

令和元年6月7日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05037

研究課題名(和文)新規犬骨髄間葉系幹細胞による肝細胞成長因子デリバリーを利用した犬の脊髄再生医療

研究課題名(英文) Establishment of regenerative therapy for dogs using delivery system of hepatocyte growth factor secreted from novel canine mesenchymal stem cells

研究代表者

西村 亮平(Nishimura, Ryohei)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：80172708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：新規犬間葉系幹細胞を用いた犬の脊髄再生医療の開発を目指し、急性期および亜急性期脊髄損傷モデルに対するBM-PAC移植の治療効果をBM-PACからの液性因子分泌に着目して評価・解析した。急性期および亜急性期脊髄損傷に対しBM-PACを静脈内投与したところ、BM-PACは損傷部位へHomingした。また、急性期では肝細胞成長因子(HGF)、亜急性期では血管内皮細胞増殖因子(VEGF)などの液性因子の分泌を開始、組織損傷抑制・保護効果あるいは組織再生効果を発揮することで、運動機能回復の促進に寄与することが示唆された。本研究から、BM-PACの静脈内投与による犬の脊髄再生医療の臨床応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

犬では脊髄損傷が多く、重症例では術後の歩行回復が十分ではなく、動物のみならず飼主のQOLも著しく低下する。近年、これらの症例に対するMSCを用いた脊髄再生医療が導入されるようになっているが、科学的根拠に不足し、MSC移植の効果に期待した盲目的な投与が多くなっている。本研究は、独自に見出した新規MSCであるBM-PACを用い、脊髄再生医療に利用できる性質を有していること、また、動物モデルを用いた有効性・安全性試験を通じ、移植法の妥当性、運動機能回復効果が得られるメカニズムについて明らかにし、科学的根拠に基づいた犬の脊髄再生医療の開発に貢献した。

研究成果の概要(英文)：We developed stem cell therapy for canine spinal cord injury using a novel mesenchymal stem cell named bone marrow peri-adipocyte cell (BM-PAC). BM-PAC possesses secretion ability of various humoral factors which shows therapeutic effects on spinal cord injury. When BM-PACs were intravenously administrated to a nude mouse spinal cord injury model in acute or sub-acute phase, cells migrated into the lesion and secreted hepatocyte growth factor (HGF) and vascular endothelial growth factor in acute and sub-acute phase, respectively. Through the supply of these factors to the lesion site, BM-PACs protected spinal cord and suppress the progress of damage. Regeneration of spinal cord tissue including axons and myelins could also occur and these histological modification could contribute to the functional recovery. It is expected to apply BM-PAC based-stem cell therapy for dogs with acute and sub-acute spinal cord injury.

研究分野：獣医外科学

キーワード：犬 脊髄再生医療 間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

犬では脊髄損傷が多く、重症例では歩行機能回復が得られないことから、脊髄再生医療が期待されている。申請者は、骨髄の脂肪細胞周囲に付着する小型細胞が間葉系幹細胞 (MSCs) であることを見出し、骨髄脂肪細胞周囲細胞 (Bone Marrow Peri-adipocyte cells; BM-PAC) と名付けて報告した。BM-PAC は従来の骨髄由来間葉系幹細胞 (BMMSC) と比較して、増殖能・多分化能・コロニー形成能などの幹細胞特性に優れた細胞であり、再生医療に用いるセルソースとして魅力的な細胞材料と期待できた。また、BM-PAC は TNF- や IL-1 などの炎症性サイトカイン刺激に応答し、肝細胞成長因子 (HGF) を分泌することを明らかにした。HGF は強力な、組織再生因子であり、脊髄損傷に対しては損傷修復・再生に寄与することが報告されている。以上から、BM-PAC を脊髄損傷部へ到達させることで脊髄損傷部への HGF を供給するデリバリーシステムを構築し、科学的根拠に基づいた犬の脊髄再生医療を開発・提案することが可能と考えられた。

### 2. 研究の目的

脊髄損傷の病態は病期により異なるため、本研究では急性期および亜急性期脊髄損傷を治療標的とし、ヌードマウスの重度脊髄損傷モデルを用い、BM-PAC の局所および静脈投与を試み、損傷部への細胞集簇および損傷部に対する液性因子分泌能、投与後の運動機能回復と組織学的評価に基づき、脊髄再生医療としての有効性と安全性を検討した。急性期の病態は炎症が主体であるため、HGF 分泌に着目した解析を行い、亜急性期においては、炎症が沈静化されていることから、HGF 以外に血管新生因子の分泌に着目した解析を行うこととした。

また、慢性期脊髄損傷に対して、BM-PAC から分化誘導した神経細胞を用いることを想定し、BM-PAC からの機能的神経細胞誘導の条件検討を行うこととした。

### 3. 研究の方法

(1) 急性期脊髄損傷に対する HGF 分泌を介した BM-PAC 移植による脊髄損傷治療の有効性および安全性の検討

ヌードマウスの第 10 胸椎レベルで重度脊髄損傷を作製し、損傷直後 ~ 6 時間以内に犬骨髄より分離・培養した BM-PAC を局所 ( $6 \times 10^4$  個) および静脈 ( $1 \times 10^6$  個) 投与した。運動機能回復はマウス後肢運動機能評価スケールである BMS スコアを用いて経時的に評価した。静脈投与群では、Vivo Track640 により細胞標識を行い、IVIS により体内分布を追跡し、損傷部への Homing を評価し、Homing が認められた期間の脊髄損傷部における HGF 発現を Western Blotting により評価した。観察期間終了後、脊髄損傷部を採取し、NF200 および GFAP による免疫組織学的評価を行い、損傷の程度を評価した。対照群には培養液のみ投与した。

(2) 亜急性期脊髄損傷に対する血管新生因子分泌を介した BM-PAC 移植による脊髄損傷治療の有効性および安全性の検討

(1)と同様にヌードマウス脊髄損傷モデルを作製し、損傷後 9-10 日後に BM-PAC の静脈内投与を行った。細胞の体内分布、運動機能回復を経時的に評価し、観察期間終了後に損傷部を採取し、血管新生を含めて病理組織学的評価を行った。BM-PAC 投与との比較を目的に、非 MSC である皮膚線維芽細胞の投与を行った群 (SF 群) および培養液のみ投与した Control 群を設定した。

また、BM-PAC の血管新生因子発現・分泌能および機能の評価することを目的として、各種血管新生因子の遺伝子発現を qPCR で定量し、皮膚線維芽細胞と比較した。

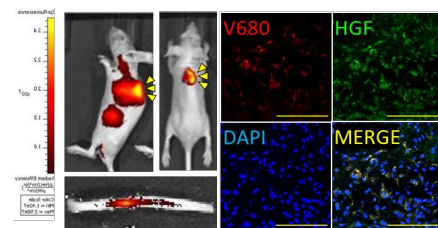
(3) BM-PAC から機能的神経細胞への分化誘導

過去の報告から MSC の神経細胞分化能を促進させることが報告されている塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) の前処理による神経細胞分化を行い、分化誘導した細胞の形態学的評価、神経細胞マーカーである MAP2 の発現の qPCR による定量、およびカルシウム取り込み試験を行い、神経細胞への分化能を評価した。

### 4. 研究成果

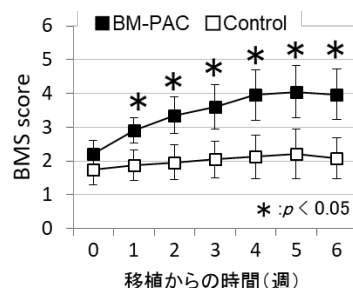
(1) 急性期脊髄損傷に対する HGF 分泌を介した BM-PAC 移植による脊髄損傷治療の有効性および安全性の検討

局所投与では移植後 8 週間後に有意な運動機能回復が得られ、LFB 染色で白質残存面積が増加傾向を示した。一方、静脈投与では移植 3 日後から損傷部へ細胞が Homing し、移植 1 週間後から有意な機能回復がみられた (図 1)。また、移植 1 週間後に採取した脊髄損傷部では HGF 発現が有意に増加しており (図 1)、LFB 染色で白質残存面積の増加、免疫染色では残存軸索の増加とグリア瘢痕抑制がみられ、BM-PAC が急性期損傷部位へ遊走し、HGF 分泌を介した組織損傷抑制・保護効果を示したことが示唆された。



【図 1】蛍光標識 (V680) した BM-PAC をヌードマウス亜急性期 SCI モデルに静脈投与すると、損傷部に細胞が集簇する (Homing)。IHC では HGF 発現が確認できた。

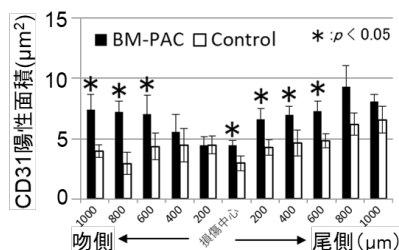
(2) 亜急性期脊髄損傷に対する血管新生因子分泌を介した BM-PAC 移植による脊髄損傷治療の有効性及び安全性の検討  
 亜急性期脊髄損傷においても、BM-PAC 投与後 3 日目から損傷部への Homing がみられ、1 週間後から運動機能回復が有意に促進した(図 2)。SF 群においても同様の Homing がみられ、運動機能回復も促進したが、Control 群と比較し有意な差は得られなかった。病理組織学的評価から、BM-PAC 群では残存軸索と新生血管の有意な増加がみられた(図 3)。BM-PAC および SF の血管新生因子発現の比較では、血管内皮増殖因子の発現が BM-PACs で有意に高く、移植効果の差は VEGF 分泌能に起因する可能性が示された。



【図 2】亜急性期 SCI モデルの BM-PAC 経静脈移植の治療効果 (BMS スコア 4 以上で負重性歩行が可能)

(3) BM-PAC から機能的神経細胞への分化誘導

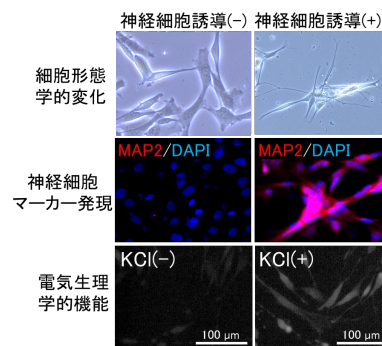
FGF-2 処理を行った BM-PAC は神経細胞誘導後 9 日目で MAP2 の遺伝子およびタンパク発現が上昇した。また、KCl 刺激によるカルシウム取り込み能がみられ、BM-PAC から電気生理学的機能を有する神経細胞へ分化可能であることが示された(図 4)。



【図 3】BM-PAC 移植後、6 週目の損傷部脊髄周囲では有意な血管数 (CD31 陽性) の増加がみられた

(4) BM-PAC の MSC としての性質についてのさらなる検討

本研究の当初の目標とは異なるが、BM-PAC が有する優れた多分化能に着目し、従来の犬 MSC では確立されてこなかった軟骨分化に関する基礎的検討を同時に行った。その結果、FGF-2 による前処理、無血清培地、低酸素条件による初期誘導が BM-PAC の軟骨誘導に適した条件であり、犬 MSC では困難であったプロテオグリカン、型コラーゲンなどの軟骨基質に富む軟骨ペレットの作製に成功した。



【図 4】BM-PAC の神経細胞分化能

(5) 総括

以上から、本研究は、新規犬 MSC である BM-PAC を用いた犬脊髄損傷に対する再生医療の基盤的研究をなすものであり、急性期および亜急性期に対する BM-PAC 静脈投与が損傷部に細胞が Homing し、HGF や VEGF 分泌を介した組織損傷抑制・保護効果あるいは再生促進効果を示すことを動物実験モデルを用いて明らかにした。特に亜急性期に対しては、自己 BM-PAC を分離・培養する期間を設定可能であり、今後安全性の確認を踏まえ、速やかな臨床応用が期待できる。急性期に対しては、他家 BM-PAC の利用による治療効果を検討し、今後臨床応用可能な再生医療として、さらなる改良が必要と考えられる。また、慢性期脊髄損傷に対しては、神経分化誘導した BM-PAC が移植材料として有用である可能性が示されたが、今後、移植効果などの検討を加え、各病期に適した脊髄再生医療の包括的な開発を目指す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- Endo K, Fujita N, Nakagawa T, Nishimura R. Effect of fibroblast growth factor-2 and serum on canine mesenchymal stem cell chondrogenesis. Tissue Eng Part A. 2019. doi:10.1089/ten.TEA.2018.0177.
- Lin HY, Fujita N, Endo K, Morita M, Takeda, T, Nakagawa T, Nishimura R. Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stem cells adhering to adipocytes in canine bone marrow. Stem Cells and Development. 2017,15;26(6):431-440. doi:10.1089/scd.2016.0200.

