

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24年3月31日現在

機関番号：10101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22790508
 研究課題名（和文） 傷害脳内への骨髄由来間葉系幹細胞の高効率送達に基づく細胞治療

研究課題名（英文） Cell therapy based on high-efficiency delivery of mesenchymal stem cells into the injured brain

研究代表者
 片山 貴博（KATAYAMA TAKAHIRO）
 北海道大学・大学院薬学研究院・助教
 研究者番号：90399957

研究成果の概要（和文）：静脈内に投与された骨髄間葉系幹細胞（MSC）の脳実質内への高効率送達を目指し、ラットから採取・培養した脳微小血管内皮細胞（BMEC）およびMSCを用いて、MSCのBMEC層通過機構を解析するためのインビトロ評価系を構築した。この評価系を用いた生細胞イメージングにより、MSCが傍細胞経路でBMEC層を通過することを明らかにした。また、MAPキナーゼ阻害がMSCのBMEC層通過に影響を及ぼすことを示した。

研究成果の概要（英文）：The goal of this study is to achieve high-efficiency delivery of intravenously injected mesenchymal stem cells (MSCs) into the injured brain. We developed an *in vitro* culture system consisting of rat brain microvascular endothelial cells (BMECs) and bone marrow-derived MSCs. Live cell imaging using this system revealed that MSCs transmigrated across BMEC monolayers via a paracellular route. In addition, inhibition of MAP kinases affected transmigration of MSCs across BMEC monolayers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：神経薬理学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：骨髄間葉系幹細胞、脳血管内皮細胞、血液脳関門、リアルタイムイメージング、細胞治療、*in vitro* BBBモデル、脳細胞傷害、MAPキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞（iPS細胞）の作製が報じられて以降、幹細胞を用いた細胞治療は社会からの極めて大きな期待と注目を集めている。しかしながら、iPS細胞は腫瘍化の制御など今後クリアしなければならない課題も多く、臨床応用にはまだ時間がかかることは否めない。一方、骨髄間質細胞に由来し多

分化能を有する骨髄間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell; MSC）は、その採取が容易であり、かつ培養技術が確立している。また、患者本人から採取したMSCを自家移植できることから、拒絶反応を考慮する必要もない。既に骨再生などを目的とした臨床応用が開始されており、神経科学分野でも実験動物を用いた複数の研究から脳梗塞後の

神経障害に対する有用性が示されている。さらにヒトにおいてもその有用性が報告されており、本邦でも静脈内への MSC 投与により神経機能障害の改善が認められることが示されつつある。静脈内に投与された MSC は、血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) を構成する脳微小血管内皮細胞 (brain microvascular endothelial cell; BMEC) 層を超えて脳実質内へ浸潤し、傷害部位近傍へ集積する。また、集積した MSC は、神経系細胞への分化や神経新生の亢進など、様々な作用機序を介して神経機能の改善に寄与すると言われている。

2. 研究の目的

これらの背景から、MSC の経血管的細胞治療においては、1) BMEC 層の通過、2) 傷害部位への集積、3) 神経栄養因子等の産生亢進という 3 つの過程が、その治療効果を大きく左右すると考えられる。本研究では、その中でも特に、最初の関門でありそのメカニズムが未だほとんど明らかでない BMEC 層の通過過程に着目した。MSC の傷害脳内への送達の向上がさらなる神経機能の改善をもたらすという考えのもと、高効率での送達条件を探索・評価できる実験系を構築し、それを活用して傷害脳内への MSC の高効率送達を実現することを最終目標に、以下の研究を行った。

3. 研究の方法

(1) BMEC の単離および培養

イメージングに関する検討では、全ての細胞が緑色蛍光を発する SD-Tg(CAG-EGFP) ラットを、その他の検討には Wistar ラットを使用した。4-6 週齢のラット大脳皮質より一連の酵素処理によって得られた細胞懸濁液から、パーコール密度勾配遠心法によって BMEC を単離した。Puromycin 存在下で培養することで純度を高めたのち、細胞培養インサート (Transwell あるいは Millicell) のメンブラン上に播種した。細胞培養メンブランは、MSC を添加する実験ではポアサイズ $8.0 \mu\text{m}$ のものを、MSC は添加せず BMEC のみを培養・使用する実験に関してはポアサイズ $0.4 \mu\text{m}$ のものをそれぞれ使用した。

(2) MSC の単離・培養

SD-Tg(CAG-EGFP) ラット由来の BMEC を用いた実験に関しては Wistar ラットを、その他の実験に関しては SD-Tg(CAG-EGFP) ラットを用いた。MSC は、4-6 週齢のラット骨髄から採取し、培養した。実験には、継代数 2-4 回の細胞のみを用いた。

