

令和 4 年 4 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22892

研究課題名（和文）臍帯由来細胞がミクログリアに及ぼすミトコンドリア制御とアクチンダイナミクスの解明

研究課題名（英文）Elucidation of mitochondrial regulation and actin dynamics of umbilical cord-derived mesenchymal cells on microglia

研究代表者

向井 丈雄（Mukai, Takeo）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60871324

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：LPS活性化ミクログリア初代培養に対して臍帯由来間葉系細胞（UC-MSc）が及ぼす特性変化の解析を行った。活性化ミクログリアの炎症性サイトカイン、NF- κ B pathwayがUC-MScにより有意に低下し、低下した貪食能やアクチンダイナミクスがUC-MSc共培養により改善することを証明した。またこれら現象のメカニズムとしてRhoGTPaseであるcdc42とRac1がUC-MScで有意に上昇し、それにはPI3K/Akt-RhoGTPase pathwayの活性化が寄与していることを証明した。LPS刺激によってミトコンドリアの脱分極の程度は有意な変化はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

UC-MScが活性化ミクログリアに及ぼす形態変化・貪食能変化とそのメカニズムをアクチンダイナミクスの観点から解明した比較実験はなく、本研究が国内外初となる。従って本研究は損傷脳組織において活性型ミクログリアを鎮静化させる新規治療の基盤となり、将来のMScを用いた細胞治療へと繋がる可能性を示すと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the changes in characteristics of umbilical cord-derived mesenchymal cells (UC-MSc) on LPS-activated microglial primary cultures. It was demonstrated that the inflammatory cytokine NF- κ B pathway of activated microglia was significantly reduced by UC-MSc, and that the reduced phagocytic ability and actin dynamics were improved by UC-MSc co-culture. We also demonstrated that cdc42 and Rac1 were significantly elevated in UC-MSc as the mechanism of these phenomena, which was contributed by the activation of the PI3K / Akt-Rho GTPase pathway. LPS stimulation did not significantly change the degree of mitochondrial depolarization.

研究分野：新生児学

キーワード：臍帯由来間葉系細胞 ミクログリア アクチンダイナミクス ミトコンドリア

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

UC-MSC が神経傷害における治療介入の標的となり得る活性化ミクログリアの炎症性サイトカインを減少させることは確認されているが、免疫調節能以外の「UC-MSC がミクログリアに及ぼす形態変化・食食能変化とそのメカニズム」はまだ解明されていない。

申請者はミクログリアに対する UC-MSC の及ぼす効果についても検討するため、スウェーデンカロリンスカ研究所に留学し、東京大学医科学研究所と MTA 契約の後に国内発の UC-MSC を空輸してトランスジェニックマウスの LPS 活性化ミクログリア初代培養に対して UC-MSC が及ぼす特性変化の解析を行った。

2. 研究の目的

本研究ではマウスのミクログリア初代培養活性化モデルと UC-MSC の共培養を行うことで、活性化ミクログリアの形態変化と食食能変化をアクチンダイナミクスの観点から共に追究し、そのメカニズムとなるミトコンドリア機能、PI3K / Akt - protein kinase C (PKC) pathway の活性について検討することで、UC-MSC が活性化ミクログリアに及ぼすアクチンダイナミクスとそれによって生じる特性変化のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

① マウス由来のミクログリアを MACS により磁気分離した後、初代培養を LPS により活性化する。その後 UC-MSC とインサートにより共培養する。以下の検討項目についてコントロール群、LPS 群、LPS+MSC 群で比較検討を行う。

② 少なくとも 24 時間共培養した後、ミクログリアを Iba-1 と F-Actin で免疫染色し細胞骨格を明らかにした形態観察を行い、非活性化型（軸索突起状）／活性化型（アメーバ状）の極性評価を行う。また FACS、免疫染色により CD206/86 と Arg1/iNOS 発現の割合も評価することで、それぞれ非活性化型／活性化型の極性を定量する。

③ E-coli bioparticle を用いて食食能を定量すると共にその際のミクログリアの形態変化（E-Coli を内包しようとする F-Actin ring の形成）を評価する。

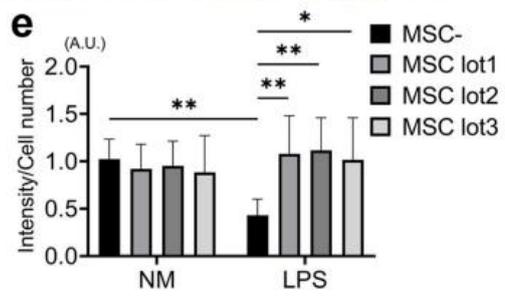
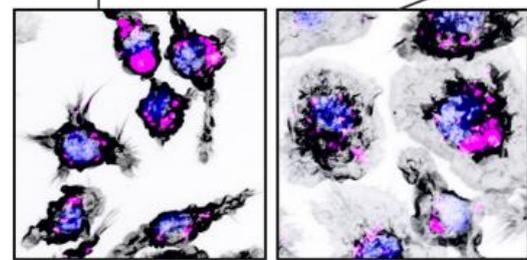
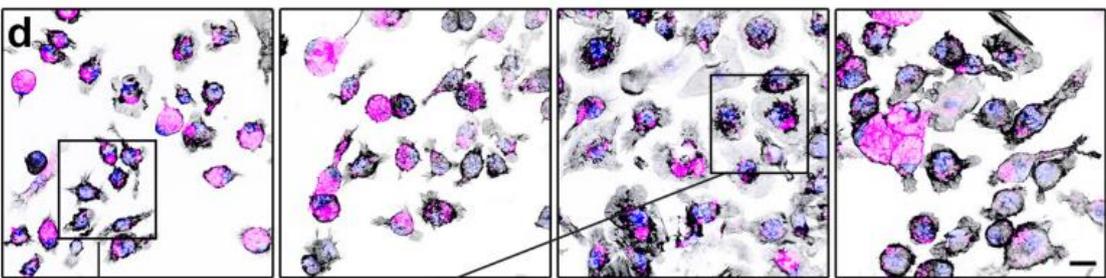
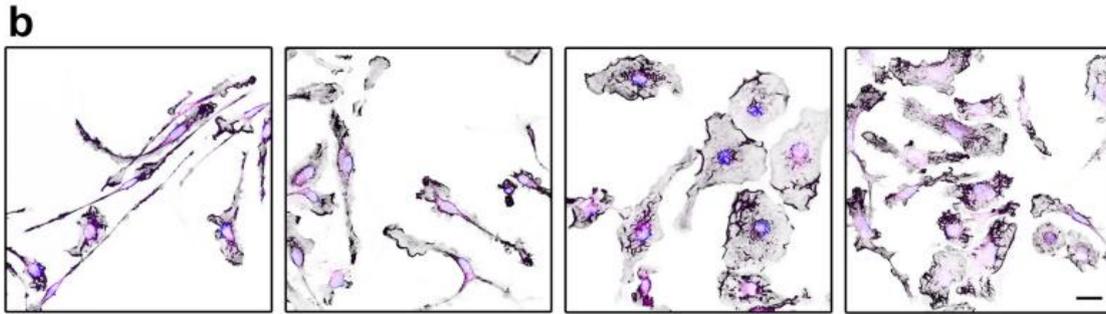
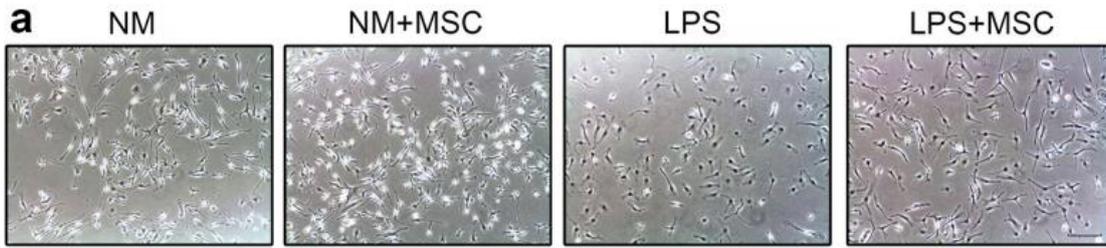
④ アクチンダイナミクスの原動力となるミトコンドリア ATP 産生機能検討のため ATP 濃度を測定すると共に、電子伝達系酵素複合体の活性とミトコンドリア膜電位差・アポトーシスを定量し比較検討する。

4. 研究成果

活性化ミクログリアの炎症性サイトカイン、NF κ B pathway が UC-MSC により有意に低下し、低下した食食能やアクチンダイナミクスが UC-MSC 共培養により改善することを証明した（図 a. 位相差顕微鏡写真。 b. phalloidin 染色によるアクチンダイナミクス c. skeleton analysis d. E Coli particle による食食能評価 NM:Normal Medium）。

またこれら現象のメカニズムとして RhoGTPase である cdc42 と Rac1 が UC-MSC で有意に上昇し、それには PI3K/Akt-RhoGTPase pathway の活性化が寄与していることを証明した。（Mukai et al. *Cell Death Discovery* (2021) 7:46）

LPS 刺激によってミトコンドリアの脱分極の程度として膜電位差は有意な変化はみられなかった。



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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeo Mukai, Elena Di Martino, Shunichiro Tsuji, Klas Blomgren, Tokiko Nagamura-Inoue, Ulrika Aden	4. 巻 7
2. 論文標題 Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells immunomodulate and restore actin dynamics and phagocytosis of LPS-activated microglia via PI3K/Akt/Rho GTPase pathway.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell death discovery	6. 最初と最後の頁 46-46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41420-021-00436-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 向井丈雄
2. 発表標題 臍帯由来間葉系細胞が活性化型ミクログリアに及ぼす特性変化についての検討
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021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
---------	---------