〔学会発表〕(計 16 件)

- 陳君妍、藤田直己、羽生航、武田妙、遠藤健太郎、中川貴之、西村亮平、急性期脊髄損傷モデルを用いた犬間葉系幹細胞の経静脈移植効果の検討、第 18 回日本再生医療学会、2019 年 3 月、神戸
- 武田妙、藤田直己、羽生航、陳君妍、遠藤健太郎、中川貴之、西村亮平、急性期脊髄損傷モデルを用いた犬間葉系幹細胞の経静脈移植効果の検討、第 18 回日本再生医療学会、2019 年 3 月、神戸
- 羽生航、藤田直己、陳君妍、武田妙、遠藤健太郎、中川貴之、西村亮平、犬の新規骨髄間葉系幹細胞 (BM-PACs) の神経細胞分化誘導、第 18 回日本再生医療学会、2019 年 3 月、神戸

4. 遠藤健太郎、藤田直己、國富芳博、高井治美、鳥井蓉子、武田妙、陳君妍、羽生航、中川貴之、西村亮平、バイオ3Dプリンタを用いた犬間葉系幹細胞からの軟骨組織構築における低酸素環境の影響、第18回日本再生医療学会、2019年3月、神戸
5. Takeda T, Chen J, Endo K, Hanyu W, Fujita N, Nakagawa T, Nishimura R, Homing ability and angiogenesis effect of canine mesenchymal stem cell has therapeutic effect on sub-acute spinal cord injury. 8th Annual Congress of Asian Society of Veterinary Surgery, 2018 Dec, Taichun, Taiwan.
6. Chen J, Fujita N, Takeda T, Endo K, Hanyu W, Nakagawa T, Nishimura R. Intravenous transplantation of Canine mesenchymal stem cells for mice acute spinal cord. 8th Annual Congress of Asian Society of Veterinary Surgery, 2018 Dec, Taichun, Taiwan.
7. Hanyu W, Fujita N, Chen J, Takeda T, Endo K, Nakagawa T, Nishimura R. FGF-2 enhances multipotency of canine mesenchymal stem cells through maintenance of undifferentiated state. 8th Annual Congress of Asian Society of Veterinary Surgery, 2018 Dec, Taichun, Taiwan.
8. Fujita N, Challenges to develop stem cell therapy in dogs using novel mesenchymal stem cells isolated from bone marrow. TERMIS WC 2018, 2018 Sep. Kyoto.
9. 武田妙、藤田直己、陳君妍、遠藤健太郎、羽生航、中川貴之、西村亮平、亜急性期脊髄損傷に対し経静脈移植した犬間葉系幹細胞の走化性と移植効果、第161回日本獣医学会学術集会、2018年9月、つくば
10. 大田拓也、遠藤健太郎、武田妙、陳君妍、羽生航、藤田直己、中川貴之、西村亮平、塩基性線維芽細胞増殖因子が犬間葉系幹細胞の未分化性の維持・獲得に与える影響、第161回日本獣医学会学術集会、2018年9月、つくば
11. 遠藤健太郎、藤田直己、武田妙、陳君妍、羽生航、中川貴之、西村亮平、低酸素環境による犬間葉系幹細胞の硝子軟骨への分化運命決定、第161回日本獣医学会学術集会、2018年9月、つくば
12. 藤田直己、犬の骨髄から分離・培養した新規間葉系幹細胞 BM-PACs の性状と再生医療への応用、第17回日本再生医療学会、2018年3月、横浜
13. 武田妙、陳君妍、藤田直己、遠藤健太郎、中川貴之、西村亮平、犬の骨髄脂肪細胞周囲細胞の肝細胞成長因子分泌能と脊髄損傷に対する経静脈移植の効果、第17回日本再生医療学会、2018年3月、横浜
14. 遠藤健太郎、藤田直己、武田妙、陳君妍、中川貴之、西村亮平、低酸素環境が犬間葉系幹細胞の軟骨分化に与える影響、第17回日本再生医療学会、2018年3月、横浜
15. Endo K, Fujita N, Kunitomi Y, Takeda T, Chen J, Nakayama K, Nishimura R. 3D bioprinting of cartilage tissue using canine mesenchymal stem cell spheroids under the optimal growth factor condition. TERMIS Americas 2017 Annual Conference. 2017 Dec. Charlotte, NC.
16. 藤田直己、林杏怡、遠藤健太郎、武田妙、陳君妍、中川貴之、西村亮平、急性期脊髄損傷に対する犬新規間葉系幹細胞移植の治療効果、第160回日本獣医学会学術集会、2017年9月、鹿児島

〔その他〕

東京大学獣医学専攻獣医外科学研究室ホームページ <http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/geka/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：藤田 直己

ローマ字氏名：Fujita, Naoki

所属研究機関名：東京大学

部局名：農学生命科学研究科

職名：特任助教

研究者番号(8桁)：10554488

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：位高 啓史

ローマ字氏名：Itaka, Keiji

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。