(3) 経内皮電気抵抗値 (transendothelial electrical resistance; TEER) 測定

BMEC 層のバリア機能は、TEER ($\Omega \times \text{cm}^2$) を測定することで評価した。

(4) MSC 透過性試験

MSC は、少なくとも透過性試験 24 時間前に赤色蛍光試薬 PKH 26 で標識し、EGFP 発現 BMEC を 2 日間培養した Transwell インサートの upper チャンバーに添加した。MSC 添加前、および 3、6、9、12、24 時間後に顕微鏡観察ならびに TEER の測定を行った。

また、MAP キナーゼ阻害薬を用いた実験では、BMEC 存在下あるいは非存在下、MSC ($1.5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$) 添加と同時に MAK キナーゼ阻害薬を加え、24 時間後に BMEC 層を通過した MSC 数を計数した。

(5) 共焦点顕微鏡観察

透過性試験 24 時間後の細胞を、4%パラホルムアルデヒドで固定した後メンブランごと封入し、共焦点顕微鏡にて観察した。

(6) タイムラプスイメージング

MSC 添加 2 時間後から 22 時間、MSC および BMEC のタイムラプスイメージングを行った。Z 方向に $3 \mu\text{m}$ 間隔で 17 枚撮影し、これを 1 セットとして 12 分毎に撮影した。撮影中、細胞は通常の培養条件と同じ 37°C 、5% CO_2 環境下で維持された。

(7) 統計学的処理

データは平均値±標準誤差で表した。統計処理は two-way ANOVA (Bonferroni *post hoc* test) を用いた。危険率 5% 未満の場合に統計学的に有意な差があると判定した。

4. 研究成果

まずはじめに、upper チャンバーへ添加する MSC の細胞数が BMEC の単層構造およびバリア機能に及ぼす影響を、BMEC 層の顕微鏡観察および TEER の測定により検討した。 $1.5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ の MSC を upper チャンバーに加えたとき、図 1 A に示す様に、BMEC の単層構造に複数の間隙が観察された。すなわち、単層構造が崩壊していることが示された。一方、 $1.5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ で MSC を添加した場合には、観察した 24 時間後までのいずれの時点においても、MSC を加えていないコントロールと同様に BMEC 層の崩壊は認められなかった。また、顕微鏡観察と同時にを行った TEER の測定から、MSC の細胞数依存的に TEER が減少することが示されたが、 $1.5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ の細胞密度の場合には、少なくとも 12 時間後までは TEER に有意な変化は認められなかった (図 1 B)。これらのことから、以後の実験においては、MSC は $1.5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ の細胞密度で用いることにした。

続いて、upper チャンバーへの MSC 添加 24 時間後での MSC の局在を共焦点顕微鏡下で観察した。その結果、一部の MSC は、BMEC 層の上面に接着していた (図 2 A ; $2.94 \pm 0.21 \text{ cells/mm}^2$)。また、大部分の MSC は、平たく広がった接着形態を有し、BMEC 近傍に局在しており、詳細な検討から BMEC 層とメンブランの間に局在していることが明らかとなっ

た (図 2 B ; 29.18 ± 2.92 cells/mm²)。さらに、同様に接着形態を示す MSC の一部は、メンブランの下面に接着していた (図 2 C ; 3.99 ± 1.47 cells/mm²)。図 2 B および 2 C での MSC の局在は、これらの MSC が BMEC 層を通過した結果である。そこで、次に MSC がどのようにして BMEC 層を通過するのかを MSC 添加 2 時間後から 22 時間にわたるタイムラプスイメージングによって観察した。その結果、MSC が付着した箇所の BMEC 層に間隙が生じ、その間隙を通過して MSC が傍細胞経路で内皮下に遊走する様子が観察された。また、MSC の遊走に伴って生じた BMEC 層の間隙は MSC 通過後速やかに元の状態に戻る様子が観察された。

