

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659384

研究課題名(和文) 幹細胞を中心とした細胞供給システムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of cell supply system focusing on stem cells

研究代表者

鈴木 秀一郎 (suzuki, syuuichirou)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90532929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患の一因は幹細胞供給システムの低下にあると仮説を立てヒト末梢血由来骨髄間葉系幹細胞(hPB-MSCs)の多分化能の評価を試みた。しかし質的量的に安定したhPB-MSCsが得られず検討中である。またMSCsの治療有効性をヒト骨髄由来MSCs(hBM-MSCs)と6-OHDA誘導パーキンソン病(PD)ラットで評価した。MSCs静脈内投与より薬物誘発回転運動が抑制され免疫組織学的解析にて中脳黒質、線条体共に6-OHDA誘導ドーパミン神経細胞死を改善し、更に線条体グリア活性抑制効果が認められた。hBM-MSCs静脈内投与がPDの病変形成を抑制する新規治療法としての可能性があることが示された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the multi-differentiation potential of mesenchymal stem cells from human peripheral blood (hPB-MSCs) to validate a hypothesis that the deteriorated supply system of innate stem cells induces neurodegenerative disease. Though the hypothesis was not completely endorsed, we continue to identify the optimal protocol of hPB-MSCs production. The therapeutic potential of MSCs from human bone marrow (hBM-MSCs) was evaluated in 6-OHDA induced Parkinson's disease(PD) model rats. Intravenous administration of hBM-MSCs inhibited drug-stimulated rotational behavior. Rats injected with hBM-MSCs displayed significant preservation of dopaminergic fibers in the striatum and dopaminergic neurons in the substantia nigra compared to those of control rats. The glial activity in the striatum was markedly inhibited by intravenous administration of hBM-MSCs. These findings raise the possibility that hBM-MSCs could be a novel therapeutic option to prevent PD development.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：幹細胞 老年医学 パーキンソン病 6-OHDA 骨髄間葉系幹細胞 ドーパミン神経 ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

成熟脳において、全脳の神経細胞は、脳内の内因性神経幹細胞から、常に神経細胞の供給を受けていることが示唆されている。まさに、髪の毛や爪などで見られる新陳代謝、すなわち、細胞の供給を受けると同時に一部は脱落していくという“cell replacement”が、中枢神経系でも起こっている可能性が高い。

一方、骨髄幹細胞は脳神経や肝臓など、胚葉を超えた多分化能を有している事が明らかとなっているばかりか、全身の臓器に細胞を供給していることが強く示唆されている。例えば、骨髄移植をした患者の死後脳から、ドナー由来細胞が患者脳内で神経細胞へ分化していたとする (É Mezey et al., PNAS 2003, CR Cogle et al., lancet 2004) 報告は有名である。さらに、動物実験では、骨髄幹細胞の投与によってレシピエント側の神経幹細胞が反応性に増加した (Mahmood A et al., Neurosurgery 2004)、など骨髄幹細胞が内因性の神経幹細胞に影響した可能性を示すデータもある。

このように、通常、我々の脳内では、神経幹細胞が全脳の神経細胞を常時供給することで、恒常性を維持しており、骨髄幹細胞も、その一役を担っている可能性が高い。そして、これらの幹細胞供給システムの低下が慢性に進行する神経変性疾患の原因となっている可能性がある。しかしながら、この仮説に基づいた科学的検討は皆無である。

2. 研究の目的

「神経変性疾患の一因は幹細胞供給システムの低下にある」と仮説を立て、本計画では特に、骨髄幹細胞に注目して、神経変性疾患の病因を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 患者および健常者の末梢血から骨髄幹細胞を分離・培養し、得られた骨髄幹細胞や、骨髄幹細胞からさらに分化誘導した神経幹細胞について、遺伝子発現解析、FACS、プロテオーム解析を行い比較検討し、疾患原因の探求を行う。

(2) 骨髄幹細胞を神経変性疾患モデル動物へ静脈内投与し、治療効果を上記の観点から評価する。今回は特にパーキンソン病ラットに対し、以下の検討を行った。

①神経系細胞への分化能、遊走能およびケモカインや神経栄養因子分泌能を有する骨髄間葉系幹細胞を投与細胞として用いた。骨髄間葉系幹細胞は線維芽細胞様の紡錘形の接着細胞であり、血清培地、プラスチック培養皿を用い 37°C、5% CO₂ インキュベーター内で特性を維持した状態で培養可能である。以前よりマウスおよびラット骨髄間葉系幹細胞の分離・培養方法は確立しているが (Kim et al., Brain Res 2006)、今回の研究では臨床応用を念頭にヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hBM-MSCs) を選択した。表面マーカープロフ

