

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592093

研究課題名(和文) 幼若骨髄単核球移植による、老齢マウスでの脳虚血保護効果

研究課題名(英文) Protective effects of bone marrow-derived mononuclear cells in young mice on ischemic brain damage

研究代表者

秦 龍二(Hata, Ryuji)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：90258153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：成人末梢血中に存在する骨髄由来のCD34陽性が、血管内皮前駆細胞であることが明らかとなった。そしてこの血管内皮前駆細胞が加齢に伴い減少すると、心血管傷害も増悪することが明らかとなってきた。そこで、本研究では幼年期のマウスより採取した骨髄単核球が、脳虚血障害を軽減させる効果があるかどうかを老齢マウス脳虚血モデルを用いて検討した。脳虚血1ヶ月前に骨髄単核球を移植した場合には幼若骨髄単核球移植群で有意に保護効果を認めた。更にCD34陽性細胞を除外した骨髄単核球を移植してもやはり有意に保護効果を認めた。従って幼若骨髄単核球移植による脳虚血保護効果はCD34陽性細胞以外の幹細胞による可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Circulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells have been reported to be originated from bone marrow-derived mononuclear cells (=BMCs) and implicated in homeostasis of the microvasculature. Decreased levels of circulating endothelial progenitor cells, associated with aging correlate with poor clinical outcomes in a range of cardiovascular diseases. Herein, we transplanted BMCs from young mice (=yBMCs) into aged mice before and after cerebral ischemia. Aged mice transplanted with yBMCs before ischemia reduced ischemic brain damage whereas animals transplanted with yBMCs after ischemia did not. Furthermore, aged mice transplanted with yBMCs depleted of CD34 positive cells before ischemia also reduced ischemic brain damage. Although further investigations must be required to elucidate the fundamental mechanism underlying senescence of the brain vasculature, our results shows the possibility that factors other than CD34 have protective effects on ischemic brain damage.

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：cerebral ischemia aging stem cell transplantation

1. 研究開始当初の背景:

従来成体の血管形成は、既存の成熟血管内皮細胞が増殖・遊走して新たな血管を作り出す血管新生 (angiogenesis) という概念が中心であった。しかしながら成人の末梢血単核球分画から単離された CD34 陽性細胞が血管内皮細胞に分化することが発見され、成人末梢血中には血管内皮細胞に分化しうる CD34 陽性の血管内皮前駆細胞が存在することが明らかとなった (Science 275: 964-967, 1997)。そして胎生期にのみ認められるとされていた血管発生 (vasculogenesis) という現象が、成体においても同様に認められ、局所で血管内皮前駆細胞が増殖・分化し、新たな血管形成に係わっていることが明らかとなった (Nat Med. 5: 434-438, 1999)。

その後の研究により、CD34 陽性の血管内皮前駆細胞は骨髄単核球分画に存在し、骨髄単核球を移植すると虚血組織の血管新生を誘導できることがわかった (Circulation. 103: 897-903, 2001)。その結果自己骨髄単核球を用いた再生治療が、虚血性心疾患や末梢動脈閉塞症患者に対する新たな再生療法として確立されている。例えば急性期心筋梗塞患者に自己骨髄単核球を投与した臨床試験では、血管系を介する自己修復機構の促進により、慢性期に心機能が向上し、死亡率が低下することが報告されている (Am J Cardiol. 98:597-602, 2006)。

2. 研究の目的:

虚血性脳血管障害に対しても、虚血性心疾患や末梢動脈閉塞症と同様に、骨髄単核球を用いた再生療法が試みられている。骨髄単核球には血管内皮前駆細胞や造血幹細胞等の種々の幹細胞を含むと考えられ、これらの骨髄系幹細胞を移植すると、虚血領域での血管発生 (vasculogenesis) 効果や、サイトカインや増殖因子の分泌による血管新生 (angiogenesis) 効果 (即ち、既存の血管内皮細胞の増殖・遊走を促進する効果)、更に組織再生効果もあることが確認され、脳虚血障害が改善することが動物実験レベルで明らかになってきている。

