

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 26 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究 B

研究期間：2010～2012

課題番号：22390274

研究課題名（和文）脳虚血への自家移植を目指したヒト脂肪組織由来幹細胞の分離培養法の確立

研究課題名（英文）Establishment of the purification and culture methods of human adipose-derived stem cells as an autogenous graft to ischemic brain tissue.

研究代表者

吉村 紳一（YOSHIMURA SHINICHI）

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40240353

研究成果の概要（和文）：

脳卒中医療は、今後更なる高齢化社会を迎える我が国において重大な社会問題の 1 つといえ、幹細胞移植による神経ネットワークの再生や、幹細胞の分泌因子による神経保護作用に大きな期待が寄せられている。本研究では成人皮下脂肪組織より脂肪組織由来幹細胞 (ADSCs) の分離培養法を確立し、さらにマウス脳梗塞モデルを用い急性期脳梗塞に対する ADSCs の持つ神経保護作用とその作用機序につき検討を行った。ADSCs は急性期脳梗塞モデルに対し保護作用を有し、主に分泌因子の神経保護作用、抗炎症作用による機序である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we tried to establish the methods of purification of human adipose-derived stem cells, and investigated to elucidate the neuroprotective effects and mechanisms of ADSCs against acute cerebral ischemia. Administration of ADSCs had neuroprotective effects against experimental ischemic stroke and its therapeutic effects were mainly owing to neuroprotective and anti-inflammatory mechanisms of its secreting factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	11,100,000	3,330,000	14,430,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脂肪由来幹細胞，脳虚血モデル，ヒト脂肪細胞，移植，培養

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は以前より癌、心臓病と並ぶ我が国の 3 大死亡原因の 1 つである。脳卒中による死亡率こそ低下しているとはいえ、脳卒中発症率は心筋梗塞の発症率の約 3～10 倍にもの

ぼり、寝たきりとなる高齢者の約 4 割が脳卒中患者である。さらに、国民総医療費の 1 割以上が脳卒中関連医療に使われている。これらの背景から、脳卒中医療は、今後更なる高齢化社会を迎える我が国において重大な社

会問題の1つといえる。現在の臨床現場においては、組織型プラスミノゲンアクチベータ (rt-PA) や血管内治療による血栓回収療法の認可など、脳虚血超急性期における脳梗塞周辺領域 (虚血ペナンプラ) の救済が脳梗塞の治療に革新的変化をもたらす一方で、脳卒中により傷害を受けた神経組織に対する有効な治療法はほとんどない。脳卒中による死亡率や後遺症を低減するための新たな治療法の開発が強く望まれており、近年では、幹細胞移植による神経ネットワークの再生や、幹細胞の分泌因子による神経保護作用に大きな期待が寄せられている。幹細胞とは自己複製能と多分化能 (複数系統の組織への分化能) を併せ持つ細胞であり、成人の中胚葉組織 (骨髄、筋、脂肪組織など) 中にも幹細胞の性質をもつ細胞が存在することが知られており、これらは間葉系由来幹細胞と総称される。脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived stem cells; ADSCs) も間葉系由来幹細胞の1つに分類される。ADSCs は成人の皮下組織に多量に存在する成熟脂肪組織より分離、培養が可能であり、安全かつ低侵襲に摘出可能であり、培養効率がよい点や、胚細胞の使用や遺伝子導入が不要であるために倫理的問題が少ない点などから、臨床応用の観点からは非常に好ましい一面を持った幹細胞であるといえる。

そこで今回我々は、虚血性脳卒中による神経傷害に対するADSCsの効果について検討し、将来の幹細胞自家移植のソースとしてのADSCsの可能性について検討を行った。

2. 研究の目的

脂肪組織から間葉系幹細胞 (ADSCs) が得られることが報告され注目されている。このADSCsは同様に間葉系由来の幹細胞を分離、培養可能である骨髄からの採取に比べ、低侵襲かつ大量に採取可能であり、しかも培養が簡便で増殖速度も早いという利点を有する。我々は2006年にマウスADSCsの培養に成功しているが、これまでADSCsの実験的脳虚血に対する有効性についての報告は散見され、我々もマウスADSCsが実験的脳虚血に対し優れた保護作用を有することを報告した (Ikegame Y, et al. Cytotherapy, 2011)。

本研究ではヒトへの臨床応用を目指し、ヒト脂肪細胞からのADSCs培養方法をまず確立することを目的とし、さらに実験的脳虚血に対するヒトADSCsの有効性についての検討を行い、臨床応用に向けての展望や課題を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

1) ヒト脂肪細胞からのADSCs 分離培養法の確立: 当科における腹部切開を伴う手術 (脳室腹腔短絡術等) において採取した脂肪組織

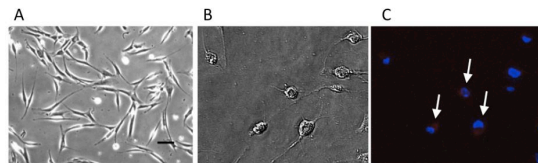
を使用し、過去の文献およびこれまでにわれわれが確立した分離、培養法を用いADSCsを分離、培養する。

2) ADSCsの移植が急性期より脳虚血に対し保護作用を有することはすでにわれわれを含めていくつかの報告がある。このことはADSCsの分泌因子による神経保護作用が特に急性期においては主たる作用機序であると考えられる。このため、ADSCsの培養上清をマウス脳虚血モデルに投与し、その作用を検討する。

3) ADSCsの主たる分泌因子を同定し、その神経保護作用と機序につき検討する。

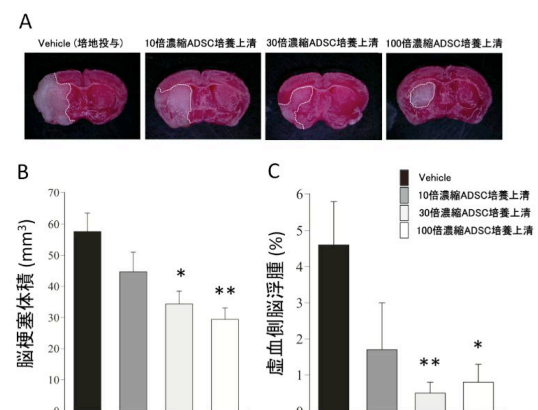
4. 研究成果

1) 過去の報告に準じて、ヒト脂肪組織よりADSCsを分離、培養した。また、これらADSCsが多分化能を有しており、幹細胞の性格を持つ細胞であることを確認した。

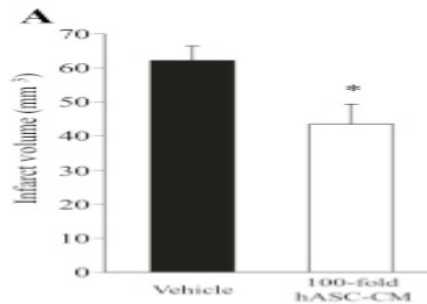


A: 成人腹部の成熟脂肪細胞より分離した紡錘状のADSCs。B: 神経分化培地にて分化誘導させたADSCs。C: 分化誘導されたADSCsが神経細胞マーカーであるNeuN (赤) を発現している。

2) マウスおよびヒトADSCsを培養し、その分泌因子を含む培養上清を種々の濃度に濃縮し、マウス脳虚血モデルに投与したところ、用量依存的に脳梗塞体積を減少させた。

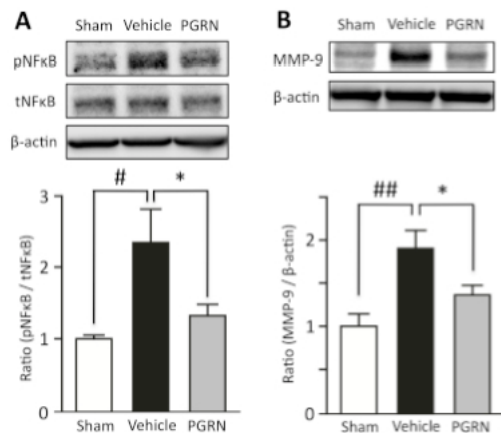


マウス 2 時間 MCAO-再灌流モデルに対するマウス ADSC 培養上清の脳室内投与の脳梗塞抑制効果。虚血 1 時間前に各種濃度のマウスADSC 培養上清を脳室内投与した結果、用量依存的に脳梗塞体積を減少させている (A: 典型例、B: 脳梗塞体積、C: 脳浮腫、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs. Vehicle 群)。