ファイルが検証済の hBM-MSC を購入し上記条件下にて培養した。細胞投与に用いる細胞の継代数は 6 回までとした。

②パーキンソン病ラット作製、細胞投与

9 週齢 200-240g の Sprague-Dawley 雌性ラットをケタミン、キシラジン深麻酔下で脳定位装置に固定した。0.02%アスコルビン酸を含む滅菌生理食塩水を溶媒に用い、6-hydroxydopamine (6-OHDA) 40 nmol をそれぞれ左線条体背内側、腹外側にマイクロシリンジを用いて微量投与した。投与部位はブレグマを起点として前方 0.5 mm, 左側方 2.5 mm, 腹側 5.0 mm 及び後方 0.5 mm, 左側方 4.2 mm, 腹側 5.0 mm とし、incisor bar を 3 mm 腹側に設定した。各溶液量は 5 μL とし 5 分間かけて投与を行い、投与後 5 分間針を静置し、その後ゆっくりシリンジを引き上げた。薬物投与後 14 日目にメタンフェタミン誘発旋回運動を 120 分間測定し 1 分間あたりの回転数が 6 回転以上 20 回転未満のラットをパーキンソン病ラット (PD ラット) として本研究の対象とした。PD ラットを 2 群に分け、1 群を細胞投与群として左大腿静脈より 1 個体あたり hBM-MSCs 1×10⁷ 個、PBS 0.5 ml に希釈し投与した。非細胞投与群には溶媒として用いた PBS のみを投与した。

③細胞投与群、非細胞投与群の行動学的、免疫組織学的比較解析・評価

細胞投与後 1 週間おきにメタンフェタミン誘発旋回運動を測定し行動学的評価を行い、4 週間の観察の後、PBS、4%パラホルムアルデヒドでラットを灌流固定した。ラット脳を摘出し 4%パラホルムアルデヒドで後固定後、10%、20%スクロースに浸漬した。その後、ラット脳を急速凍結しクリオスタットを用いて薄切切片を得た。抗 tyrosine hydroxylase (TH) 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、線条体、中脳黒質切片におけるドーパミン産生神経細胞の染色性を免疫組織学的に比較した。また、抗 ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) 抗体を用いて同様に染色を行い、6-OHDA 投与部位である背内側線条体切片におけるミクログリア活性を群間比較した。更に組織切片を同一条件で撮像した顕微鏡画像を用いて半定量的比較解析を行った。線条体 TH 染色半定量比較解析はブレグマを基点として 0.3 mm 前方、0.6 mm 後方、1.6 mm 後方の切片を用い病側の線条体の光学濃度を対側の大脳皮質との比から算出した。中脳黒質 TH 陽性細胞半定量比較解析はステレオロジーに基づき 240 μm 間隔、計 6 枚の中脳黒質切片を使用し Stereo Investigator を用いて解析を行った。ミクログリア活性の半定量化は 6-OHDA 投与背内側線条体切片のミクログリア集積領域 4x1.5 mm² を関心領域とし一定の閾値のもと 2 値化し面積を算出した。統計処理は Student の t 検定を行い、有意水準 5% 未満を有意差ありと

した。

4. 研究成果

神経変性疾患患者及び正常対象者の末梢血から間葉系幹細胞(hPB-MSCs)を得、これら3疾患を含んだ神経変性疾患以外の患者群のhPB-MSCsと比較を行うため、臨床研究審査委員会、倫理委員会から承認を得た。しかし、hPB-MSCsの分離方法、培養液の組成などを検討したが質的量的に安定したhPB-MSCsが得られなかった。他報告ではhPB-MSCsの分離・培養が可能とされており(Kim et al., PLoS One 2012), 引き続き検討を重ねている。

(1)メタンフェタミン誘発旋回運動解析細胞投与1週目より細胞投与群では非細胞投与群に比し有意にメタンフェタミンによる異常旋回運動の低下がみられた。この抑制効果は細胞投与4週目まで維持された。

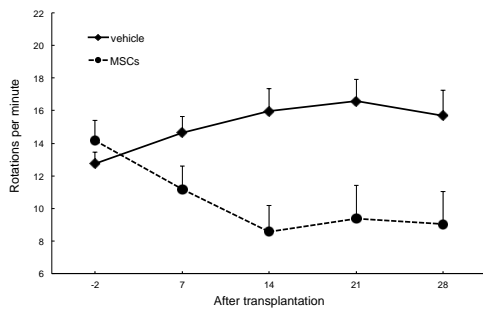


図1 6-OHDA線条体投与後hBM-MSCs細胞投与、非細胞投与ラット群のメタンフェタミン旋回運動における経時変化、平均値+標準誤差(SE), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

(2)線条体TH免疫染色比較解析

非細胞投与群では細胞投与群と比較し、線条体においてびまん性にTH染色の低下が認められた。細胞投与群では6-OHDA投与中心部での染色低下は認められたものの、その周辺において染色性が維持されていた。光学濃度比による比較解析においても細胞投与群では非細胞投与群に比べ有意に染色性が維持されていた

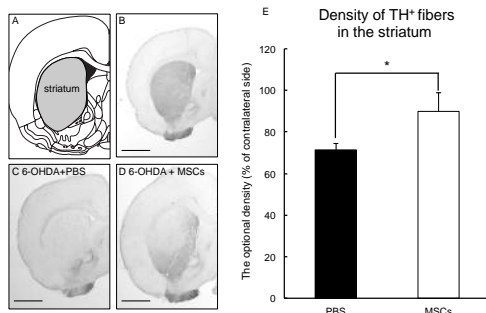


図2 各群ラットにおける線条体TH免疫組織化学染色像、半定量比較解析

A:ラット線条体略図, B:未処理ラット線条体, C:非治療群, D:治療群, E:両群ラットにおける線条体TH光学濃度半定量解析

Scale bar 2 mm, 平均値+標準誤差, * $P < 0.05$.

(3)中脳黒質TH免疫染色比較解析

非細胞投与群では細胞投与群と比較し、中脳黒質緻密層においてTH陽性細胞の染色低下を認めた。ステレオインベスティゲータを用いた比較解析においても細胞投与群では非細胞投与群に比べ有意に染色細胞数が維持されていた。

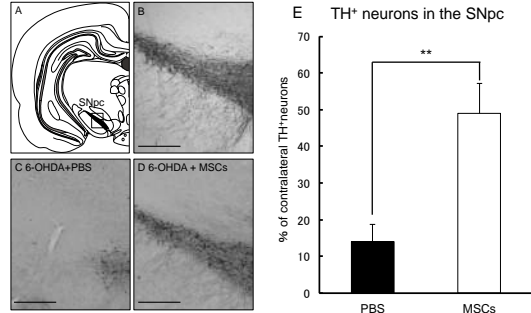


図3 各群ラットにおける中脳黒質TH免疫組織化学染色像、半定量比較解析

A:ラット中脳略図, B:未処理ラット中脳黒質, C:非治療群, D:治療群, E:両群ラットにおける中脳黒質TH免疫細胞数半定量解析

Scale bar 200 μ m, 平均値+標準誤差, ** $P < 0.01$

(4)背内側線条体Iba1染色比較解析

非細胞投与群でミクログリアは細胞体の肥大化、突起の退縮を認め、活性型を示した。しかし細胞投与群では、ミクログリア突起を枝状に伸長させた、細胞体の小さい静止型を観察した。Iba1染色面積を比較したところ細胞投与群において有意な面積の低下があることが確認された。

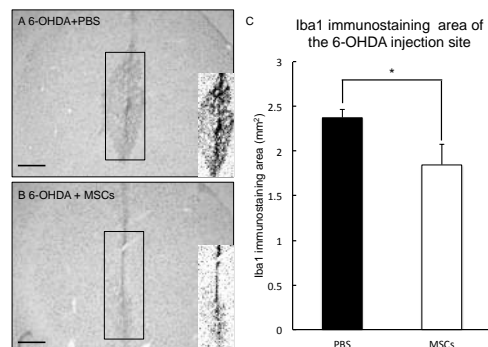


図4 各群ラットにおける線条体Iba1免疫組織化学染色像、定量比較解析

A:非細胞投与群, B:細胞投与群, C:各群ラットにおける線条体Iba1面積

Scale bar 1 mm, 平均値+標準誤差, * $P < 0.05$

まとめ

本研究により、hBM-MSCs が 6-OHDA 線条体導入 PD ラットに対し、メタンフェタミン誘発異常旋回運動を抑制し、TH 免疫組織学的染色において 6-OHDA 誘導ドーパミン神経細胞死を有意に抑制していることが確認された。また、Iba1 を用いたグリア活性比較解析において hBM-MSCs はグリア活性抑制効果が認められた。以上より、hBM-MSCs はパーキンソン病の進行性の神経変性に対して神経保護作用を示す可能性があることが示唆された。

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 1 件)

Suzuki S, Kawamata J, Matsushita T, Matsumura A, Hisahara S, Takata K, Kitamura Y, Kem W, Shimohama S. 3-[(2,4-Dimethoxy)benzylidene]-anabaseine dihydrochloride protects against 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian neurodegeneration through $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor stimulation in rats. J Neurosci Res. 91:462-71 (2013) (査読あり) DOI: 10.1002/jnr.23160. Epub 2012 Dec 14.

[学会発表] (計 2 件)

①鈴木秀一郎, 鈴木紘美, 松村晃寛, 久原真, 川又純, 下濱俊, 高田和幸, 北村佳久, 谷口隆之
パーキンソン病モデルラットに対する選択的 $\alpha 7$ ニコチン性受容体作動薬による神経保護作用
第 54 回日本神経学会学術大会
2013 年 5 月 31 日
東京国際フォーラム

②鈴木秀一郎, 鈴木紘美, 松村晃寛, 松下隆司, 久原真, 川又純, 下濱俊, 高田和幸, 北村佳久, 谷口隆之
パーキンソン病モデルラットに対する選択的ニコチン受容体作動薬による中脳黒質領域の免疫組織学的解析
第 53 回日本神経学会学術大会
2012 年 5 月 25 日
東京国際フォーラム

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者
鈴木 秀一郎 (SUZUKI SYUUIICHIROU)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：90532929

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者 ()
なし