ここまでの検討から、MSC の BMEC 層通過を観察・評価できる実験系が構築できた。そこ

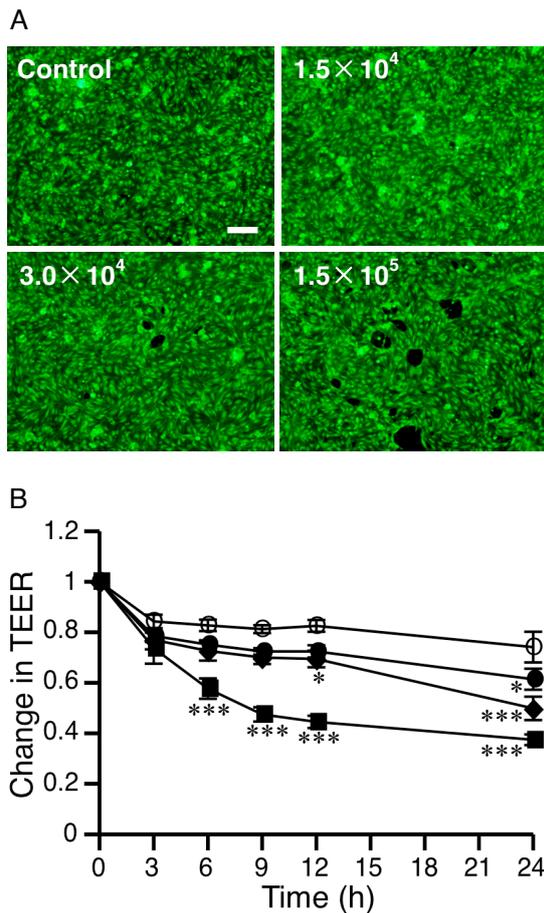


図 1 BMEC 層の単層構造およびバリア機能に対する MSC の影響。

MSC は、 1.5×10^4 (●)、 3.0×10^4 (◆)、 1.5×10^5 (■) cells/cm² の密度で upper チャンバーに加えられた。○は control。(A) MSC 添加 6 時間後における BMEC の顕微鏡像。Scale bar = 100 μm。(B) MSC 添加後 24 時間における TEER の変化。グラフは、MSC 添加前における TEER を 1 として表している。
* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ vs control。

で、MSC の高効率送達の実現することを最終目標に、種々の細胞機能調節に関する MAP

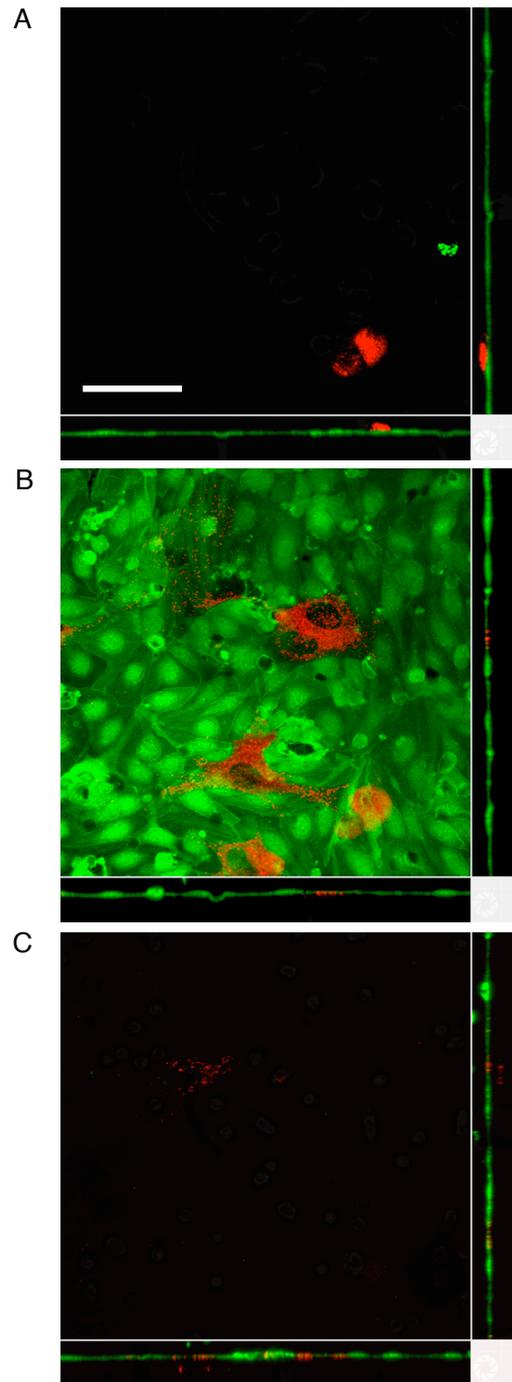


図 2 Upper チャンバーに添加された MSC の局在。

MSC (1.5×10^4 cells/cm²) を upper チャンバーに添加した 24 時間後における MSC (赤) および BMEC (緑) の共焦点顕微鏡像。写真は、3 つの異なる z 面 (BMEC 層上 (A)、BMEC 層と Transwell メンブランの間 (B)、メンブラン下面 (C)) における xy 像が、xz および yz 断面像とともに示されている。Scale bar = 50 μm。

キナーゼに着目し、ここで構築したインビトロ評価系を用いて MSC の BMEC 層通過への MAP キナーゼの関与をその選択的阻害薬を用いて検討した。検討の結果、MEK 阻害薬 (PD98059 および U0126) は MSC の BMEC 層通過を増加させた。一方で、p38 MAP キナーゼ阻害薬 (PD169316) 存在下では BMEC 層を通過する MSC 数は減少した。

