン負荷群では control と比較し、HBMVECs におけるトロンビンレセプター (PAR-1) シグナルの下流である p-38 のリン酸化の有意な上昇と、細胞間接着因子である ICAM-1 の有意な発現上昇が確認された (Matsubara H, et al. *J Pharmacol Sci* 2022)。本実験系を用いることで、今後 ADSCs の主要分泌因子を用いた脳微小血管保護作用と、その作用機序の解明が期待される。

ADSCs の主要分泌因子を同定し、既報よりその神経保護作用が強く推定された。また、in vitro での、脳微小血管に注目した新たな出血性脳卒中 (SAH) モデルを確立した。これらの成果は、脳神経傷害のみならず、神経傷害を大きく修飾する可能性のある脳微小血管をターゲットとした ADSCs 分泌因子を用いた治療法の開発に貢献するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岐阜大学医学部脳神経外科 http://www.med.gifu-u.ac.jp/neurosurgery/		
---	--	--

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	岩間 亨 (Iwama Toru) (20303498)	岐阜大学・大学院医学系研究科・教授 (13701)	
研究分担者	中山 則之 (Nakayama Noriyuki) (30444277)	岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授 (13701)	
研究分担者	榎本 由貴子 (Enomoto Yukiko) (20377659)	岐阜大学・医学部附属病院・講師 (13701)	
研究分担者	船津 奈保子 (Funatsu Naoko) (10550296)	岐阜大学・医学部附属病院・助教 (13701)	削除：2019年10月18日

6. 研究組織（つづき）

	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	山田 哲也 (Yamada Tetsuya) (60816114)	岐阜大学・大学院医学系研究科・助教 (13701)	

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