また骨髄単核球移植による虚血改善効果は基本的に移植する血管内皮前駆細胞の数 (CD34 や CD31 陽性細胞の数) に依存することが知られている (PNAS USA 97: 3422-3427, 2000)。従ってより多くの血管内皮前駆細胞

を確保・投与することが一定の治療効果を得るためには必要と考えられる。しかしながら実際に治療を受ける患者は高齢であったり、種々の基礎疾患を持っている場合が多い。そしてそのいずれの場合でも幹細胞の数が減少しているだけでなく、細胞機能も低下していることが知られている (Curr Mol Med. 8:754-67, 2008)。そこで本研究では幼年期のマウスより採取した幼若な骨髄単核球を用いた細胞治療が脳虚血障害を軽減させる効果があるかどうかを、老齢マウス脳虚血モデルを用いて検討し、その脳保護機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 動物

本実験には4週、10ヶ月齢の C57Black/6J マウスを用いた。実験動物を一定の明暗サイクル及び温度 (22 ± 1) 条件下に飼育し、餌と水は自由摂取とした。以下の実験は愛媛大学医学部倫理委員会の承諾を得た後、愛媛大学医学部動物実験指針に則り行われた。

(2) 右中大脳動脈の一過性閉塞

10ヶ月齢の C57Black/6J マウスを用いた。ハロセン麻酔下に、ナイロン栓子法により右中大脳動脈起始部を60分間閉塞させた後再灌流させた。虚血中及び再灌流後1時間は直腸温を 37.0 ± 0.2 に保った。その後麻酔から覚醒していることを確認後、室温の飼育ケージに戻した。

(3) TTC 染色

再灌流24時間後に断頭し、0.5mm幅の脳スライスを作製した後、2% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) にて30分間染色した。その後、4% paraformaldehyde 液にて一晩固定した。脳梗塞量は TTC 染色後の脳スライスを画像に取り込み、梗塞量を定量した。

(4) サイトカイン測定

脳組織のサイトカイン量 (IL-6, TNF- α) を CBA mouse inflammation kit (BD Bioscience) を用いて測定した。

(5) 骨髄単核球の採取

生後4週または10ヶ月齢のマウスの大腿骨と脛骨より骨髄液を採取し、Ficoll-Isopaque 法 (J Cereb Blood Flow Metab. 31: 855-67, 2011) により、骨髄単核球を分離した。生後4週目のマウスより採取した骨髄単核球を幼若骨髄単核球 (young) とし生後10

ヶ月目のマウスより採取した骨髄単核球を老齡骨髄単核球 (aged) とした。

(6) FACSsort による、骨髄単核球からの CD34 陽性細胞の除去

The BD™ Mouse Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Isolation Kit を用いて FACSsort (BD FACSAria III sorter、BD biosciences) を行い、CD34 陽性細胞を分離し、CD34 陽性細胞を除外した骨髄単核球を集めた。

(7) 統計的処理

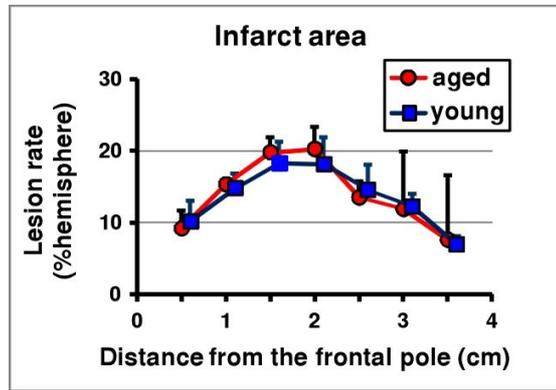
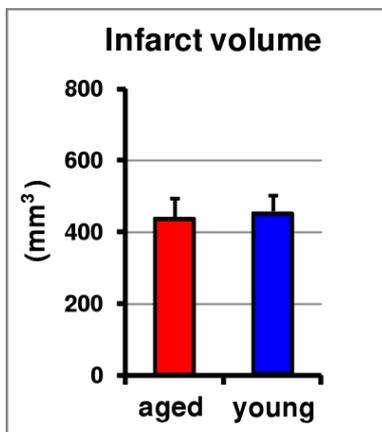
各分析データは2群の比較に関しては Student T 検定を行い、その他の解析に関しては One way 又は Two way analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparison test にて評価し、p 値が 0.05 以下を有意とした。全てのデータは mean ± SD にて表記した。

4. 研究成果

(1) 脳虚血後の骨髄単核球移植による保護効果

まず脳虚血直後に幼若骨髄単核球 (young) と老齡骨髄単核球 (aged) をそれぞれ 1×10^6 個、尾静脈より静注し、24 時間目の梗塞量を TTC 染色にて比較した。その結果両群間には有意差を認めず、脳虚血後に骨髄単核球移植を行っても有効ではないことが明らかとなった (図1)。

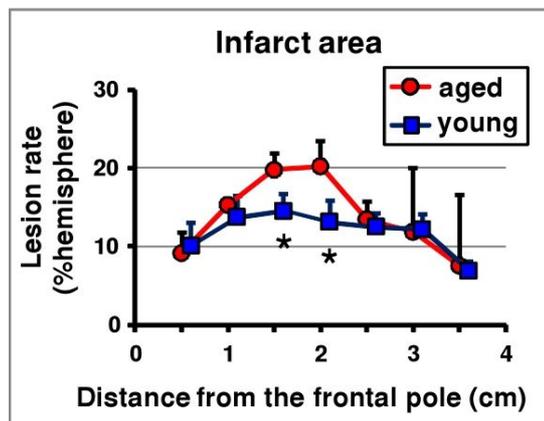
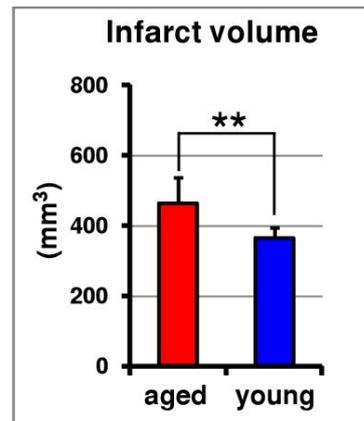
図1：幼若 (young) 及び老齡 (aged) 骨髄単核球移植 (脳虚血後) による脑梗塞量変化



(2) 脳虚血前の骨髄単核球移植による保護効果

脳虚血の1ヶ月前に幼若骨髄単核球 (young) と老齡骨髄単核球 (aged) をそれぞれ 1×10^6 個、尾静注し、1ヶ月後に脳虚血負荷 (60 分間の中大脳動脈閉塞) を行った。脳虚血負荷 24 時間目の梗塞量を TTC 染色にて比較した。その結果幼若骨髄単核球移植群で有意に脳虚血傷害の改善を認めた (** p < 0.01; * p < 0.05) (図2)。

図2：幼若 (young) 及び老齡 (aged) 骨髄単核球移植 (脳虚血前) による脑梗塞量変化



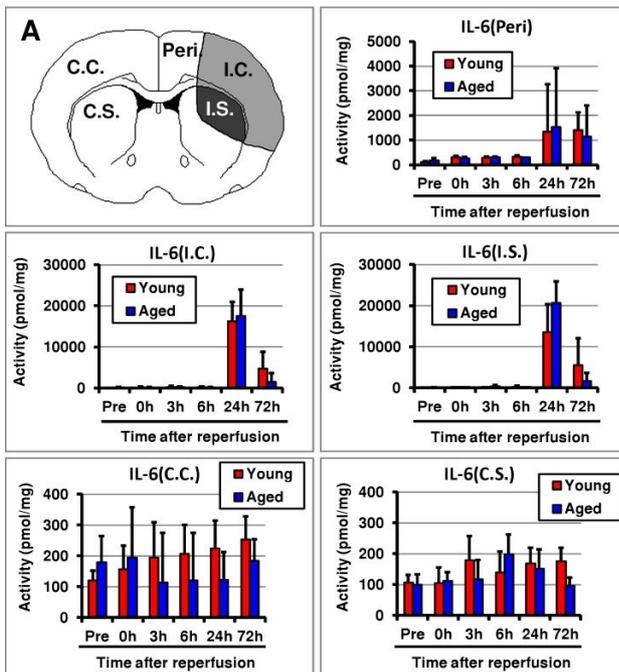
(3) 脳内サイトカインの虚血後の経時的変化

脳虚血前に骨髄単核球移植を行った場合、幼若骨髄単核球移植群で有意に脳虚血傷害の改善を認めた。そこで、その作用機構を解明するため、特に脳虚血と密接に関連することが知られている、炎症性サイトカイン(IL-6とTNF- α)の脳内変化を測定した。具体的には、幼若骨髄単核球(young)と老齡骨髄単核球(aged)を尾静脈より、注入後1ヶ月目に60分間の脳虚血負荷を与えた後、虚血前、再灌流直後、3、6、24、72時間後に脳の各部位で各種サイトカイン(IL-6とTNF- α)を経時的に測定した(各群n=5)。

(3-1) IL-6の虚血後の経時的変化

図3に示す様に、脳虚血前で幼若骨髄単核球治療群(young群)と老齡骨髄単核球治療群(aged群)で有意な差を認めなかった。更に、脳虚血後も両群で明らかな差を認めなかった。

図3: IL-6の虚血後の経時的変化

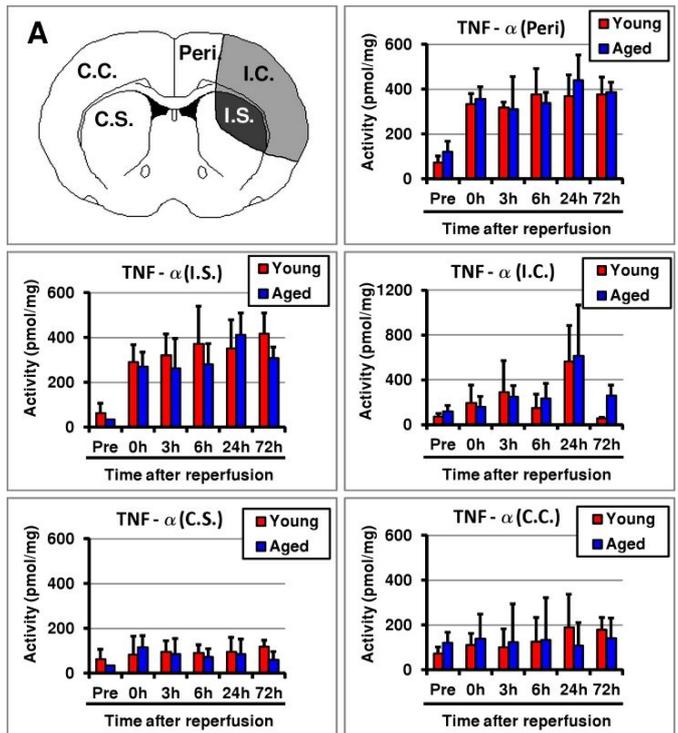


IC: 虚血側大脳皮質、IS: 虚血側線条体、peri: 傍虚血領域の正常大脳皮質、CC: 反対側正常大脳皮質、CS: 反対側正常線条体
Pre: 脳虚血前、0h: 1時間の脳虚血後、再灌流開始前、3h: 再灌流後3時間目、6h: 再灌流後3時間目、24h: 再灌流後24時間目、72h: 再灌流後72時間目。

(3-2) TNF- α の虚血後の経時的変化

図4に示す様に、脳虚血前で幼若骨髄単核球治療群(young)と老齡骨髄単核球治療群(aged)で有意な差を認めなかった。更に、脳虚血後も両群で明らかな差を認めなかった。

