

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791925

研究課題名(和文) 外傷性脊髄損傷治療における脂肪組織の有用性

研究課題名(英文) Usability of Adipose Tissue in Spinal Cord Injury Treatment

研究代表者

太田 有紀(OHTA, Yuki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：60387066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：外傷性脊髄損傷モデルラットに対する脂肪組織由来幹細胞(ASCs)の経静脈的な移植による治療のメカニズムについて検討したところ、移植後早期に生存シグナルを活性化し、それは同時期に脊髄内で増加が認められた好中球走化性因子を介している可能性が示された。また、移植後の細胞動態は、損傷により影響を受け、より組織への移行性が高まる可能性が示唆された。

一方、臨床研究の需要ニーズに応じられるよう凍結脂肪組織からのASCsの単離・培養を試みたところ、少なくとも凍結後6ヶ月経過したラット脂肪組織からでもASCsが得られた。また、増殖能ならびに分化能は保持されており、研究利用も可能であること示された。

研究成果の概要(英文)：Adipose tissue has therapeutic potential for spinal cord injury (SCI) because it contains multipotent cells known as adipose-derived stem/stromal cells (ASCs). Intravenous transplantation of ASCs promotes the functional recovery in SCI rats. Interestingly, cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) showed a transient, but significant increase in the spinal cord tissue and blood of the ASC group. CINC-1 also promoted functional recovery in SCI rats. Glial cell line-derived neurotrophic factor expression was greater in the ASC group than in the CINC-1 group, although both promoted ERK1/2 phosphorylation. Our findings indicate that intravenously transplanted ASCs accumulated in the injured spinal cord, where cytokines such as CINC-1 activated ERK1/2 phosphorylation and induced the downstream production of growth factors, leading to cell regeneration, tissue repair, and functional recovery.

Besides, ASCs could be isolated from frozen tissue, those may be used for research.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脂肪組織 脊髄損傷 細胞治療

1. 研究開始当初の背景

有効な治療法がまだ確立されていない疾患に対して再生医療が注目されており、脊髄損傷もその一つである。これまで再生医療に用いる移植細胞の供給源として脂肪組織に着目し、外傷性脊髄損傷モデルラットへの脂肪組織由来幹細胞 adipose-derived stem/stromal cells (ASCs、図1)の移植を検討してきた。

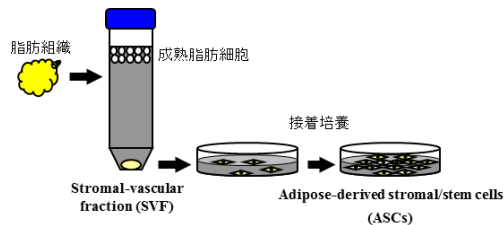


図1. 脂肪組織由来幹細胞 (ASCs)

ASCsの移植は、障害を受けた後肢の運動機能の回復を促進させる(図2)、すなわち、治療効果があること、また、好中球走化性因子 cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1)がASCsの移植数時間後に一過性に上昇し、ASCsの移植による治療メカニズムの一つとしてCINC-1が関与する可能性を見出した。

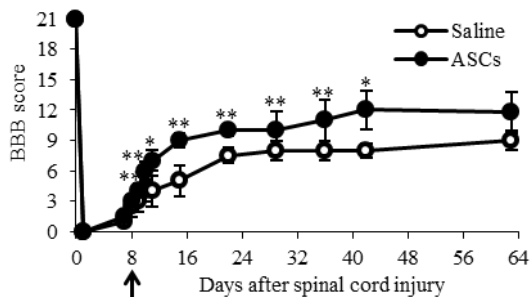


図2. 後肢運動機能に対するASCs移植の効果

そこで本研究では、CINC-1を中心とした作用機序の解明を試みた。

また、静脈内投与後、ASCsは損傷部位に集積し、役割を果たすことで運動機能回復に寄与すると考えられるが、健常動物における動態についてこれまで検討しておらず、損傷がASCsの細胞動態に与える影響を検討することとした。

一方、臨床研究のためにASCsの採取を目的としたヒト脂肪組織の需要は非常に高く、その注目度が伺えるが、新鮮組織の入手は容易ではない。そこで本研究では、凍結脂肪組織からASCsの単離・培養について検討することとした。

