

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592138

研究課題名(和文)再生医療へ向けた組織別間葉系幹細胞の特性解析

研究課題名(英文)Characteristic analysis of mesenchymal stem cells for regenerative medicine

研究代表者

小野寺 理恵 (Rie, Onodera)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：60393328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、再生医療で用いられる幹細胞は、既存の治療法を凌駕する複数のメカニズムで治療効果を発揮することが分かってきている。その中でも特に、間葉系幹細胞(MSC)は、移植のドナー細胞として、多疾患への臨床応用が期待され注目されている。本研究では、ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞、ラットから採取した間葉系幹細胞の細胞生物学的性質を各種の分子細胞生物学的・生化学的・遺伝学的解析手法を用いて比較解析し、さらにラット骨髄由来間葉系幹細胞のin vivoでの治療効果を脳梗塞モデルを用いて解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Recent advance in regenerative medicine have demonstrated that greater therapeutic efficacy can be obtained by stem cell therapy via multiple mechanisms compared to the standard therapies for various diseases. Especially, it has been suggested that bone marrow stem cells may represent an alternative source of neural progenitor cells for organ regeneration. Among bone marrow stem cells, much attention has been paid to mesenchymal stem cells (MSCs, also referred to as bone marrow stromal cells) because of their plasticity for differentiation into classical mesenchymal lineages, such as neuronal lineages. In this study, cell biological analyses were performed with MSCs from human and rat bone marrow using several molecular, biochemical and genetics approaches. Therapeutic efficacy with rat MSCs in vivo was also examined with rat stroke model.

研究分野：再生医療

キーワード：骨髄間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療で用いられる幹細胞は、既存の治療法を凌駕する複数のメカニズムで治療効果を発揮することが分かってきている。その中でも特に、採取が比較的容易で、培養技術が確立している体性幹細胞である間葉系幹細胞（MSC）は、骨・筋・神経などに分化することから、多疾患への臨床応用が期待され注目されている。

我々は、成体の骨髄由来の間葉系幹細胞は、脳梗塞や脊髄損傷などの実験的神経疾患モデルにおいて運動機能の改善、梗塞巣の縮小や神経脱落症状などの治療効果を有することをこれまでに数多く報告してきた。その治療効果を呈するメカニズムとして、神経栄養・保護作用、軸索損傷の再生、脱髄軸索の再有髄化、免疫調節作用、血管新生作用が関与している可能性を提唱している。

さらに、これらの基礎研究における成果を受けて、2007よりヒト脳梗塞を対象とした臨床試験（脳梗塞12症例へ自己間葉系幹細胞の静脈内移植）を行い、良好な結果を得たことより、札幌医科大学では、医師主導試験（脳梗塞：Phase III、脊髄損傷：Phase II）を実施している。

一方、我々のこれまでの研究から、間葉系幹細胞は、採取時期や部位などにより細胞の性質が変化するという知見を得ており、この変化は、遺伝子発現レベルや細胞表面マーカーのみならず、細胞自体の様々な性質に影響を与えているため、再生医療における安全性や効果に多大に影響を及ぼす可能性がある。つまり、同じ間葉系幹細胞と呼ばれている細胞でも、上記の諸条件が異なれば、同一の細胞特性および再生治療効果を発揮しないと考えられる。

本研究から得られる知見により、実際の再生医療の臨床現場において、最適の間葉系幹細胞を選択し、最適の使用方法で治療を行うことが可能となることより、再生医療の適正な発展に多大に貢献すると考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

近年、再生医療の実用化に向けて、間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cells；以下MSC）を用いた研究が盛んに進められている。これらの研究では、骨髄、末梢血など由来の間葉系幹細胞が用いられているが、これまで、間葉系幹細胞という同一名称しかなく、同じ細胞と誤認される場合も少なくなかった。しかし、我々は、これまでの予備実験から、間葉系幹細胞は由来組織や採取時期などにより細胞の表現型や性質が異なるばかりか、産生する液性因子や移植治療効果も異なると考えている。

当該研究計画では、これまで同一の幹細胞群として扱われてきた間葉系幹細胞について、採取時期や部位など別に細胞の性質について詳細な検討を行うと同時に、再生治療における安全性と治療効果に与えている影響について解析することを目的とした。

さらに、間葉系幹細胞の生体における細胞特性および再生治療効果を評価するために、ラットから得られた間葉系幹細胞を脳梗塞動物モデルに対する移植実験を行った。

本研究から得られる知見は、再生医療の臨床現場において、最適の間葉系幹細胞を選択することが可能となると同時に、適正使用方法の確立にも寄与することから、再生医療の発展に多大に寄与すると考える。

3. 研究の方法

(1) ヒトおよびラットより、末梢血・骨髄細胞・培養骨髄細胞をサンプルとして、それらに含まれる幹細胞のプロファイルを細胞表面マーカーを用いて、フローサイトメーターで解析する方法の確立を試みた。

(2) 脳梗塞モデルラットに対して、ラット骨髄より採取・培養した間葉系幹細胞を移植し、安全性と治療効果を解析した。特に、トレッドミル試験などによる行動学的解析、MRI 解析を行った。観察終了時には、4%パラホルムアルデヒドによる cardiac perfusion を行い、脳脊髄組織を採集したのちに、免疫組織化学的解析を行った。また、一部のラット動物実験モデルは、分子生物学的解析、網羅的遺伝子発現解析を試みた。

