

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650313

研究課題名(和文)新規間葉系幹細胞を移植する機能回復を目指した骨格筋再生治療への挑戦

研究課題名(英文)Challenge to the regeneration therapy of skeletal muscles accompanied with functional recovery by transplantation of novel mesenchymal stem cells.

研究代表者

鳥橋 茂子(Torihashi, Shigeko)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90112961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は未分化なマウスES細胞を脂肪細胞へと分化誘導する過程で、新規間葉系幹細胞(MSCs)を大量に作成し、収集する技術を確立した。このMSCsの高い骨格筋分化能を利用して、筋の運動機能回復を目指した損傷骨格筋への移植法の確立と筋の再生機構解明を目的に研究を行った。その結果、(1)マウスの前頸骨筋を挫滅損傷させるモデルを作成し、損傷24時間後に直接MSCsを患部移植することで効果的な筋再生を実現できた。(2)移植MSCsは骨格筋や血管に分化すると共に、支配神経の再生を促進し、結果的に筋組織の再生を促進した。(3)MSCsの移植により、前頸骨筋の機能回復が促進され、1週間早く治癒した。

研究成果の概要(英文)：I succeeded to generate and sort novel mesenchymal stem cells (MSCs) from mouse ES cells. The MSCs showed high differentiation potential to skeletal muscle cells, therefore I aimed to develop useful transplantation technique for the regeneration of muscle tissues with functional recovery by MSCs. I also wished to study regeneration mechanism of the skeletal muscle tissue. The results of the investigation are as follows: (1) Tibialis anterior muscles were crushed and used as injured muscle models. Direct transplantation of MSCs into the injured muscle after 24 hours of crush showed effective regeneration. (2) MSCs differentiated into either skeletal muscle cells or blood vessels and induced peripheral nerve fibers extension to accelerate the recovery. (3) Transplantation of MSCs accelerated the functional recovery of the muscle more than 1 week.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：間葉系幹細胞 ES細胞 再生 骨格筋 筋機能の測定 移植

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の申請者はマウス未分化 ES 細胞から脂肪細胞を分化誘導する過程で、CD105 を発現する間葉系幹細胞 (MACs) を作成する方法を確立した。その MSCs の特性を解析したところ、報告されていた他の組織由来 MSCs に比べて骨格筋への分能が高いことがわかった。

(2) 骨格筋は再生能の高い組織であるが、事故等による筋損傷において、線維化を防ぎながら効率よく筋を再生させることは難しい。また運動が阻害されると、萎縮し廃用筋として機能が著しく低下することや、筋ジストロフィーのように治療や回復の難しい疾患も多く存在し、これらに対する移植再生技術の進歩が強く望まれていた。しかし、多くの組織由来 MSCs は骨格筋への分化能は低いいため、移植により機能を回復したという報告は少ない。また、正確に再生筋の筋機能を測定した報告も見当たらなかった。

2. 研究の目的

(1) 申請者の作成した MSCs を用いて、効率の良い骨格筋への移植法を開発する。そのための筋損傷モデルマウスを作成し、具体的な移植法を検討する。

(2) 移植による筋の再生現象を組織学的あるいは生化学的に解析、定量化し、再生のメカニズムを追求する。

(3) 骨格筋の組織再生が筋の機能を改善するか否かについて、これまで手をつけられていなかった理学療法的立場から正確に検定、評価する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物として、免疫不全 (SCID) マウスを使用した。細胞は EGFP でラベルされたマウス ES 細胞 (理研 CDB 提供) を使用し、これを脂肪細胞へ分化する過程で CD105 を指標として磁気ビーズ法 (MACS 法) で採集した。他の ES 細胞 (信州大学提供) および、iPS 細胞 (京都大学提供) でも移植実験の再現性を確認した。

(2) 移植後、継時的に組織を採取し、凍結超薄切片を作成してヘマトキシリンエオジン染色 (H-E 染色) により損傷面積、移植細胞

による再生面積を計測した。移植部位でどのように筋組織が再生するかについて、免疫 (蛍光) 組織化学により染色し、これも面積や細胞数を定量化した。筋線維のほかこれを支配する神経や血管についても再生を検証した。

(3) 損傷筋の機能回復過程を、マウスの自然歩行の解析により詳細に検討した。CatWalk (Noldus 社) を使用し、マウスの歩行をビデオにより記録、フットプリントと歩幅 (ゲイト) の計測から筋機能を解析した (図 1)。

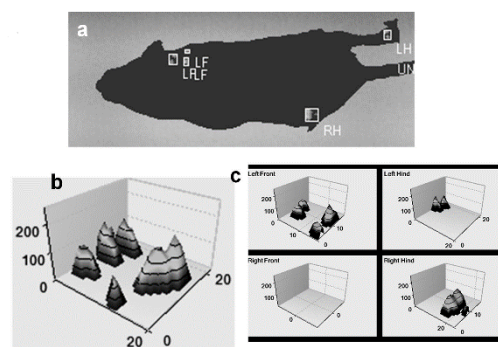


図 1. CatWalk による解析例

4. 研究成果

(1) 移植結果の定量化をめざした骨格筋損傷モデルマウスの作成

再現性を考慮して、皮膚に近く、損傷、移植を行いやすい筋を選択した。また損傷が生命維持に作用しないこと、歩行解析により詳細に分析が可能であること、損傷の程度を一定にすることなどを考慮して、マウス後肢の前頸骨筋を鉗子により一定時間一定圧力で挟み込むことで控減損傷させる筋の損傷モデルを作成した。本損傷モデルは再現性が高く、損傷後の移植において損傷部位を目視により確認できた。このモデルでは、損傷筋は約 5 週間で自然に再生し、機能も回復した。しかし、MSCs を移植することで組織の再生と機能回復が促進された。

(2) 移植法の検討

移植法は大きく 2 通りある。すなわち、直接 MSCs を損傷部位に注入する方法と尾静脈へ注入し、血管を介して移植する方法である。両者を検討した結果、尾静脈に MSCs を注入するには直接筋へ移植する場合に比べて約 10 倍の数の MSCs が必要であることが

わかった。また直接患部へ移植の方が安定した結果を得た。そこで、移植の方法は挫滅損傷させた前頸骨筋への直接注入法とした。1回の移植には 1×10^5 個の MSCs を用いた。さらに移植に最適な時期（損傷後の時間）を検討した。その結果、下図のように移植後1週間で比較したところ、損傷24時間後に移植することで細胞の生着率が一番高くなった。従って、実験ではすべて挫滅損傷後、24時間でMSCsを直接患部に移植した。

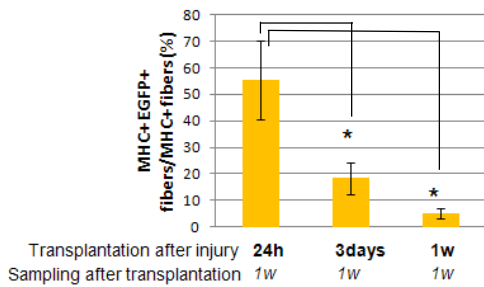


図2. 損傷後の移植時期の比較

(3) MSCs 移植後の組織変化

① 移植した MSCs は骨格筋細胞に分化した
MSCs は EGFP を発現しているため、移植先の細胞とは識別できる。そこで、筋幹細胞、筋芽細胞、筋細胞のそれぞれのマーカーである Pax7、カドヘリン、ミオシン重鎖 (MHC) と EGFP の二重染色を行い、移植細胞の骨格筋分化能を検証した。その結果下図のように EGFP とマーカーを共発現する細胞が時間と共に増加した。これにより MSCs が骨格筋へと分化したことが確認された。

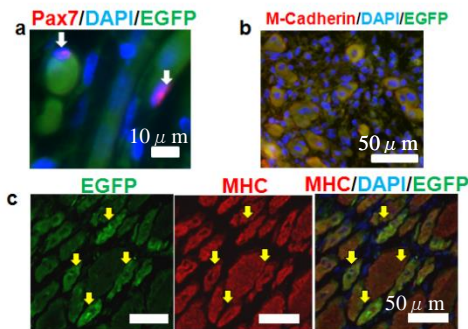


図3. MSCs の骨格筋分化

② MSCs の移植により、損傷骨格筋の組織学的な再生、治癒が促進した

モデルマウスに MSCs を移植した場合 (E-MSCs+) と移植を行わなかった場合 (E-MSCs-) で、損傷部位の再生筋の量を比較したところ、図4のように、移植したことで、損傷部における再生筋の横断面積 (太さ) が移植しない

場合と比べて優位に広く、移植後3-4週間でほぼ元の面積まで回復したことがわかった。

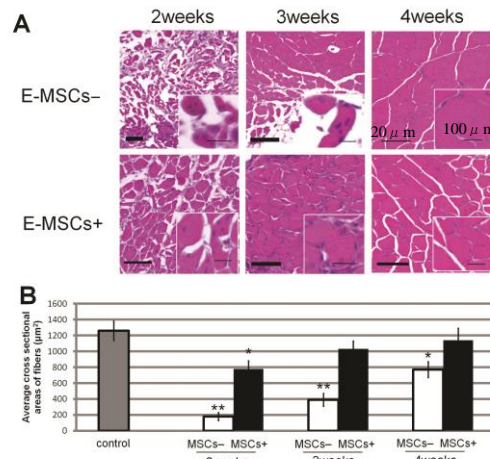


図4. MSCs 移植による筋再生の促進

③ 損傷筋を支配する末梢神経の再生も促進した

抹消神経線維を SMI31 (neuro-filaments)、運動終盤を α -bungarotoxin (α -BT) で染色し、損傷部位に分布する抹消神経線維数と運動終盤数を計測したところ、MSCs を移植した場合 (E-MSCs+) と移植を行わなかった場合 (E-MSCs-) では移植した例で有意にこれらの数が多く、下図のように末梢神経の回復が早められた。

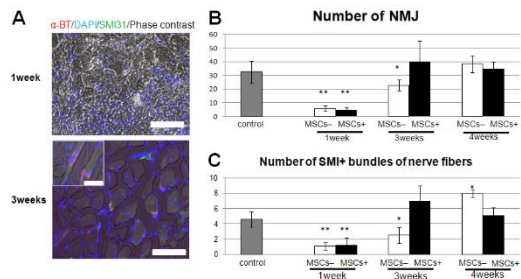


図5. 末梢神経の再生

おそらく、移植した MSCs から直接、あるいは骨格筋に分化しつつある MSCs から、末梢神経の再生 (伸張や運動終盤の形成) を促進する因子が分泌されるものと推察された。

また、MSCs は血管の内皮細胞やこれを取り巻く平滑筋にも分化することが確認された。以上の結果から、MSCs の移植が骨格筋細胞の再生のみならず、これを支配する神経や血管の再生を促進することで組織としての骨格筋の再生を誘導、促進したことがわかった。

(4) MSCs の移植により前頸骨筋の機能回復が促進した

骨格筋の組織学的再生が促進されたこと

で、筋の機能が実際に向上したか否かについて CatWalk の解析により検証した。その結果、下図のように、前頸骨筋の運動機能は移植しなかったマウスに比べて約 1 週間回復が早まったことが確認された。すなわち移植により機能回復が促進された。

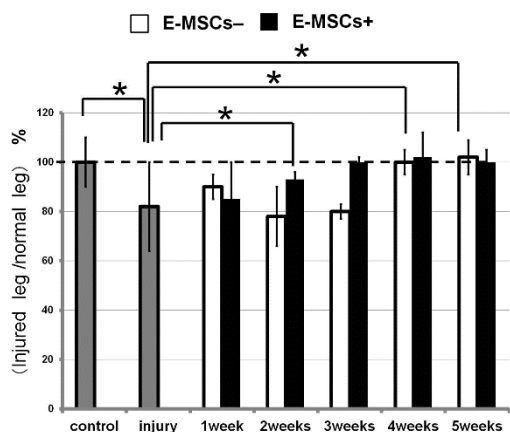


図 6. 損傷後の前頸骨筋の機能変化
このように移植により筋の機能回復が詳細に計測、報告されたのは初めてである。本モデルは自然治癒することがわかっているが、今後筋ジストロフィーなど、治癒が難しいケースでは MSCs の細胞移植が病態を改善することが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Nana Takenaka-Ninagawa, Eri Isobe, Yuri Hirayama, Rumi Murakami, Kasumi Komatsu, Masataka Nagai, Mami Kobayashi, Yuka Kawabata, Shigeko Torihashi
: Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Derived from ES Cells Promotes Muscle Regeneration and Accelerates Functional Recovery of Injured Skeletal Muscle BioResearch Open Access 査読あり、2 巻、4 号 2013 pp295-306 DOI: 10.1089/biores.2013.0012
- ② Nana Ninagawa, Rumi Murakami, Eri Isobe, Yusuke Tanaka, Hiroki Nakagawa, Shigeko Torihashi: Mesenchymal stem cells originating from ES cells show high telomerase activity and therapeutic benefits Differentiation 査読あり Vol.82, No.3, 2011 pp153-164 DOI: 10.1016/j.diff.2011.07.001.

[学会発表] (3 件)

- ① Nana Ninagawa, Eri Isobe, Yuri Hirayama, Mami Kobayashi, Yuka Kawabata, Shigeko

Torihashi: Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Derived from ES Cells Promotes Muscle Regeneration; Re-innervation and Thereby Accelerates Functional Recovery of Injured Skeletal Muscle, 10th ISSCR (国際幹細胞学会) 2012

- ② Nana Ninagawa, Mami Kobayashi, Eri Isobe, Yuri Hirayama, Yuka Kawabata, Shigeko Torihashi: Transplantation of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) from Mouse ES Cells Promote Skeletal Muscle Regeneration and Improve Functional Recovery, 第 34 回日本分子生物学会年会 2011
- ③ Nana Ninagawa, Eri Isobe, Rumi Murakami, Mami Kobayashi, Shigeko Torihashi : Transplantation of Mesenchymal Stem Cells from Mouse ES Cells after Muscle Injuries Promotes Skeletal Muscle Regeneration and Improves Functional Recovery, 9th ISSCR(国際幹細胞学会) 2011

[産業財産権]

○ 取得状況 (計 2 件)

- ① 名称：間葉系幹細胞およびその産生方法
発明者：鳥橋 茂子、蜷川 菜々
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特許第 5429755 号
取得年月日：平成 25 年 12 月 13 日
国内外の別：国内

- ② 名称：Mesenchymal stem cell and method for production thereof
発明者：鳥橋 茂子、蜷川 菜々
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：US.8,470,595B2
取得年月日：平成 25 年 6 月 25 日
国内外の別：国外 (米国)

[その他]

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~st-home/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥橋 茂子(TORIHASHI, Shigeko)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90112961