2. 研究の目的

本研究は、外傷性脊髄損傷モデルラットに対してCINC-1を静脈投与し、後肢運動機能

に対する効果、ならびに影響するシグナル経路を検討することによりASCs移植の治療メカニズムを明らかにすること、また、健常ラットにおける移植後の細胞動態を検討し、損傷がASCsの細胞動態に与える影響を明らかにすることを目的とした。

さらに、凍結脂肪組織からASCsの単離・培養を検討し、聖マリアンナ医科大学における組織バンク事業の拡大、ひいてはASCsを用いた臨床研究支援を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ラット脂肪組織からのASCsの単離と培養

麻酔下、7週齢Sprague-Dawley (SD)ラットの鼠径部より皮下脂肪組織を摘出した。脂肪組織は細切後、0.1%コラゲナーゼ溶液中で37°C、1時間の処理を行った。フィルトレーション後、遠心操作により成熟脂肪細胞とstromal-vascular fraction (SVF)とに分離した。分取したSVFを20% fetal bovine serum (FBS)を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)中で、37°C、飽湿、5% CO₂条件下、接着培養によりASCsを得た(図1)。ASCsは、20% FBS含有DMEMを用いて継代培養した。

(2) 外傷性脊髄損傷モデルの作製

麻酔下、雌性10週齢SDラット胸椎部(T10)位の脊髄に一定重量の負荷(25mmの高さから10gの錘を落下)を与え、後肢に運動機能障害を惹起した損傷モデルを作製した。

(3) 運動機能評価

Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) スコアを用いて、0(完全麻痺)から21(正常歩行)にスコアリングし、経時的に歩行機能を評価した。

(4) 細胞移植、CINC-1投与

損傷8日目に、麻酔下、生理食塩水に懸濁した2継代目のASCs(2.5×10⁶ cells)、CINC-1(1 μg)あるいは対照群として生理食塩水を stereotaxic microinjector を用いて損傷ラット尾静脈から投与した。

(5) 脊髄組織評価

ASCsの移植、あるいはCINC-1投与後、脊髄組織から蛋白質を抽出し、mitogen-activated protein kinase (MAPK)の一つである extracellular signal-regulated protein kinases (ERK) 1/2 およびそのリン酸化、glial fibrillary acidic protein (GFAP)、ならびに glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) を Western blot 法により検出した。

(6) 静脈投与後の細胞動態

[³H]-thymidine を培地に添加し、移植前24

時間取り込ませ、ラジオアイソトープ標識した ASCs ($[^3\text{H}]$ -ASCs) を健常ラット、あるいは損傷ラットに移植し、血液および各臓器の放射活性から各組織に到達した移植細胞の割合を算出した。

(7) 凍結脂肪組織からの ASCs の単離と培養

麻酔下、7 週齢 SD ラットの鼠径部より皮下脂肪組織を摘出した。重量測定後、凍結保存液中、脂肪組織をディープフリーザー (-80°C) で保存した。凍結脂肪組織からの ASCs の単離・培養 (1) を経時的に行い、細胞倍化時間を算出した。分化能は、インスリン、デキサメタゾン、イソプチルメチルキサンチンを用いて脂肪細胞へ誘導し、オイルレッド O 染色により評価した。培養上清中の液性因子 (肝細胞増殖因子: HGF、血管内皮細胞増殖因子: VEGF) は、キットを用いて測定した。

4. 研究成果

外傷性脊髄損傷モデルラットに対して CINC-1 (1 μg) を静脈投与し、障害を受けた後肢運動機能の回復効果を検討したところ、ASCs (2.5×10^6 cells) を移植した時 (図 2) と同様に、投与後早期に BBB スコアは増加を示し、対照群に比較して有意に後肢運動機能の改善を認めた (図 3)。

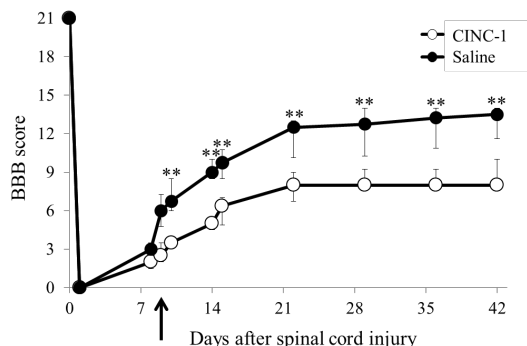


図 3. 後肢運動機能に対する CINC-1 投与の効果

運動機能の回復がみられた早期に着目し、ASCs の移植、あるいは CINC-1 の投与によって脊髄組織で活性化されるシグナル経路を検討した。その結果、ASCs の移植後、あるいは CINC-1 の投与後 3 および 24 時間後の脊髄において、ERK のリン酸化の亢進が認められた (図 4)。

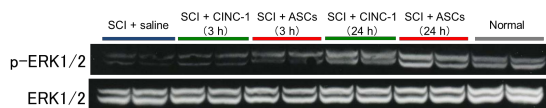


図 4. 脊髄組織における ERK の発現およびリン酸化の検出

運動機能評価後の脊髄では、ASCs 移植群および CINC-1 投与群ともに GFAP 発現の増加、また、ASCs 移植群においては GDNF 発現の増加が認められた (図 5)。

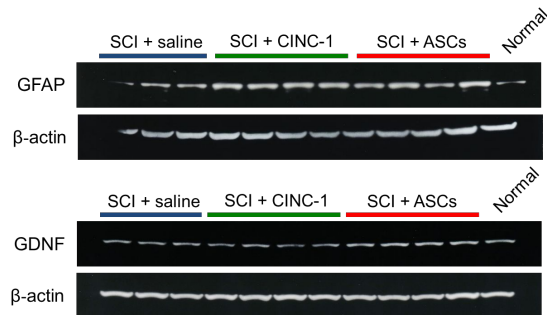


図 5. 脊髄組織における GFAP および GDNF の検出

従って、ASCs の移植は生存シグナルである MAPK を活性化させることが明らかになった。特に、その活性化には、従来炎症の指標とされる CINC-1 を介している可能性があり、興味深い知見が得られた。また、グリア細胞に対する作用を介して神経保護的に働く可能性も示唆され、ASCs の移植によって得られる治療効果は様々な作用を介していることが推察された。

健常あるいは脊髄損傷ラットに対して $[^3\text{H}]$ -ASCs を経静脈的に移植したところ、健常ラットへの移植に比較して、脊髄損傷ラットでは、脊髄も含め臓器への集積が高く、特に血管では約 5 倍と顕著であった (図 6)。

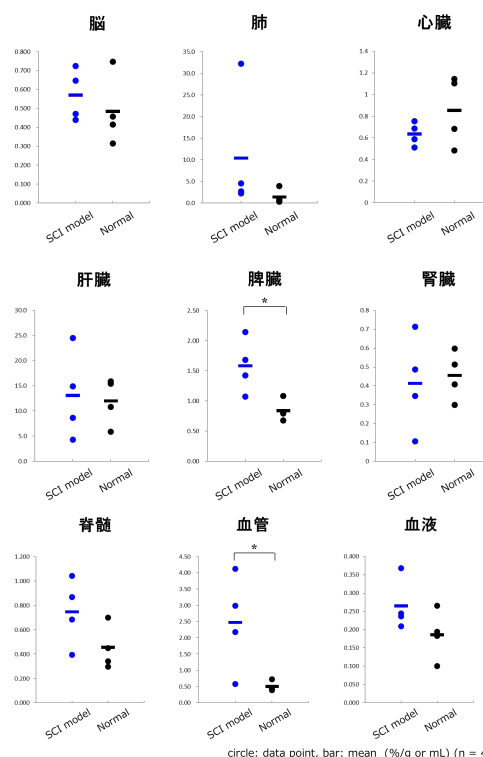


図 6. 静脈投与後の $[^3\text{H}]$ -ASCs の組織分布率

従って、損傷が存在することで組織への移行性が高まり、静脈内投与による ASCs の治療効果は、損傷脊髄のみならず、他組織、特に血管に対する作用も関与する可能性が示唆された。

一方、臨床研究の需要ニーズに応じられるよう、まずはラット凍結脂肪組織からの ASCs の単離・培養を検討した。凍結後半年以上経過した脂肪組織からでも ASCs の単離は可能であり、その増殖能は新鮮組織由来 ASCs と有意な差は認められなかった(図 7A)。また、脂肪細胞分化能および液性因子(HGF、VEGF)の産生について検討したところ、新鮮組織由来 ASCs と有意な差は認められなかった(図 7B、7C)。

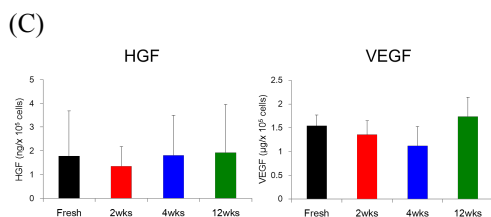
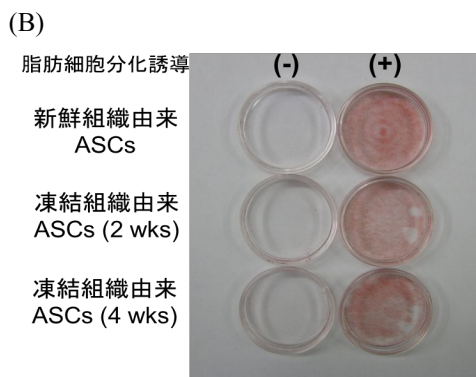
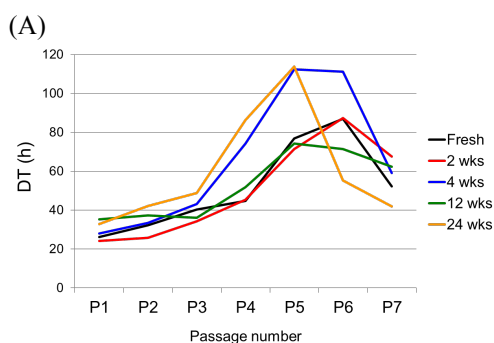


図 7. 新鮮組織 (Fresh) および凍結組織由来 ASCs の細胞倍化時間 (A) 脂肪細胞分化 (B) 液性因子産生 (C)

以上より、凍結脂肪組織からでも ASCs の単離・培養は可能であり、少なくとも凍結後 6 ヶ月経過したラット脂肪組織からでも ASCs が得られた。また、増殖能ならびに分化能は保持されており、研究利用も可能であること示された。今後、更に長期間凍結の検討、ならびにヒト脂肪組織での検討が必要であると考えられる。

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)

[学会発表](計 8 件)

発表者：太田 有紀

発表標題：外傷性脊髄損傷モデルラットに対する脂肪組織由来幹細胞移植とその細胞動態

学会名：第 14 回日本再生医療学会総会

発表年月日：2015 年 03 月 20 日

発表場所：パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

発表者：太田 有紀

発表標題：凍結脂肪組織からの組織幹細胞単離の試み-第 3 報-

学会名：第 35 回日本臨床薬理学会学術総会

発表年月日：2014 年 12 月 05 日

発表場所：ひめぎんホール (愛媛県・松山市)

発表者：太田 有紀

発表標題：外傷性脊髄損傷モデルラットに対する脂肪組織由来幹細胞移植の試み

学会名：第 35 回日本炎症・再生医学会

発表年月日：2014 年 07 月 02 日

発表場所：万国津梁館 (沖縄県・名護市)

発表者：太田 有紀

発表標題：脂肪組織由来幹細胞移植による外傷性脊髄損傷治療の試み

学会名：第 13 回日本再生医療学会総会

発表年月日：2014 年 03 月 04 日

発表場所：国立京都国際会館 (京都府・京都市)

発表者：太田 有紀

発表標題：凍結脂肪組織からの組織幹細胞単離の試み-第 2 報-

学会名：第 34 回日本臨床薬理学会学術総会

発表年月日：2013 年 12 月 04 日

発表場所：東京国際フォーラム (東京都・千代田区)

発表者：太田 有紀

発表標題：外傷性脊髄損傷モデルラットに対する脂肪組織由来幹細胞移植の効果

学会名：第 12 回日本再生医療学会総会

発表年月日：2013 年 03 月 21 日

発表場所：パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

発表者：太田 有紀

発表標題：凍結脂肪組織からの組織幹細胞単離の試み

学会名：第 33 回日本臨床薬理学会学術総会

会

発表年月日：2012年11月29日
発表場所：沖縄コンベンションセンター
(沖縄県・宜野湾市)

発表者：太田 有紀
発表標題：外傷性脊髄損傷モデルラットに
対する脂肪組織由来幹細胞移植の効果
学会名：第11回日本再生医療学会総会
発表年月日：2012年06月13日
発表場所：パシフィコ横浜(神奈川県・横
浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 有紀(OHTA, Yuki)
聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
研究者番号：60387066

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし