

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462226

研究課題名(和文) 骨髄幹細胞プロファイルの再構築と神経再生治療への応用

研究課題名(英文) Profile analysis of mesenchymal stem cell for cellular therapy

研究代表者

本望 修 (Honmou, Osamu)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：90285007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、再生医学の進歩によって、間葉系幹細胞(MSC)は、治療効果を有することが明らかになってきている。我々は、これまでにMSCをドナー細胞として、動物疾患モデルに対する移植実験を行い、良好な結果を得てきた。本研究では、ヒトおよびラット骨髄由来MSC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MSC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 progress in regenerative medicine for injured neural tissue have revealed that greater therapeutic efficacy can be achieved by stem cell therapy via multiple mechanisms for various disorders. Especially, it has been suggested that mesenchymal stem cells (MSCs) derived from bone marrow may represent a potential source for organ regeneration. 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 by rat MSCs in vivo was also examined with rat stroke model.

研究分野：再生医学

キーワード：間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

我々は、骨髄間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC) は末梢血中にも存在し、全身の多くの臓器の cell replacement に貢献していることを解明してきた。すなわち、MSC は生体の恒常性の維持に強く関与しており、言い換えれば、自然治癒力に深く貢献していると考えられる。さらに、MSC を抽出・培養・増幅して経静脈内に投与すると、各種神経疾患 (特に虚血性疾患や外傷性疾患など) に対して強い治療効果をもたらすことを報告してきた。

このように骨髄および末梢血中の MSC は、生体の恒常性維持や損傷治癒に大きな役割を果たしていることを明らかにしてきた。

一方、我々の予備実験の結果では、骨髄および末梢血中の MSC のプロファイルが加齢とともに質的にも量的にも変化することが示唆された。従って、MSC プロファイルの変化が、脳神経機能の低下に大きく影響している可能性があると考えられた。

これらのことを総合的に考察すると、身体の中に存在する内因性骨髄幹細胞を活性化・賦活化させることで、加齢によって低下した機能を改善させたり、虚血性疾患や外傷性疾患に対する治療効果が期待できるという仮説を設定し、本研究計画では、若年ラット・成熟ラット・加齢ラットなど年齢別ラットにおける MSC プロファイルの変化を詳細に解析すると同時に、疾患モデル動物 (脳梗塞モデル等) へ投与し、治療効果や効能メカニズムを多角的に解析することで、脳神経の発達・加齢変化・損傷治癒を、幹細胞の恒常性という観点から総合的に考察し、新たな治療法の開発に結びつけるという研究を開始した。

2. 研究の目的

骨髄間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC) は末梢循環中にも存在し、全身臓器の

cell replacement に関わっている可能性が示唆されている。我々の予備実験の結果から、MSC プロファイルは加齢とともに変化するが、ある種の生理活性物質は、MSC プロファイルを正常化させることが可能であることが示唆された。本研究では、年齢別ラットにおける MSC プロファイルを詳細に比較解析する。また、疾患モデルラットに対する MSC 移植の治療メカニズムを解析することも行い、最終目的としては、これらの結果に基づいて、脳神経の発達・加齢変化・損傷治癒について、幹細胞の恒常性という観点から総合的に考察し、難治性神経疾患に対する新たな治療法の開発を目指すことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) in vitro 解析: 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) in vivo 解析: 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) in vitro 解析

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)および老齢(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。

5) 成体ラット(8週令)および老齢(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。

6) 成体ラット(8週令)および老齢(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。

(2) in vivo 解析

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局限していたのに対し、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局限していた群(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。

さらに、実験的脳梗塞に対し、骨髄間葉系幹細胞移植とリハビリテーションを組み合わせ、治療効果を検討した結果、コンビネーション群でもっとも高い治療効果を認めた。脳梗塞の体積の検討では、細胞移植+リハビリテーション群、細胞移植群、リハビリテーション群、vehicle投与群の順に有意に体積の減少を認めた。同様に、行動学的機能検査においても運動機能の改善を認めた。また、脳梗塞周辺領域のシナプス数も有意な増加傾向を示し、MRIにおける脳梁は萎縮の抑制を認めた。

これらの結果から、MSC移植にリハビリ

テーションを組み合わせる事で、運動機能をさらに改善させることが分かった。

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。特に、リハビリテーションと骨髄間葉系幹細胞移植を組み合わせたコンビネーション群においては、脳梗塞周囲のシナプス数の増加が観察されたことから脳の可塑性の亢進が関与していることが推測された。さらに、脳梁の萎縮の抑制が観察されたことから、非梗塞側皮質からの神経回路の再構築も影響していると推測された。

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 で行い、MSC プロファイルの解析および疾患モデルラットに対する MSC 移植の治療メカニズムを解析を行った。これらの結果から、骨髄間葉系幹細胞の有する生体の恒常性の維持に關与する property が難治性神経疾患に対する治療効果の発現に貢献していると考えられた。

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4件)

Sasaki Y, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Nakazaki M, Nagahama H, Suzuki J, Tateyama D, Oka S, Namioka T, Namioka A, Onodera R, Mikami T, Wanibuchi M, Kakizawa M, Ishiai S, Kocsis JD, Honmou O.,

Synergic Effects of Rehabilitation and Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells after Stroke in Rats, Phys Ther, 査読有, in press

Suzuki J, Sasaki M, Harada K, Bando M, Kataoka Y, Onodera R, Mikami T, Wanibuchi M, Mikuni N, Kocsis JD, Honmou O., Bilateral Cortical Hyperactivity Detected 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.

自家骨髄間葉系幹細胞の静脈内投与による脊髄再生. 本望修, 佐々木祐典, 岡真一, 森田智慶, 竹林庸雄, 山下敏彦, 整形・災害外科, 査読無, 56:1177-1181, 2013.

骨髄間葉系幹細胞を用いた脳梗塞の治療. 岡真一, 佐々木祐典, 本望修, 臨床と研究, 査読無, 6: 791-796, 2013.

[学会発表](計9件)

発表者名: 本望修

学会等名: 第33回日本神経治療学会

発表場所: 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

年月日: 2015.11.26-28

発表者名: 本望修

学会等名: 日本蘇生学会 第34回大会

発表場所: 秋田キャッスルホテル(秋田県秋田市)

年月日: 2015.11.5-6

発表者名: 本望修

学会等名: 日本蘇生学会 第34回大会

発表場所：秋田キャッスルホテル（秋田県秋田市）

年月日：2015.11.5-6

発表者名：本望修

学会等名：第19回日本適応医学会学術集会

発表場所：一橋大学一橋講堂（東京都千代田区）

年月日：2015.9.12

発表者名：本望修

学会等名：日本蘇生学会 第34回大会

発表場所：秋田キャッスルホテル一橋大学一橋講堂

年月日：2015.11.5-6

発表者名：本望修

学会等名：第63回日本輸血・細胞治療学会

発表場所：京王プラザホテル（新宿）（東京都新宿区）

年月日：2015.5.28-30

発表者名：本望修

学会等名：第63回日本輸血・細胞治療学会

発表場所：京王プラザホテル（新宿）（東京都新宿区）

年月日：2015.5.28-30

発表者名：本望修

学会等名：第35回日本脳神経外科コンGRESS総会（神奈川県横浜市）

発表場所：パシフィコ横浜

年月日：2015.5.8

発表者名：本望修

学会等名：STROKE2015 第40回日本脳卒中学会

発表場所：リーガロイヤルホテル広島（広島県広島市）

年月日：2015.3.27

〔図書〕（計 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：

出願年月日：

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

本望 修 (Honmou, Osamu)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：390285007

(2)研究分担者

鰐淵 昌彦 (Wanibuchi, Masahiko)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30343388

佐々木 祐典 (Sasaki, Masanori)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：20538136

三上 毅 (Mikami, Takeshi)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：30372816

小林 正樹 (Kobayashi, Masaki)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70592715

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

坂井 拓郎 (Sakai, Takuro)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：80639229

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

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

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

浪岡 愛 (Namioka, Ai)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：60748995

浪岡 隆洋 (Namioka, Takahiro)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：70748996

(3)連携研究者
なし