この各 MAP キナーゼ阻害薬の効果が、MSC に直接的に作用しその遊走能を調節した結果であるのか、あるいは BMEC 層のバリア機能への作用を介してもたらされた結果であるのかを調べるために、以下の 2 つの検討を行った。1 つは BMEC からなるインビトロ BBB モデルを用いてそのバリア機能への MAP キナーゼ阻害薬の効果の検討であり、もう 1 つは BMEC 非存在下で MSC の遊走能への MAP キナーゼ阻害薬の効果に関する検討である。BMEC からなるインビトロ BBB モデルのバリア機能への MAP キナーゼ阻害薬の効果は TEER を指標として検討したところ、MEK 阻害薬 (PD98059 および U0126) は TEER を減少させ、逆に p38 MAP キナーゼ阻害薬 (PD169316 および SB203580) は TEER を上昇させた。すなわち、MEK 阻害薬はバリア機能を低下させ、p38 MAP キナーゼ阻害薬はバリア機能を増強した。続いて、MAP キナーゼ阻害薬存在下で MSC の遊走実験を行った。その結果、MEK 阻害薬および p38 MAP キナーゼ阻害薬の両阻害薬ともに MSC の遊走を抑制した。これらの結果から、少なくとも MEK 阻害薬に関しては、BMEC 存在下では MSC への直接的な作用よりも BMEC への作用の寄与が大きく、BMEC 層のバリア機能を低下させた結果として MSC の BMEC 層通過を増加させた可能性が示唆された。さらなる詳細な検討が必要であるものの、本研究結果から、幹細胞や白血球などの脳内浸潤機構をインビトロ実験系で評価する際には、遊走細胞のみを用いた遊走実験だけでなく、BMEC 存在下での遊走能の評価が重要であることが示唆された。

本研究において研究代表者は、静脈内に投与された MSC の BMEC 層通過を観察・評価できるインビトロ評価系の構築に成功し、MSC の BMEC 通過機構の一端を明らかにした。また、このインビトロ評価系を用いた MSC の BMEC 層通過に対する MAP キナーゼの関与についての一連の研究を通じて、MSC の脳内浸潤を検討する際には、BMEC と MSC の動態を同時に評価できる実験系の利用が重要であることを示した。本研究で得られた成果は、種々の脳疾患治療における MSC を用いた細胞治療の実現に向けて、有用なツールおよび基礎的知見を提供するものである。

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 1 件)

- ① Matsushita T., Kibayashi T., Katayama T., Yamashita Y., Suzuki S., Kawamata J., Honmou O., Minami M., Shimohama S. Mesenchymal stem cells transmigrate across brain microvascular endothelial cell monolayers through transiently formed inter-endothelial gaps. *Neurosci. Lett.*, 502: 41-45 (2011) 査読有
DOI: 10.1016/j.neulet.2011.07.021

[学会発表] (計 7 件)

- ① 片山貴博
骨髄間葉系幹細胞の血液脳関門通過機構における動態解析
第 85 回日本薬理学会年会
2012 年 3 月 14 日
京都国際会館 (京都府)
- ② 片山貴博
Mesenchymal stem cells transmigrate across brain microvascular endothelial cell monolayers through the transiently formed interendothelial gaps
Neuroscience2011, Society of Neuroscience 41st annual meeting
2011 年 11 月 14 日
Walter E. Washington Convention Center (USA)
- ③ 木林達也
In vitro 血液脳関門モデルを用いた骨髄間葉系幹細胞の動態解析
第 62 回日本薬理学会北部会
2011 年 9 月 29 日
江陽グランドホテル (宮城県)
- ④ 片山貴博
インビトロ血液脳関門モデルを用いた骨髄間葉系幹細胞の脳実質内浸潤機構の解析
第 54 回日本神経化学会大会
2011 年 9 月 27 日
瑠璃光 (石川県)
- ⑤ 松下隆司
骨髄間葉系幹細胞の脳実質内浸潤機構の解析
第 34 回日本神経科学大会
2011 年 9 月 15 日
パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑥ 木林達也
In vitro 血液脳関門モデルを用いた骨髄間葉系幹細胞の動態解析
日本薬学会北海道支部第 136 回例会

2011年5月21日
札幌コンベンションセンター（北海道）

- ⑦ 松下隆司
インビトロ血液脳関門モデルを用いた骨
髄幹細胞イメージング
第51回日本神経学会総会
2010年5月20日
東京国際フォーラム（東京都）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計0件）
○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 貴博 (KATAYAMA TAKAHIRO)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：90399957

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし