

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07752

研究課題名（和文）自閉症モデルマーモセットによる臍帯血移植治療法の開発

研究課題名（英文）Development of Cord Blood Transplantation Therapy with Autism Model Marmosets

研究代表者

一戸 紀孝 (Ichinohe, Noritaka)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 微細構造研究部・部長

研究者番号：00250598

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：マーモセットの間葉系幹細胞（MSC）は、大腿骨と上腕骨の骨髓を除去した後、トリプシンを用いて消化分離し、成長因子を含まない15%FBS IMDMまたはStemPro MSC SFM（Gibco）で維持した。培地を交換した際に、培養基材に接着し残った細胞のみをさらに培養した。培養細胞は紡錘形で、MSCに特徴的な繊維芽細胞に類似していた。培養細胞のFACS分析では、MSCの特異的マーカーであるCD90陽性細胞が平均80%、CD73陽性細胞が35%であった。MSC特異的抗体CD90とCD105を用いた細胞免疫学的染色では、陽性結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、自閉症治療への新たなアプローチを模索するものである。霊長類マーモセットは、げっ歯類よりモトの自閉症モデルとして優れている。現在注目されている自閉症の治療法として血液・間葉系幹細胞移植があるが、これを実現するためには、マーモセットを用いたモデルでの治療法開発が不可欠である。我々の研究では、マーモセットからの造血幹細胞、間葉系幹細胞の分離、培養が可能であることを証明した。これにより、自閉症モデル動物への治療法開発目的移植が可能となった。これは自閉症治療における新たな視点となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Marmoset mesenchymal stem cells (MSCs) were digested and isolated using trypsin after removal of femoral and humeral marrow and maintained in 15% FBS IMDM or StemPro MSC SFM (Gibco) without growth factors. When the medium was replaced, only cells that remained attached to the culture substrate were further cultured. Cultured cells were spindle-shaped and resembled fibroblasts characteristic of MSCs. FACS analysis of cultured cells showed an average of 80% CD90-positive cells and 35% CD73-positive cells, specific markers for MSCs; cell immunological staining with the MSC-specific antibodies CD90 and CD105 yielded positive results.

研究分野：神経科学

キーワード：血液幹細胞 間葉系幹細胞 幹細胞移植治療 自閉症 マーモセット 培養

## 1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム症は対人関係が苦手な強いこだわりを持つ発達障害で、我国では近年約3～5%存在すると報告されている。我々はこれまでに抗癲癇薬のバルプロ酸を妊娠中の新世界ザルのコモンマーモセットに投与して生まれた仔を自閉症のモデル動物として作成し行動学的、神経組織学的、分子生物学的、電気生理学的に解析し、自閉症の霊長類モデル動物としての地位を確立してきた。この疾患の発症メカニズムは大変複雑で、これまでに根本的な病気の原因にアプローチした治療法はない。

## 2. 研究の目的

近年、幹細胞を移植する治療法があらゆる疾患で提唱されてきている。自閉症などの発達障害においても臍帯血や骨髄に由来する造血幹細胞(Hematopoietic stem cells:HSCs)や間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell:MSCs)を用いた幹細胞治療が根本的な治療法として前臨床的段階で報告され始めている。本研究はHSCsまたはMSCsの移植を行い、マーモセットのバルプロ酸暴露自閉症の治療を試みるものである。