図4: TNF- α の虚血後の経時的変化



IC: 虚血側大脳皮質、IS: 虚血側線条体、peri: 傍虚血領域の正常大脳皮質、CC: 反対側正常大脳皮質、CS: 反対側正常線条体
Pre: 脳虚血前、0h: 1時間の脳虚血後、再灌流開始前、3h: 再灌流後3時間目、6h: 再灌流後3時間目、24h: 再灌流後24時間目、72h: 再灌流後72時間目。

(4) CD34陽性細胞を除外した、幼若(young)及び老齡(aged)骨髄単核球移植(脳虚血前)による脳梗塞量変化

The BDTM Mouse Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Isolation Kitを用いて骨髄単核球よりCD34陽性細胞をFACSria III sorterにて除外した。そしてCD34陽性細胞を除外した、幼若(young)及び老齡(aged)骨髄単核球を脳虚血1ヶ月前に尾静脈より注入した。その結果、幼若骨髄単核球移植群で有意に脳虚血傷害の改善を認めた(data not shown)。

(5) 結語

脳虚血後に幼若及び老齡骨髓単核球を移植しても、虚血脳保護効果を認めなかった。この結果は、脳虚血後に骨髓単核球を用いた再生治療を施行しても、少なくとも脳虚血急性期では保護効果はないことが明らかとなった。

虚血1ヶ月前に骨髓単核球を移植した場合には幼若骨髓単核球移植群で有意に改善効果を認めた。また虚血後の脳の各部位での炎症性サイトカインを測定した所、幼若骨髓単核球移植群と老齡骨髓単核移植群で差を認めなかった。従って、幼若骨髓単核球移植群で認められた脳虚血保護効果は炎症の抑制によるものではないことが明らかとなった。

次いでFACS sorterを用いて、CD34陽性細胞を除外した骨髓単核球を移植してもやはり幼若骨髓単核球移植群で有意に改善効果を認めた。このことは、幼若骨髓単核球の持つ虚血脳保護効果はCD34陽性細胞以外の幹細胞による可能性が考えられた。またsort時にはCD34が陽性でなくても成熟に伴いCD34陽性となる未熟な幹細胞を除外できていない可能性も示唆された。

以上の結果は脳血管障害に対して骨髓幹細胞を用いた再生療法の可能性を調べるうえで、重要な基礎データとなると考えられた。

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17件)

(1) Takagi T, Yoshida T, Okada M, Hata R, Hato N, Gyo K and Hakuba N.: Intravenous administration of bone marrow mononuclear cells alleviates hearing loss after transient cochlear ischemia through paracrine effects. Neuroreport. 査読有, May 16, (2014) [Epub ahead of print].

(2) Sugimoto K, Nishioka R, Ikeda A, Mise A, Takahashi H, Yano H, Kumon Y, Ohnishi T and Tanaka J.: Activated microglia in a rat stroke model express NG2 proteoglycan in peri-infarct tissue through the involvement of TGF- β 1. Glia.

査読有, 62: 185-98; (2014).

(3) Sumiyoshi M, Sakanaka M, Taniguchi M, Baba K and Kimura Y.: Anti-tumor effects of various furocoumarins isolated from the roots, seeds and fruits of Angelica and Cnidium species under ultraviolet A irradiation. J Nat Med. 査読有, 68: 83-94, (2014).

(4) Tei N, Tanaka J, Sugimoto K, Nishihara T, Nishioka R, Takahashi H, Yano H, Matsumoto S, Ohue S, Watanabe H, Kumon Y and Ohnishi T.: Expression of MCP-1 and fractalkine on endothelial cells and astrocytes may contribute to the invasion and migration of brain macrophages in ischemic rat brain lesions. J Neurosci Res. 査読有, 91: 681-93, (2013).

(5) Kimura Y, Sumiyoshi M, Sakanaka M, Taniguchi M and Baba K.: In vitro and in vivo antiproliferative effect of a combination of ultraviolet-A and alkoxy furocoumarins isolated from Umbelliferae medicinal plants, in melanoma cells. Photochem Photobiol. 査読有, 89: 1216-25, (2013).

