

## 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 6 月 17 日現在

機関番号：84503

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：平成22年度～平成24年度

課題番号：22650075

研究課題名（和文）

若齢造血系幹細胞の骨髓腔内移植による老齢個体の若返り

研究課題名（英文）

Rejuvenation of microcirculation in aged rats by young hematopoietic cell transplantation

研究代表者

田口 明彦 (AKIHIKO TAGUCHI)

先端医療センター研究所 再生医療研究部 部長

研究者番号：10359276

研究成果の概要（和文）：

申請者は脳血管障害患者の末梢血中造血系幹細胞の減少・老化が、脳循環代謝の低下・脳梗塞の発症・認知機能の悪化と強く関連していることを明らかにしてきたが、本研究では老齢ラットに対する若齢造血系幹細胞移植を行い、老齢個体に若返り効果が得られるかの検討を行った。その結果、老齢個体の造血系幹細胞を若返らせることにより、老化とともに障害されている脳循環障害時の血管反応性が著明に向上することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Circulating bone marrow-derived immature cells have been implicated in homeostasis of the microvasculature, and decreased levels of circulating endothelial progenitor cells, associated with aging, correlate with poor clinical outcomes in a range of cardiovascular diseases. We transplanted bone marrow cells from young stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHR-SP) into aged SHR-SP, and found that animals transplanted with bone marrow from young SHR-SP displayed an increase in density of the microvasculature in the periinfarction zone, reduced ischemic brain damage and improved neurologic function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,200,000	0	1,200,000
平成23年度	560,000	240,000	800,000
平成24年度	560,000	240,000	800,000
総計	2,320,000	480,000	2,800,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学、神経病理学

キーワード：血管再生、造血系幹細胞、老化、若返り、脳梗塞、腎障害、骨髓単核球、Tie2

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

胎生期において血管系と造血系は共に hemangioblast より発生しているだけでなく、成体においても造血系幹細胞は微小循環の維持に重要な働きをしていることが示されている。脳の微小循環網は常に改変を伴う動的な状態で恒常性が維持されているが、申請者らは末梢血中造血系幹細胞が微小循環維持・血管再生を介して神経機能維持・神経再生にも重要な働きをしていることを明らかにしてきた (Taguchi et al, Circulation 2004, JCBFM 2008, JCBFM 2009, J Alz Dis. 2009)。また、海外からの報告においても、老齢個体と若齢個体の parabiosis (二つの動物個体の体循環の接合) により、老齢個体の細胞・臓器の再生能力の向上・若返りを促進することが明らかにされており (Conboy et al, Nature 2005)、末梢血中に存在する因子により、加齢後の細胞・臓器であっても若返りを示す能力が存在することが示されている。

### 2. 研究の目的

(1) 我々は、造血系幹細胞を血管内ではなく骨髄腔内に直接移植することにより、放射線照射や chemotherapy 等の前処置がなくても、末梢血中のキメラを形成することを既に発見している。本研究期間においては若齢造血系幹細胞の骨髄腔内移植を行い、骨髄細胞の若返りが老齢個体にどのような影響を与えているかを明らかにする。

(2) 申請者は細胞治療に関して単に基礎的研究を行うだけでなく、その成果を臨床試験にまで繋げていくために必要な技術・知識・情報・臨床的基盤を有しており、本研究により得られた造血幹細胞移植に関する知見も、Buerger 病患者に対する自己骨髄単核球移植 (Taguchi et al, Eur J Vasc End Surg 2003) や、心原性脳塞栓症患者に対する自己骨髄単核球移植に関する臨床試験 (現在実施中) と同様に、やがては臨床試験へ向けて発展させていくことが可能であると考えている。

(3) 老化の抑制・若返りは古代からの人類の悲願であるが、本研究において微小循環系を中心とした老化の抑制・若返りの可能性があり、本研究の成果は老化制御技術に関する科学技術の発展やそれに伴う新産業創出だけでなく、高齢化社会を迎えた我が国においても健康で活力のある社会の維持に寄与できると考えている。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験モデル

①脳微小循環が老化により著明に障害され

るモデルとして脳梗塞自然発症ラット (SHR-SP ラット) を用いる。SHR-SP ラットの 高塩分負荷時における平均的な寿命は約 60-80 週であり、本研究においては 50 週齢以降のラットを骨髄移植のレシピエントとして使用する。ドナーとしては 8 週齢以前の inbreeding で飼育している若齢 SHR-SP ラットを使用し、大腿骨より骨髄細胞を採取しその単核球分画をレシピエントラットの左脛骨に投与する。

②造血幹細胞の微小循環に与える影響の解析に関しては、我々が確立した非常に再現性の高い CB-17 マウスを用いた脳虚血実験系 (Taguchi et al. J Exp Stroke Transl Med 2010) を用いる。

(2) 骨髄細胞の若返りの脳神経機能・微小循環、寿命に対する効果の検証

造血系幹細胞の若返りによる下記の評価項目の変化についての検討を行う。

①末梢血中白血球：末梢血中に存在する顆粒球、リンパ球、血小板、赤血球数

②脳梗塞体積の変化：マクロ評価

③微小循環の構造的変化：免疫組織学的評価

④神経機能に与える影響：water maze test、open field test

⑤サイトカイン：血中および脳虚血周囲における IL-1、IL-6、MCP-1、TNF 濃度の定量

(3) 骨髄細胞移植が障害された微小血管に与える効果の検証

移植細胞の脳障害部位に与える影響について、免疫組織学的評価および電顕による詳細な微小構造の変化についての検討を行う。

### 4. 研究成果

(1) 若齢造血系幹細胞移植により老齢個体において観察された変化は下記の通りであった。

①移植細胞のキメラ率は 5%：移植後も末梢血中の各白血球分画の変化は観察されなかった。また、オスメス個体を用いた FISH 解析の結果、移植 30 日後における移植細胞のキメラ率は 5%であった。

②経過中の死亡率の減少：細胞移植後 (BMT) 60 日間 (移植 30 日後に脳梗塞作成) での高齢ラット死亡率は、若齢細胞移植群 27%、コントロール群 63%であった (図 1)。

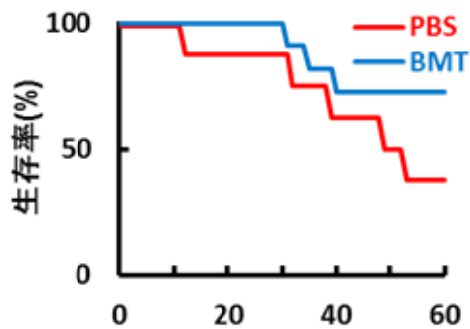


図1 細胞移植後日数

③脳梗塞体積の減少：若齢造血系幹細胞移植 (BMT)により有意な梗塞体積の減少が観察された(図2)。

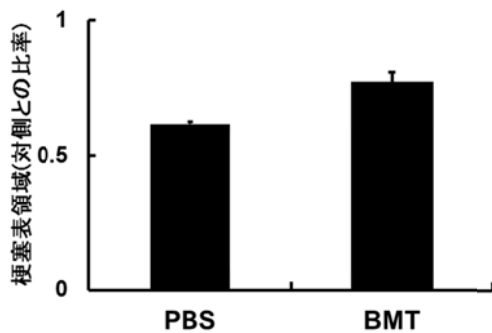


図2 細胞移植による脳梗塞領域の減少

④脳梗塞周囲の毛細血管密度の上昇：若齢造血系幹細胞移植 (BMT)により有意に密度が増加した(図3)。

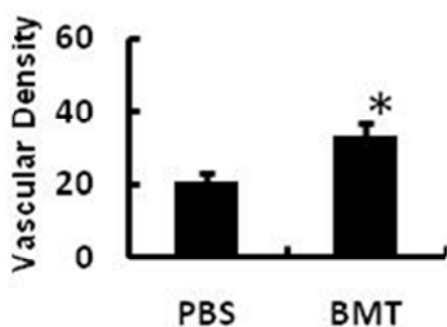


図3 脳梗塞周囲の血管密度

⑤大脳皮質機能の改善：若齢造血系幹細胞移植 (BMT)により open field test で有意な皮質機能の改善が認められた(図4)。

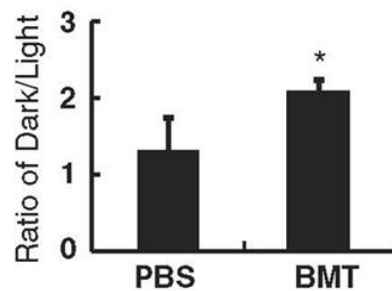


図4 明条件に対する反応性

⑥サイトカイン変化：若齢造血系幹細胞移植 (BMT)により脳梗塞部における IL-1 $\beta$ 、MCP-1の上昇が認められた(図5)。

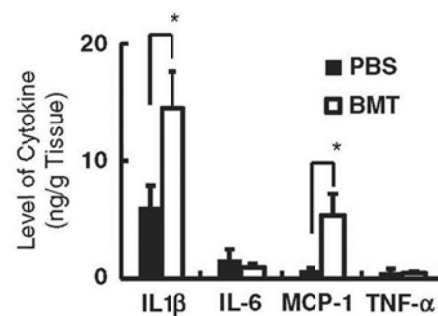


図5 梗塞領域でのサイトカイン濃度

(2) 骨髄細胞移植の障害された微小血管に与える効果の組織学的な変化は下記の通りであった。

①光学顕微鏡を用いた解析：造血系幹細胞移植により、血液脳関門を構成する血管内皮細胞と周細胞の乖離が抑制され、血管内皮細胞の細胞死が抑制された。

②電子顕微鏡による解析：ミトコンドリアの空胞化の抑制、tight junctionの解離の抑制、基底膜の保護が観察され、また骨髄単核球の血液脳関門を越えた浸潤が観察された。

(3) 成果のまとめ

老齢個体に対する造血系幹細胞移植は、微小循環障害に対する治療効果(若返り効果)を有していることが明らかになり、またその機序として造血系幹細胞と内皮細胞との接着、造血系幹細胞から内皮細胞へ出されている何かの因子が重要である可能性が高いと考えられた。老齢個体の若返りは、古代からの人類の夢であるが、本研究の成果はヒトにおいても自己臍帯血長期保存あるいは自己iPS細胞由来造血系幹細胞作成技術等と組み合わせることにより、微小循環の若返りが可能であることを示唆している。

## 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 2 件)

1. Taguchi A, Zhu P, Cao F, Kikuchi-Taura A, Kasahara Y, Stern DM, Soma T, Matsuyama T, Hata R.

Reduced ischemic brain injury by partial rejuvenation of bone marrow cells in aged rats.

J.Cereb.Blood.FlowMetab.2011;31:855-867  
(doi: 10.1038/jcbfm.2010.165.)

2. Taguchi A.

Cell based therapy for patients with vascular dementia.

Psychogeriatrics. 2010 ; 11 : 113-115.

(doi: 10.1111/j.1479-8301.2010.00343.x.)

[学会発表] (計 2 件)

1. 第 36 回日本脳卒中学会総会(2011. 07. 30: 京都)

田口 明彦

若齢ラット造血系幹細胞移植による老齡ラット微小循環障害の治療効果

2. 第 12 回日本再生医療学会総会(2013. 03. 21 : 横浜。シンポジスト)

田口 明彦

脳卒中患者に対する再生医療と今後の展望

[産業財産権]

特記すべきことなし

[その他]

ホームページ等

<http://www.ibri-kobe.org/laboratory/research/lab13/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 明彦 (AKIHIKO TAGUCHI)

先端医療センター研究所再生医療研究部  
部長

研究者番号 : 1 0 3 5 9 2 7 6

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし