

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18429

研究課題名（和文）神経栄養因子高発現間葉系幹細胞移植によるALS治療の試み

研究課題名（英文）Neurotrophic factor-high expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of ALS

研究代表者

本多 直人（HONDA, Naoto）

鳥取大学・医学部・プロジェクト研究員

研究者番号：10838486

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）：筋萎縮性側索硬化症（ALS）治療に使用するため改変されたヒト間葉系幹細胞（HAC-MSc）の脳内移植後の生着効率の向上を目的として研究を行った。全身的なマクロファージ除去では有意に高い移植細胞由来の発光を示したが、最長生着期間の延長は認められなかった。In Vitroにおける共培養実験の結果、HAC-MScは移植後に集積するマクロファージ・マイクログリアはHAC-MSc自身が引き寄せ、M2フェノタイプに誘導させることで間接的な組織保護的作用には期待できるものの、HAC-MSc自身の生着にとってはマクロファージ・マイクログリアの活性化フェノタイプの差は重要ではないと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在治療法のないALSに対しこれまでの研究で一定の効果のあったHAC-MSc移植に関し、移植後の移植細胞と宿主側の細胞の変化について理解することは今後の治療戦略の方針の決定にとって必要であると考えられる。間葉系幹細胞を用いる治療法はALS以外にも様々な疾患に対し効果が期待されている。本研究では異種由来の間葉系幹細胞を使用したが、同種同系由来の間葉系幹細胞で報告されている機能を持つことを明らかにした。移植後の間葉系幹細胞の減少に関わる機構を明らかにすることは間葉系幹細胞を用いた治療効果の向上に寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The study was aimed at enhancing the engraftment efficiency of human mesenchymal stem cells (HAC-MSCs) modified for use in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) after intracerebral transplantation. Systemic macrophage removal showed significantly higher transplanted cell-derived luminescence, but no prolongation of the longest survival period. The results of in vitro co-culture experiments suggest that although HAC-MSCs can be expected to have an indirect tissue-protective effect by attracting macrophages/microglia that accumulate after transplantation to the HAC-MSCs themselves and inducing them to the M2 phenotype, the difference in the activation phenotype of the macrophages/microglia is not important for the engraftment of the HAC-MSCs themselves.

研究分野：脳神経科学

キーワード：間葉系幹細胞 ALS マクロファージ マイクログリア

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの神経変性疾患の治療法として、我々はこれまでに人工染色体(HAC) システムを用いて、神経栄養因子(HGF, IGF-1, GDNF) を高発現する間葉系幹細胞(HAC-MSC) を樹立し、この HAC-MSC を ALS モデルマウス発症直前期に脳室投与することで、寿命延長効果を示した。一方で、HAC-MSC は移植後急激に減少しており、脳内への生着期間を延長することで治療効果の向上が期待できると考えられた。HAC-MSC を細胞シート状に培養し、皮質に直接貼り付けることで HAC-MSC がばらばらの状態よりも良好な HAC-MSC の生存が確認された。しかしながら劇的な細胞生着の延長は確認されなかった。細胞シート移植後の組織の顕微鏡観察の結果から、Iba1 陽性であるマクロファージ・マイクログリアが多数移植片に浸潤していることが明らかになっていた。この浸潤した細胞が HAC-MSC の生着に影響を及ぼすかは不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、HAC-MSC の治療効果は移植後の生着期間に依存すると考え、細胞シートで移植した HAC-MSC の生着の向上と長期化を目的とする。細胞シートの生着の長期化に關与する因子として、移植後にシート内に浸潤するマクロファージ・マイクログリアの影響を検討する。また、HAC-MSC がマクロファージ・マイクログリアに対して細胞遊走、細胞増殖、活性化の点でどのように働くかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) In Vivo 実験

HAC-MSC を温度応答性 48 ウェルプレート上で培養し細胞シートを作成した。細胞シートは野生型マウスの硬膜を除去した脳に直接貼り付けた。HAC-MSC はルシフェラーゼを発現するため、D-ルシフェリンを投与することで In Vivo イメージングシステムを用いて非侵襲的に同一個体内で移植細胞の経過を観察した。マクロファージ・マイクログリアの移植細胞の生着に対する影響を評価するため、クロドロン酸内包リポソームもしくは空リポソームを移植前のマウスに腹腔内投与した。移植後の細胞シートを含む切片を免疫組織化学によって染色をし、共焦点顕微鏡でマイクログリア・マクロファージの活性化を M1(組織障害的) : iNOS 陽性と M2(組織保護的) : Arg1 陽性で判別を行った。

#### (2) In Vitro 実験

通常の共培養実験では、HAC-MSC によるマクロファージ・マイクログリアの活性化を検証するため、共培養後の細胞を回収し、M1 マーカーと M2 マーカーに対する蛍光標識抗体を用いて染色し、フローサイトメーターによってマクロファージ・マイクログリアの活性化状態を判別した。混入している HAC-MSC は GFP を発現するため、マクロファージとデータ上で分別した。

HAC-MSC の細胞走化性誘導を検証するため、トランスウェルアッセイを行った。メンブレンの穴を通して移動した細胞の数は核を染色後蛍光顕微鏡で撮影しソフト上で計測した。

### 4. 研究成果

(1) マイクログリア・マクロファージを選択的に除去するクロドロン酸内包リポソーム(CLP) 投与後に HAC-MSC 移植を行い、In Vivo イメージングシステムを用いて同一個体内での HAC-MSC 生着の推移を移植直後の測定値を 100% として移植後 14 日目まで非侵襲的に評価した。(図 1) 移植後 3 日の時点では有意な差はなかったが、移植後 7 日目においてクロドロン酸内包リポソーム投与群がコントロールと比較して有意に高い細胞由来の発光を示した。一方で最長生着期

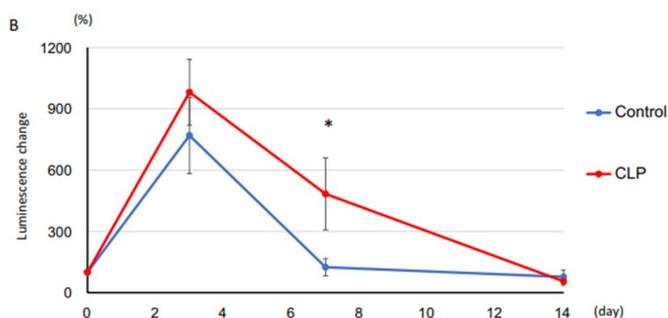


図 1 HAC-MSC 由来発光量の個体内推移

間の延長は認められなかった。このことから、短期的にはマイクログリア・マクロファージの存在が HAC-MSc シートの生着に対して負の働きをする可能性が示された。

移植部位の組織切片上で免疫組織化学によって Iba1 陽性マクロファージ・マイクログリアの活性化フェノタイプを明らかにした。HAC-MSc の近傍では特に M2 フェノタイプに活性化しており、その数も Sham 手術と比較してはるかに多かった。このことから HAC-MSc の存在がマイクログリア及びマクロファージの遊走を亢進させること、M2 への活性化を誘導することが示唆された。ALS モデルマウスにおいては変異型 SOD1 によって活性化された M1 様マイクログリアが病態の進行に寄与すると考えられている。HAC-MSc のマクロファージ・マイクログリアの M2 への誘導が治療効果に寄与するかは不明である。

(2) マウス骨髄由来マクロファージと HAC-MSc の共培養を行い、マクロファージ活性化マーカーを M1 : CD86 陽性、M2 : CD206 陽性としてフローサイトメトリーでマクロファージ中における M1(青枠)と M2(赤枠)の割合を求めた。(図 2) 48 時間以内に HAC-MSc はマクロファージの細胞増殖を亢進させ、組織保護的なサイトカインを産生する M2 フェノタイプに誘導させた。この誘導能は同種同系の MSc と差は無かった。一方で組織障害的とされる M1 フェノタイプにはほとんど誘導されなかった。

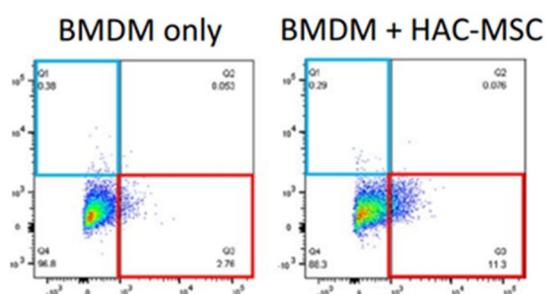


図 2 HAC-MSc による M2 マクロファージへの誘導

HAC-MSc のマクロファージに対する細胞走化性誘導を明らかにするためトランスウェルアッセイを行った。メンブレン裏面に移動したか細胞の核を染色し顕微鏡で数を計測した。(図 3) HAC-MSc 存在下では 10 倍近い数のマクロファージの移動が検出され、In Vivo における細胞シート近傍へのマクロファージ・マイクログリアの集積と矛盾のない結果となった。今回研究では具体的にどの因子がマクロファージに対する走化性を亢進させるか明らかにできなかった。

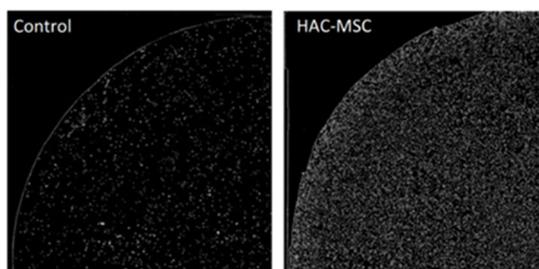


図 3 HAC-MSc によるマクロファージの走化性誘導

HAC-MSc は神経細胞に対する抗アポトーシスを目的として HGF, IGF-1, GDNF を高発現する。マクロファージ培養中への添加実験の結果、これら 3 つの因子はいずれもマクロファージの増殖を亢進させることが確認され、本来の目的とは別に効果を持つことが明らかとなった。

HAC-MSc の反復移植を想定し、一度 HAC-MSc を移植したマウス由来の血清を含む共培養を行った。結果 M1 及び M2 どちらに誘導させたマクロファージであってもマクロファージによる HAC-MSc の貪食が亢進していた。この時、HAC-MSc の死細胞率は未移植マウスと移植マウス由来の血清の間で差がなかったことから直接的な HAC-MSc の細胞死には影響しないことが示唆された。

### (3) まとめ

HAC-MSc 移植後に集積するマクロファージ・マイクログリアを一時的にクロドロン酸内包リポソーム投与により除去することで HAC-MSc の短期的な生着を向上させる可能性があるが、少なくとも 1 回の投与では HAC-MSc の最長生着期間には影響を及ぼさなかった。HAC-MSc 移植後に集積するマクロファージ・マイクログリアは HAC-MSc 自体が引き寄せ、M2 に誘導させることで間接的な組織保護的作用には期待できるものの、HAC-MSc 自身の生着にとってはマクロファージ・マイクログリアの活性化フェノタイプの差は重要ではないと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Honda Naoto, Watanabe Yasuhiro, Tokuoka Yuta, Hanajima Ritsuko	4. 巻 13
2. 論文標題 Roles of microglia/macrophage and antibody in cell sheet transplantation in the central nervous system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-022-03168-5	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naoto Honda
2. 発表標題 Enhanced survival of a transplanted MSC sheet on the mouse cerebrum
3. 学会等名 30th International Symposium on ALS/MND（国際学会）
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
---------------------------	-----------------------	----

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1件

国際研究集会 30th international symposium on ALS/MND	開催年 2019年～2019年
---	--------------------

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