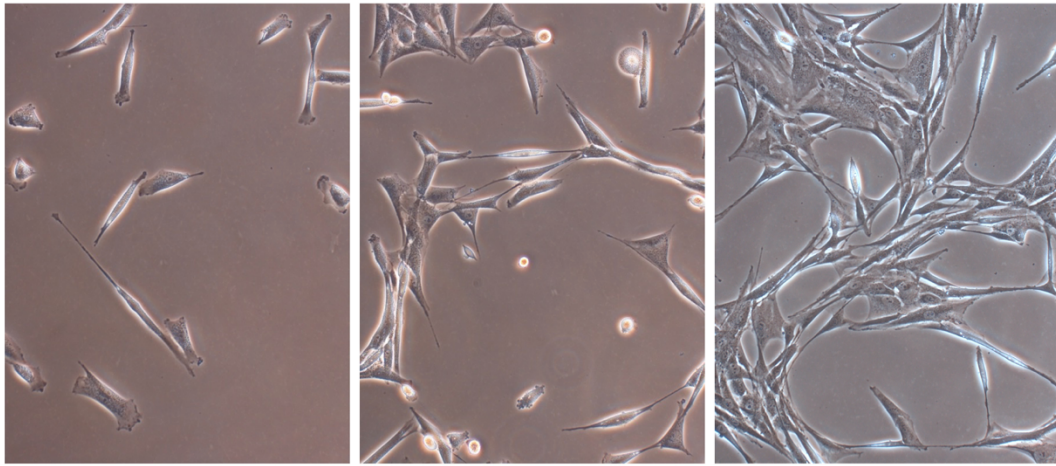
## 3. 研究の方法

マーモセットではHSCsやMSCsについての報告は少なく、殆ど無いに等しいので、昨年度はまずは入手可能な骨髄のHSCsを分離し、フローサイトメトリー(FACS)解析を行い骨髄細胞の発現マーカーについて解析し、またMagnetic cell sorting(MACS)を用いて幹細胞の純化を試みた。本年度は大腿骨と上腕骨から細胞を分離し、MSCs特異的マーカーと思われる抗体を用いてFACS解析、免疫細胞学的染色を行いMSCsの存在の証明を試みた。

MSCsは大腿骨と上腕骨から骨髄を除いた後、トリプシンを用いて消化分離し、15% FBS IMDM または StemPro MSC SFM (Gibco)で、増殖因子なしで維持した。培地交換を行い、接着細胞のみ培養した。fibroblast 様の細胞が増殖した段階で幹細胞の特異個体(CD73, CD90, CD105)を用いてfluorescence cell analyzer(FACS)と細胞免疫学的染色法で解析を行った。

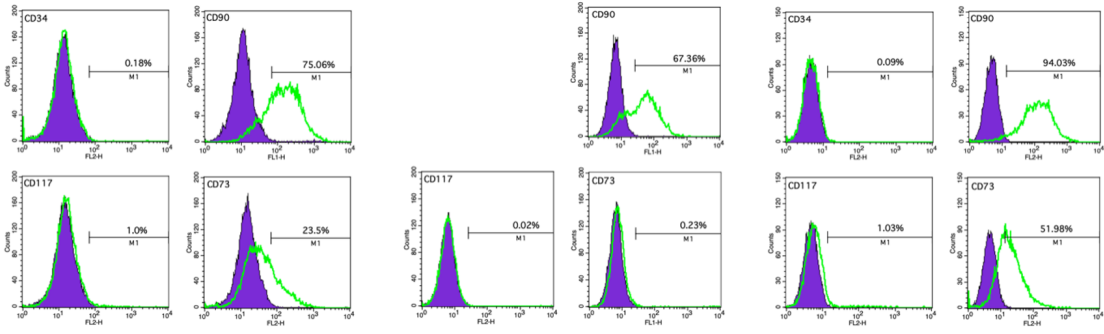
## 4. 研究成果

\*0日から22日令の新生コモンマーモセットの骨髄から分離した細胞はMSCsの特徴であるfibroblastと同様の紡錘形で、プラスチック培養機材に接着性があり、増殖因子なしで増殖が可能であった(図1)



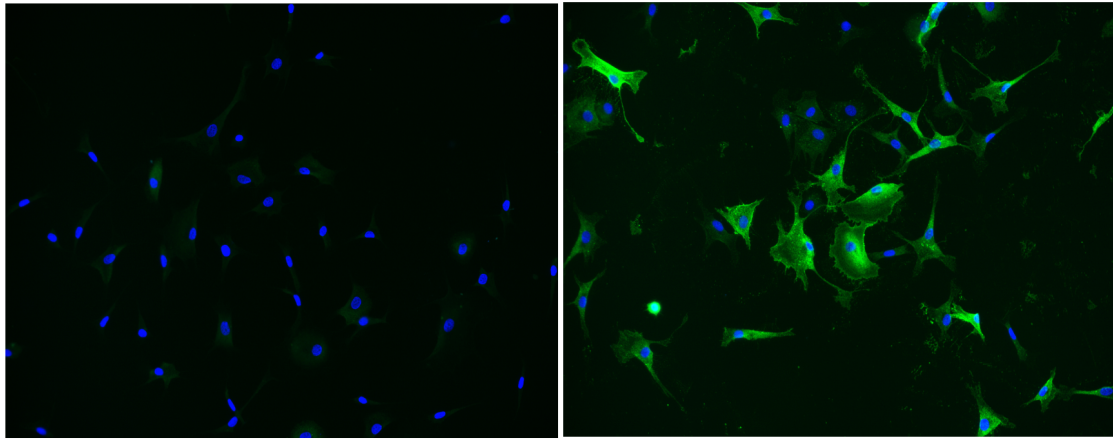
培養2日目                                      培養5日目                                      培養8日目  
 図 1      MSCの培養細胞      顕微鏡写真      (x200)

\*分離した3頭のマーモセット細胞は FACS 解析で MSCs の特異的マーカーの CD90 陽性細胞は 67.4%~94.0%陽性、CD73 陽性細胞は2頭で 23.5%,52.0%であった (図 2)。CD105 についての FACS 解析はマーモセットでの FACS 用個体が入手困難なため行われなかった。



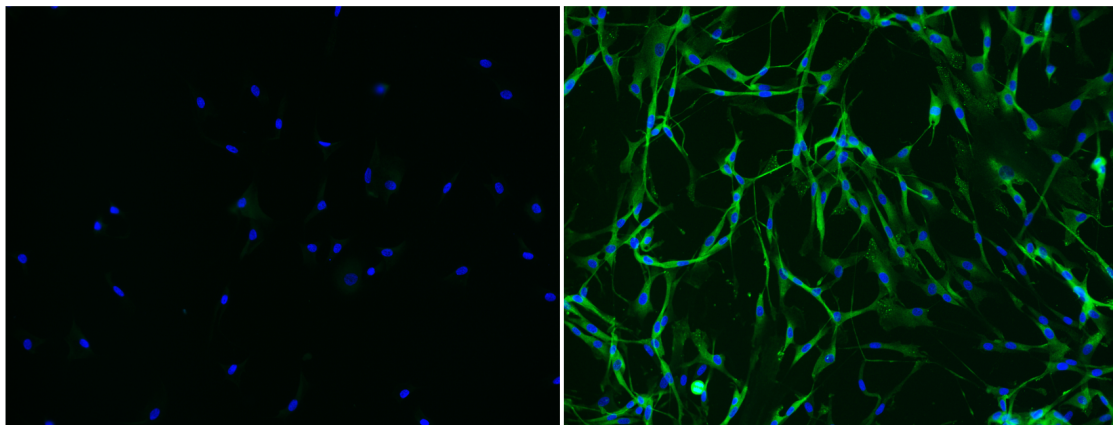
#22039                                      #22040                                      #22054  
 図 2      MSCのFACS解析      (CD90, CD73, CD34, CD117)

\*細胞免疫学的染色法では細胞免疫用 MSCs 特異的抗体 CD90 (図 3) と CD105 (図 4) での陽性結果が得られた。



DAPI : blue, CD90 : FITC x200

図3 CD90陽生細胞 (#22039 cul 1day)



DAPI : blue, CD105 : FITC x200

図4 CD105陽性細胞 (#22040 cul 4day)

\*マウスやマーモセット造血幹細胞のマーカである CD117 陽性細胞、ヒトで造血幹細胞のマーカである CD34 陽性細胞はこれらの細胞には含まれていなかった (図 2)。

\*マーモセットでの MSCs についてのこれまでの報告はかなり少ないが、その中でコモンマーモセットでは大腿骨や上腕骨から細胞分離が可能であり、これら細胞から MSCs の特徴を持つ細胞が培養可能であることがわかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Takaaki Kaneko, Misako Komatsu, Tetsuo Yamamori, Noritaka Ichinohe & Hideyuki Okano	4. 巻 5
2. 論文標題 Cortical neural dynamics unveil the rhythm of natural visual behavior in marmosets	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03052-1.	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 -

1. 著者名 Satoshi Watanabe, Tohru Kurotani, Tomofumi Oga, Jun Noguchi, Risa Isoda, Akiko Nakagami, Kazuhisa Sakai, Keiko Nakagaki, Kayo Sumida, Kohei Hoshino, Koichi Saito, Izuru Miyawaki, Masayuki Sekiguchi, Keiji Wada, Takafumi Minamimoto & Noritaka Ichinohe	4. 巻 12
2. 論文標題 Functional and molecular characterization of a non-human primate model of autism spectrum disorder shows similarity with the human disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5388
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-25487-6.	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 Uyeda A, Quan L, Kato Y, Muramatsu N, Tanabe S, Sakai K, Ichinohe N, Kawahara Y, Suzuki T, Muramatsu R	4. 巻 69
2. 論文標題 Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 as a novel regulator of oligodendrocyte differentiation in the central nervous system remyelination	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2591-2604
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/glia.24060. Epub 2021 Jul 16.	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 Komatsu H, Nishio A, Ichinohe N, Goda N	4. 巻 226
2. 論文標題 Structure and function of neural circuit related to gloss perception in the macaque inferior temporal cortex: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Struct Funct.	6. 最初と最後の頁 3023-3030
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00429-021-02324-6.	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0件

〔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
---------	---------