4. 研究成果

本研究期間に、ヒト間葉系幹細胞およびラット間葉系幹細胞の細胞生物学的解析を *in vitro* および *in vivo* で行った。

(1) ヒトより採集した末梢血をサンプルとして、それらに含まれる間葉系幹細胞のプロファイルを種々の細胞表面マーカーを用いて、フローサイトメーターで解析した。

(2) ヒトより採集した骨髄をサンプルとして、それらに含まれる間葉系幹細胞のプロファイルを種々の細胞表面マーカーを用いて、フローサイトメーターで解析した。

(3) ヒトより採集し培養した間葉系幹細胞をサンプルとして、それらに含まれる幹細胞のプロファイルを種々の細胞表面マーカーを用いて、フローサイトメーターで解

析した。

(4) 成体ラット(8週令)より採集した末梢血をサンプルとして、それらに含まれる間葉系幹細胞のプロファイルを種々の細胞表面マーカーを用いて、フローサイトメーターで解析した。特に、CD90、CD73、CD45、CD106 をターゲットとして、詳細な解析を行った。

(5) 老齢(33週令)ラットより採集した末梢血をサンプルとして、それらに含まれる間葉系幹細胞のプロファイルを種々の細胞表面マーカーを用いて、フローサイトメーターで解析した。特に、CD90、CD73、CD45、CD106 をターゲットとして、詳細な解析を行った。

(6) 成体ラット(8週令)より採集した骨髄細胞をサンプルとして、それらに含まれる間葉系幹細胞のプロファイルを種々の細胞表面マーカーを用いて、フローサイトメーターで解析した。特に、CD90、CD73、CD45、CD106 をターゲットとして、詳細な解析を行った。

(7) 老齢(33週令)ラットより採集した骨髄細胞をサンプルとして、それらに含まれる間葉系幹細胞のプロファイルを種々の細胞表面マーカーを用いて、フローサイトメーターで解析した。特に、CD90、CD73、CD45、CD106 をターゲットとして、詳細な解析を行った。

(8) 成体ラット(8週令)より採集した培養骨髄細胞をサンプルとして、それらに含まれる間葉系幹細胞のプロファイルを種々の細胞表面マーカーを用いて、フローサイ

トメーターで解析した。特に、CD90、CD73、CD45、CD106 をターゲットとして、詳細な解析を行った。

(9) 老齡(33 週令)ラットより採集した培養骨髄細胞をサンプルとして、それらに含まれる間葉系幹細胞のプロファイルを種々の細胞表面マーカーを用いて、フローサイトメーターで解析した。特に、CD90、CD73、CD45、CD106 をターゲットとして、詳細な解析を行った。

(10) 実験的脳梗塞モデルに対して、間葉系幹細胞を経静脈的に投与して、安全性と治療効果を評価した。特に、骨髄間葉系幹細胞移植により運動・感覚機能が回復する過程における脳の可塑性の変化を、動物実験用 MRI 装置 (7T) による functional MRI (fMRI) を用いて研究した結果、骨髄間葉系幹細胞非移植群で検出された左前肢刺激による fMRI の賦活信号は右体性感覚野皮質内に限局していたのに対し、骨髄間葉系幹細胞移植群では fMRI 賦活信号パターンが右体性感覚野皮質内に限局していた群 (片側賦活化群) と両側皮質に信号が検出された群 (両側賦活化群) の 2 パターンに分かれることが判明した。運動機能の回復は、移植後次第に、両群ともに有意に回復していたが、両側賦活化群と片側賦活化群を比較すると、MRI T2 強調画像より算出した梗塞巣体積の経時的変化には有意差が無いにも関わらず、興味深いことに、健常側を含む両側の皮質に fMRI 信号が検出される群のトレッドミルを用いた運動機能の改善度は、病側皮質に fMRI 信号が検出される群、およ

び非移植群よりも高い傾向にあった。

このメカニズムは、ラット脳梗塞モデルに対して移植された骨髄間葉系幹細胞が、間葉系幹細胞の有する特異的な細胞特性による治療効果により、脳の可塑性が変化することによって、脳梁を介する皮質-皮質間、皮質-線条体間、皮質-視床間、皮質-脊髄間の軸索が構築する神経回路の rewiring の増加が生じた結果、神経機能の回復に寄与した可能性があると考えられた。

以上のように、補助金は有効に使用された。

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 J, Sasaki M, Harada K, Bando M, Kataoka Y, Onodera R, Mikami , Wanibuchi M, Mikuni N, Kocsis JD, Honmou O., Bilateral Cortical Hyperactivity Ditected by fMRI Associates with Improved Motor Function Following Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells in a Rat Stroke Model. Brain Reserach 1497. 15-22 (2013) 査読有
doi: 10.1016/j.brainres.2012.12.028. Epub 2012 Dec 27.

[学会発表] (計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野寺 理恵 (Rie Onodera)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：60393328

(2) 研究分担者

本望 修 (Osamu Honmou)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：90285007

鰐淵 昌彦 (Masahiko Wanibuchi)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30343388

佐々木 祐典 (Masanori Sasaki)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：20538136

三上 毅 (Takeshi Mikami)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：30372816

小林 正樹 (Masaki Kobayashi)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：70592715

中崎 公仁 (Masahito Nakazaki)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：70722461

坂井 拓郎 (Takurou Sakai)
札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80639229

佐々木 雄一 (Yuichi Sasaki)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：00570136

鈴木 淳平 (Junpei Suzuki)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：00572596

森田 智慶 (Tomonori Morita)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：60723343

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：