

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15033

研究課題名(和文) 神経変性疾患で治療効果を発揮する間葉系幹細胞亜集団の同定とその解析

研究課題名(英文) Identification of MSC subpopulations that have therapeutic potential for neurodegenerative disorders

研究代表者

堀内 基広 (HORIUCHI, MOTOHIRO)

北海道大学・獣医学研究科・教授

研究者番号：30219216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：緻密骨由来間葉系幹細胞(CB-MSCs)はプリオン感染マウスの生存期間を延長することから、CB-MSCsは神経変性疾患の治療に利用できる可能性がある。CB-MSCsを移植したプリオン感染マウスでは、予想に反してミクログリアが更に活性化したが、Arg-1などの抗炎症性M2マーカーの発現が上昇していたことから、CB-MSCsはミクログリアの活性化状態を変化させることが示唆された。In vitroにおいてもCB-MSCsの培養上清はプリオン感染マウスから回収したミクログリアの活性化を抗炎症性のM2タイプにシフトさせたことから、CB-MSCsは自然免疫の修飾により治療効果を発揮する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intra-cerebral transplantation of compact bone-derived MSCs (CB-MSCs) prolonged survival of prion-infected mice, suggesting that CB-MSCs could be useful for the treatment of neurodegenerative disorders. In the CB-MSCs transplanted prion-infected mice, unexpectedly, microglia were more activated than un-transplanted mice. However, up-regulation of some of the marker genes for M2-type microglia, such as Arg-1, suggesting that CB-MSCs modify the activation state of microglia. The culture supernatant of CB-MSCs also shifted the activation state of microglia recovered from prion-infected mice to M2-type activation state. These results suggest that the alteration of innate immunity by CB-MSCs is one of the mechanisms for the therapeutic effects of CB-MSCs on neurodegenerative disorders.

研究分野：獣医学、病原微生物学、獣医衛生学

キーワード：間葉系幹細胞 プリオン病 神経変性疾患 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病、プリオン病、パーキンソン病等の難治性神経変性疾患の治療法として、多能性幹細胞を用いる再生医療・細胞治療が期待されている。多能性幹細胞として、人工多能性幹細胞 (iPS)、胚性幹細胞 (ES)、神経幹細胞 (NSC) などが挙げられるが、骨髄や脂肪組織に存在する間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells, MSC) もその一つである。MSC は間葉系由来の細胞であり、筋肉、脂肪細胞、軟骨細胞等に分化するが、上皮系由来の神経細胞やグリア細胞にも分化転換しうる多能性幹細胞である。MSC を脳虚血、あるいはパーキンソン病モデルラットに移植した場合、MSC は神経病変部に集簇し、機能的改善が認められる。我々は、臨床期のプリオン感染マウスに、末梢から MSC を移植した場合、MSC は神経病変部に集簇して延命効果をもたらすことを報告した。しかし、治療効果が満足できるレベルに達していない点を改善する必要がある。MSC の利点は、1) 骨髄や脂肪組織などから比較的容易に採取できること、および、2) 末梢から移植しても神経変性病変部に走化すること、であり、非侵襲的な MSC の自己移植による難治性神経変性疾患の治療法の確立が期待されている。そこで、MSC がプリオン感染マウス脳内でどのように作用するかを解析し、MSC のプリオン病治療機序の一端を明らかにする。

2. 研究の目的

骨髄や脂肪組織に存在する間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells, MSC) は、神経系細胞にも分化転換しうる多能性幹細胞である。MSC の移植は、パーキンソン病、あるいはプリオン病などの難治性神経変性疾患モデルで延命効果を示す。MSC は、末梢から移植しても中枢神経病変部に走化・集簇することから、非侵襲的な MSC の自己移植による神経変性疾患の治療法が期待されている。しかし、その実用化には、さらなる治療効果の向上が必要である。MSC の神経系細胞への分化転換の促進は、治療効果向上のための重要な方策と考えられる。そこで本研究では、MSC の神経系細胞への分化転換に関与するシグナル経路を同定して、分化転換促進法の開発に資することを目的として開始した。しかし、実施途中で MSC の治療効果が分化転換によるものではなく、免疫就職であることを示唆する結果が得られたため、MSC の脳内ミクログリアに対する作用を解析し、MSC のプリオン病治療機序の一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) マウス大腿骨あるいは脂肪組織から、プラスチック附着性細胞を分離後、フローサイトメーターにより、表面抗原の発現を解析した。MSC の品質は幹細胞マーカーである Sca-1、および CD90.2 (Thy-1) の発現を指標に確認した。
- 2) マウス緻密骨あるいは脂肪組織由来 MSC (1×10^5 個) を、プリオン Chandler 株あるいは Obihiro 株接種後 120 日のマウスに、脳定位接種法により視床に接種した。
- 3) MSC を移植したマウスの脳組織を HE 染色、免疫組織化学 (プリオンタンパク質、活性化ミクログリアマーカー: Iba-1、活性化アストロサイトマーカー: GFAP) により解析した。
- 4) MSC を移植したマウスの視床における遺伝子発現の変化を定量 RT-PCR により解析した。
- 5) MSC をプリオン感染マウス脳抽出液存在下で培養し、MSC の遺伝子発現の変化を定量 RT-PCR により調べた。
- 6) プリオン感染マウスから回収したミクログリアをプリオン感染マウス脳抽出液で刺激された MSC の培養上清で刺激してミクログリアの遺伝子発現の変化を定量 RT-PCR により調べた。

4. 研究成果

マウス緻密骨あるいは脂肪組織から、プラスチック附着性細胞を分離後、単球系細胞および造血幹細胞を除くために、免疫磁気分離法 (MACS) により、CD11b および CD45 陰性の細胞集団を回収した。mMSC のマーカーとなることが報告されている分子である、CD29、CD44、CD73、CD90.2、CD105、CD106 のうち、CD105 の発現が緻密骨と脂肪組織で異なることから、これら由来の異なる mMSCs の治療効果を検討した。

プリオン Chandler 株感染マウスの海馬に MSCs を移植したところ、緻密骨由来 (CB-)MSCs を移植したマウスでは、生存期間が 168 日 (陰性対照: 155 日) と有意に延長した (図 1 左)。一方、脂肪組織由来 (AT-)MSCs を移植したマウスでは、生存期間が 154 日 (陰性対照: 155 日) と延長は認められなかった (結果は示さず)。CB-MSCs を移植したマウスでは生存期間は延長したが、異常型プリオンタンパク質の蓄積は、非移植陰性対照のプリオン感染マウスと差が認められなかった (結果は示さず)。

また、CB-MSCs を移植したマウスの視床でミクログリアのさらなる活性化が認められたことから、遺伝子発現を調べたところ、炎症性の M1 マーカーとして知られる IL-1b の発現は上昇していたが、抗炎症性の M2 マーカーとして知られる、Arg-1、Fizz-1、IL-10 がの発現上昇が顕著であったことから、CB-MSCs の移植によりミクログリアの活性化状態が

M1 タイプから抗炎症性の M2 タイプにシフトする可能性が考えられた (図 1 右)

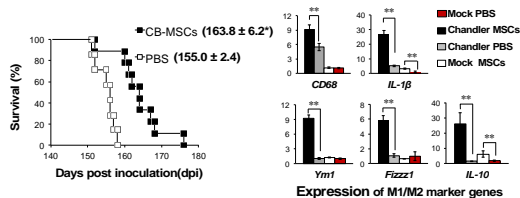


図 1. CB-MSCs 移植によるプリオン感染マウス生存期間延長と視床における遺伝子発現の変化

プリオン感染マウスに移植した CB-MSCs を回収し、遺伝子発現の変化から MSCs の分化転換を解析する予定で研究を進めたが、蛍光標識した CB-MSCs の回収効率が低く移植脳内からの CB-MSCs の回収は断念した。

そこで、CB-MSCs を *in vitro* でプリオン感染マウス脳抽出液で刺激し、遺伝子発現の変化を調べた。神経栄養因子等(NGF, VEGF, HGF) の発現を調べたが、非感染脳抽出液で処理した CB-MSCs あるいは未処理の CB-MSCs と差は認められなかった。プリオン感染マウス脳抽出液で刺激した CB-MSCs では COX-2 の発現が特異的に上昇したことから、CB-MSCs は神経細胞系への分化転換を起こすのではなく、免疫修飾により治療効果を発揮することが示唆された。

そこで、当初計画を変更して、プリオン感染脳抽出液存在下で培養した CB-MSCs の培養上清で刺激されたプリオン感染マウス脳由来ミクログリアの活性化状態を定量 RT-PCR により解析した。CD68, IL-1b などの炎症性ミクログリアのマーカー遺伝子の発現が低下し、Arg-1 などの抗炎症性ミクログリアのマーカー遺伝子の発現が上昇した。従って、CB-MSCs はミクログリアの活性化状態を M1 タイプの炎症促進性から M2 タイプの組織修復・神経保護性にシフトさせる可能性が示唆された (図 2)。

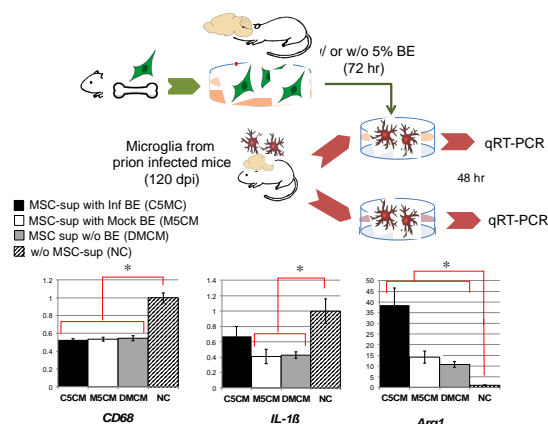


図 2. CB-MSCs の培養上清はプリオン感染マウス由来ミクログリアの活性化状態を変化させる。

CB-MSCs は延命効果を発揮したが、AT-MSCs は延命効果を発揮しなかったことから、プリオン感染マウスに移植された CB-MSCs が神経系細胞に分化転換することで、治療効果を発揮すると仮説を立て、プリオン感染マウスの脳内に移植された CB-MSCs の遺伝子発現を解析する予定であった。しかし、プリオン感染マウスに移植した CB-MSCs の回収が上手く進まなかったことから、計画を変更し *in vitro* で、プリオン感染マウス脳抽出液で刺激した CB-MSCs の解析を行うこととした。その結果、CB-MSCs は神経系細胞に分化転換して神経保護作用を発揮するのではなく、ミクログリアの活性化状態を調節して神経保護作用を発揮する可能性を見出した。研究は当初計画とは異なる方向に進んだが、CB-MSCs のプリオン病治療機序を説明可能な新たな知見を得たことから、研究はおおむね順調に進んだと考えられる。

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)

[雑誌論文](計 6 件)

Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Flow Cytometric Detection of PrPSc in Neurons and Glial Cells from Prion-Infected Mouse Brains. *J. Virol.*, 92 (1): e011457-17, 2017. Doi: 10.1128/1J.V.01457-17 (査読あり)

Shan Z, Hirai Y, Hayashi R, Yamasaki T, Hasebe R, Song CH, and Horiuchi M. Therapeutic effect of autologous compact bone-derived mesenchymal stem cell transplantation on prion disease. *J. Gen. Virol.*, 98: 2615-2627, 2017. Doi: 10.1099/jgv.0.0.000907 (査読あり)

Tanaka M, Fujiwara A, Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Masujin K, and Horiuchi M. Comparison of abnormal isoform of prion protein in prion-infected cell lines and primary-cultured neurons by PrPSc-specific immunostaining. *J. Gen. Virol.*, 97(8): 2030-2042, 2016. doi: 10.1099/jgv.0.000514 (査読あり)

Shan Z, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi M. Establishment of a simple cell-based ELISA for the direct detection of abnormal isoform of prion protein from prion-infected cells without cell lysis and proteinase K treatment. *Prion*, 10(4): 305-318, 2016. doi: 10.1080/19336896.2016.1189053 (査読あり)

Hasebe R, Tanaka M, Suzuki A, Yamasaki T, and Horiuchi M. Complement factors alter the amount of PrP(Sc) in primary-cultured mouse cortical neurons associated with increased membrane permeability. *Virology*, 496: 9-20, 2016. doi: 10.1016/j.virol.2016.05.014 (査読あり)

Saijo E, Hughson AG, Raymond GJ, Suzuki A, Horiuchi M, and Caughey B. PrPSc-specific Antibody Reveals C-Terminal Conformational Differences between Prion Strains. *J. Virol.*, 90(10): 4905-4913, 2016. doi: 10.1128/JVI.00088-165 (査読あり)

〔学会発表〕(計 10 件)

Kuroda M, Yamasaki T, Hasebe R, and Horiuchi M. Activation state of glial cells in prion diseases. Joint Symposium between Seoul National University-Hokkaido University “Infection and Immunity” (Nov 15, 2017, Seoul National University, Seoul, Korea)

Kuroda M, Yamasaki T, Hasebe R, and Horiuchi M. Activation state of glial cells in prion diseases. APPS2017 (Oct 20-21, 2017, Melbourne University, Australia)

Yamasaki T, Iwamaru Y, Matsuura Y, Kuroda M, Hasebe R, Okada H, and Horiuchi M. Characterization of gene expression profiles in brains of mice infected with typical and atypical BSEs. APPS2017 (Oct 20-21, 2017, Melbourne University, Australia)

Tanaka M, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi M. Analyses of neuron-autonomous mechanisms for neurodegeneration in prion diseases on neuron-enriched primary cell cultures. APPS2017 (Oct 20-21, 2017, Melbourne University, Australia)

Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, and Horiuchi M. Unique reactivity of cervid recombinant PrP for the detection of L-BSE and CWD by RT-QuIC. Prion2017 (May 23-26, 2017, Assembly house, Edinburgh, UK)

Shan Z, Hirai Y, Hayashi R, Yamasaki T, Hasebe R, Song CH, and Horiuchi M. Therapeutic effect of autologous compact bone-derived mesenchymal stem cell transplantation on prion disease. Prion2017 (May 23-26, 2017, Assembly house, Edinburgh, UK)

Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M.

Utility of cervid recombinant PrP for the detection of L-BSE and CDW prions by RT-QuIC. The 64th Annual Meeting of The Japanese Society for Virology (Oct, 23-25, 2016, Sapporo, Japan)

Horiuchi M. Activation state of glial cells in prion diseases Prion2016 (May 10-13, 2016, National Center of Sciences Building, Tokyo, Japan)

Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi M. Neuron and glial cell type-specific detection of PrP^{Sc} in prion-infected mouse brain by flow cytometry. Prion2016 (May 10-13, 2016, National Center of Sciences Building, Tokyo, Japan)

Tanaka M, Fujiwara A, Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Masujin K, and Horiuchi M. Comparison of abnormal isoform of prion protein (PrP^{Sc}) in prion-infected cell lines and primary cultured neurons by PrP^{Sc}-specific immunostaining. Prion2016 (May 10-13, 2016, National Center of Sciences Building, Tokyo, Japan)

〔図書〕(計 0 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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者

堀内 基広 (HORIUCHI MOTOHIRO)
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号：30219216