(6) Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S and Inoue H: Modeling Alzheimer's Disease with iPSCs Reveals Stress Phenotypes Associated with Intracellular A β and Differential Drug Responsiveness. Cell Stem Cell. 査読有, 12:487-96, (2013).

(7) Kimura Y, Sumiyoshi M and Sakanaka M.: Effects of ginsenoside Rb₁ on skin changes. J Biomed Biotechnol. 査読有, 2012: 946242,

review, (2012).

(8) Ohue S, Kohno S, Inoue A, Yamashita D, Harada H, Kumon Y, Kikuchi K, Miki H and Ohnishi T: Accuracy of diffusion tensor magnetic resonance imaging-based tractography for surgery of gliomas near the pyramidal tract: a significant correlation between subcortical electrical stimulation and postoperative tractography. Neurosurgery. 査読有, 70: 283-93, (2012).

(9) Kobayashi K, Takahashi H, Inoue A, Harada H, Toshimori S, Kobayashi Y, Goto K, Sugimoto K, Yano H, Ohnishi T, and Tanaka J.: Oct-3/4 promotes migration and invasion of glioblastoma cells. J Cell Biochem. 査読有, 113: 508-17, (2012).

(10) Ohue S, Fukushima T, Kumon Y, Ohnishi T, and Friedman AH.: Preauricular transzygomatic anterior infratemporal fossa approach for tumors in or around infratemporal fossa lesions. Neurosurg Rev. 査読有, 35: 583-92, (2012).

(11) Taguchi S, Hamamoto Y, Fujii T, Ochi T, Harada H, Ohnishi T, and Mochizuki T.: Prognosis of primary central nervous system lymphoma treated with radiotherapy alone. Jpn J Radiol. 査読有, 30: 806-10, (2012).

(12) Ohue S, Kohno S, Matsui S, Kumon Y, and Ohnishi T: Inflammatory pseudotumor in the lateral ventricle. Case report. Neurol Med Chir 査読有, 52: 599-602, (2012).

(13) Kumon Y, Kohno S, Ohue S, Watanabe H, Inoue A, Iwata S and Ohnishi T: Usefulness of endoscope-assisted microsurgery for removal of vestibular schwannomas. J Neurol Surg B Skull Base. 査読有, 73: 42-7, (2012).

(14) Zhu P, Hata R, Ogasawara M, Cao F, Kameda K, Yamauchi K, Schinkel AH, Maeyama K and Sakanaka M: Targeted disruption of organic cation transporter 3 (Oct3) ameliorates ischemic brain damage through modulating histamine and regulatory T cells. J Cereb Blood

Flow Metab. 査読有, 32: 1897-908, (2012).

(15) Nishihara T, Ochi M, Sugimoto K, Takahashi H, Yano H, Kumon Y, Ohnishi T and Tanaka J.: Subcutaneous injection containing IL-3 and GM-CSF ameliorates stab wound-induced brain injury in rats. Exp Neurol. 査読有, 229: 507-16 (2011).

(16) Sonobe N, Hata R, Ishikawa T, Sonobe T, Matsumoto T, Toyota Y, Mori T, Fukunaga R, Komori K, Ueno S, Tanimukai S and Ikeda M: Risk of progression from mild memory impairment to clinically diagnosable Alzheimer disease in a Japanese community (from the Nakayama Study). Int Psychogeriatr. 査読有, 23: 772-779, (2011).

(17) Taguchi A, Zhu P, Cao F, Kikuchi-Taura A, Kasahara Y, Stern DM, Soma T, Matsuyama T and Hata R: Reduced ischemic brain injury by partial rejuvenation of bone marrow cells in aged rats. J Cereb Blood Flow Metab. 査読有, 31: 855-67, (2011).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

秦 龍二 (Hata Ryuji)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号 : 90258153

(2)研究分担者

大西 丘倫 (Ohnishi Takanori)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 70233210

久門 良明 (Kumon Yoshiaki)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号 : 80127894

阪中 雅広 (Sakanaka Masahiro)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 60170601