A: マウス 2 時間 MCAO-再灌流モデルに対するヒト ADSC 培養上清の脳室内投与の脳梗塞抑制効果。マウス ADSC 培養上清投与時と同様に、脳梗塞体積を有意に縮小させた * p < 0.05 vs. Vehicle 群)。

3) ADSCs 培養上清中に含まれる因子を抗体アレイを用い検索したところ、Progranulin (PGRN)、TIMP-1 といった因子を成熟脂肪細胞培養上清と比較し特に多く含んでいることが明らかとなった。TIMP-1 についてはすでに神経保護作用が明らかにされているため、今回 PGRN に注目し、マウス脳虚血モデルに対し投与したところ、用量依存的の脳梗塞体積を縮小させた。また、梗塞脳における主要な炎症メディエーターである Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) のリン酸化および matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) の発現を低下させることが示された。



マウス 2 時間 MCAO-再灌流モデルに対する PGRN 脳室内投与時の炎症性メディエーターの変化。A: NF- κ B のリン酸化。B: MMP-9 の発現 # p < 0.05, ## p < 0.01 vs. sham 群; * p < 0.05 vs. Vehicle 群)。

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

① Egashira Y, Suzuki Y, Azuma Y, Mishiro K, Sugitani S, Tsuruma K, Shimazawa M, Yoshimura S, Kashimata M, Iwama T, Hara

H: The Growth Factor Progranulin Attenuates Neuronal Injury Induced by Cerebral Ischemia-Reperfusion Through the Suppression of Neutrophil Recruitment. J Neuroinflammation (under revision) 査読あり

② Ishiguro M, Kawasaki K, Suzuki Y, Ishizuka F, Mishiro K, Egashira Y, Ikegaki I, Tsuruma K, Shimazawa M, Yoshimura S, Iwama T, Hara H: A Rho kinase (ROCK) inhibitor, fasudil, prevents matrix metalloproteinase-9-related hemorrhagic transformation in mice treated with tissue plasminogen activator. Neuroscience 220: 302-312, 2012 査読あり

③ Egashira Y, Sugitani S, Suzuki Y, Mishiro K, Tsuruma K, Shimazawa M, Yoshimura S, Iwama T, Hara H: The conditioned medium of murine and human adipose-derived stem cells exerts neuroprotective effects against experimental stroke model. Brain Res 1461: 87-95, 2012 査読あり

④ Tanaka Y, Fukumitsu H, Soumiya H, Yoshimura S, Iwama T, Furukawa S: 2-Decenoic acid ethyl ester, a compound that elicits neurotrophin-like intracellular signals, facilitating functional recovery from cerebral infarction in mice. Int J Mol Sci 13: 4968-4981, 2012 査読あり

⑤ Suzuki Y, Hattori K, Hamanaka J, Murase T, Egashira Y, Mishiro K, Ishiguro M, Tsuruma K, Hirose Y, Tanaka H, Yoshimura S, Shimazawa M, Inagaki N, Nagasawa H, Iwama T, Hara H: Pharmacological inhibition of TLR4-NOX4 signal protects against neuronal death in transient focal ischemia. Sci Rep 2: 896, 2012 査読あり

⑥ Ikegame Y, Yamashita K, Hayashi SI, Mizuno H, Tawada M, You F, Yamada K, Tanaka Y, Egashira Y, Nakashima S, Yoshimura S, Iwama T: Comparison of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for ischemic stroke therapy. CYTOTHERAPY 13: 675-85, 2011 査読あり

⑦ Ishiguro M, Suzuki Y, Mishiro K, Kakino M, Tsuruma K, Shimazawa M, Yoshimura S, Iwama T, Hara H: Blockade of phosphodiesterase-III protects against oxygen-glucose deprivation in endothelial cells by upregulation of VE-cadherin. Curr Neurovasc Res 8: 86-94, 2011 査読あり

- ⑧ Enomoto Y, Adachi S, Doi T, Natsume H, Kato K, Matsushima-Nishiwaki R, Akamatsu S, Tokuda H, Yoshimura S, Otsuka T, Kozawa O, Iwama T: cAMP regulates ADP-induced HSP27 phosphorylation in human platelets. *Int J Mol Med* 27: 695-700, 2011 査読あり
- ⑨ Ikegame Y, Yamashita K, Hayashi SI, Mizuno H, Tawada M, You F, Yamada K, Tanaka Y, Egashira Y, Nakashima S, Yoshimura SI, Iwama T: Comparison of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for ischemic stroke therapy. *Cytotherapy* 13: 675-685, 2011 査読あり
- ⑩ Ishiguro M, Mishiro K, Fujiwara Y, Chen H, Izuta H, Tsuruma K, Shimazawa M, Yoshimura S, Satoh M, Iwama T, Hara H: Phosphodiesterase-III inhibitor prevents hemorrhagic transformation induced by focal cerebral ischemia in mice treated with tPA. *PLoS One*. 2010 Dec 6;5(12):e15178. 査読あり
- ⑪ Ikegame Y, Yamashita K, Hayashi S, Yoshimura S, Nakashima S, Iwama T: Neutrophil elastase inhibitor prevents ischemic brain damage via reduction of vasogenic edema. *Hypertens Res* 33: 703-7, 2010 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

- ① Egashira Y, Sugitani S, Suzuki Y, Mishiro K, Tsuruma K, Shimazawa M, Yoshimura S, Iwama T, Hara H: The Growth Factor Progranulin Suppresses Inflammatory Reactions and Attenuates Neuronal Injury Induced by Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion in Mice. *International Stroke Conference*. Honolulu, 2013.2.6 (USA)
- ② 江頭裕介, 杉谷 創, 鈴木悠起也, 鶴間一寛, 嶋澤雅光, 吉村紳一, 岩間 亨, 原英彰: マウス脳虚血モデルに対する成長因子プログランニリンの保護作用. 第 24 回日本脳循環代謝学会総会. 広島, 2012. 11. 8
- ③ 江頭裕介, 杉谷 創, 鶴間一寛, 嶋澤雅光, 吉村紳一, 岩間 亨, 原 英彰: マウス脳梗塞モデルに対する脂肪組織由来幹細胞培養上清の保護作用. 第 71 回日本脳神経外科学会学術総会. 大阪, 2012. 10. 19
- ④ 江頭裕介, 杉谷 創, 鈴木悠希也, 鶴間一寛, 嶋澤雅光, 吉村紳一, 岩間 亨, 原 英彰: マウス脳虚血モデルに対する脂肪組織由来幹細胞培養上清の保護作用.

第 23 回日本脳循環代謝学会総会 東京, 2011. 11. 5

- ⑤ 石黒光紀, 三代圭祐, 藤原泰之, 陳 華岳, 伊豆田洋志, 鶴間一寛, 嶋澤雅光, 吉村紳一, 佐藤雅彦, 岩間 亨, 原 英彰: マウス中大脳動脈虚血再灌流モデルに対する tPA とシロスタゾールの併用療法の検討. 第 22 回日本脳循環代謝学会総会 大阪, 2010.11.27
- ⑥ 石黒光紀, 嶋澤雅光, 吉村紳一, 岩間 亨, 原 英彰: マウス中大脳動脈虚血再灌流モデルに対する rt-PA とシロスタゾールの併用療法の検討. 第 35 回日本脳卒中学会総会 盛岡, 2010.4.16

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.gifu-u.ac.jp/neurosurgery/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 紳一 (YOSHIMURA SHINICHI)
岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 40240353

(2) 研究分担者

岩間 亨 (IWAMA TORU)
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 20303498

研究分担者

矢野 大仁 (YANO HIROHITO)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00332685

研究分担者
榎本 由貴子 (ENOMOTO YUKIKO)
岐阜大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20377659

研究分担者
大江 直行 (OHE NAOYUKI)
岐阜大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60362159

研究分担者
副田 明男 (SOEDA AKIO)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20444276

(3) 連携研究者
江頭 裕介 (EGASHIRA YUSUKE)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50547677

連携研究者
田中 嘉隆 (TANAKA YOSHITAKA)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00402199

連携研究者
池亀 由香 (IKEGAME YUKA)
岐阜大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50402201