

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11794

研究課題名（和文）骨髄幹細胞の自己治癒能と全身の恒常性維持による健康寿命延長

研究課題名（英文）Extended lifespan induced by mesenchymal stem cells

研究代表者

佐々木 優子（Kataoka-Sasaki, Yuko）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：80631142

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：超高齢化社会を迎える日本にとって、老化メカニズムを解明し、健康寿命を延長することは最重要課題である。骨髄間葉系幹細胞は、損傷時における治癒プロセスに貢献しており、既に複数の疾患をターゲットとした臨床応用が試みられている。我々は、これまでの研究から、老化により生体内の間葉系幹細胞が機能低下を起こすことが、個体の老化の原因となっているとの仮説を立て、神経疾患動物に対して、ラットから採取したMSCを経静脈的に投与した結果、寿命の延伸効果が得られることを報告した。本研究の成果により、健康寿命の延長が可能となれば、超高齢化社会を迎えているわが国において、大きな福音となり、波及効果は極めて高いと思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における研究の成果によって、認知症などの神経疾患動物モデルに対する骨髄間葉系幹細胞の経静脈的投与は病状の進行（運動・認知機能の低下）を抑制し、さらに寿命の延伸が得られることが判明した。超高齢化社会を迎える本邦にとって、健康寿命を延ばすことが可能になれば、今後における有用性を考慮した際の学術的・社会的意義は高いものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we demonstrated that intravenous infusion of MSCs increased the survival rate in rat models of spontaneously hypertensive (stroke-prone) in which organs including kidney, brain, heart, and liver are damaged during aging due to spontaneous hypertension. Intravenous infusion of MSC may extend lifespan in addition to preventing the deterioration of motor and cognitive functions in the animal model.

研究分野：神経科学

キーワード：骨髄幹細胞

1. 研究開始当初の背景

老化メカニズムを解明し、健康寿命を延長することは、超高齢化社会を迎える日本にとって最重要課題である。これまでの老化研究では、老化・寿命制御に重要な役割を果たす制御因子・シグナル伝達系の特定がなされてきたが、これまでのところ、健康寿命の延長をもたらす、認知・運動機能を維持・向上し、抗加齢効果を発揮する治療法の開発には至っていない。

成体幹細胞である間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSC)は、主に骨髄に存在する。しかし、骨髄から末梢循環へ移行し、臓器の新陳代謝・機能維持に関わると同時に損傷時における創傷治癒にも貢献している。すなわち、MSCは、生体全体の恒常性維持（ホメオスタシス）と自己治癒力に大きく貢献している細胞であることが明らかになってきた。

我々は、MSCのこのような性質を利用して、1990年代より、MSCを培養して数を増やし、脳梗塞、脊髄損傷などの神経疾患動物モデルに対して静脈内に投与し治療効果をもたらすという数多くの報告をしてきた。これまでの研究から、老化により生じる生体内のMSCの機能低下が、個体の老化の原因となっているという可能性を踏まえ、本研究では、MSCの投与・補充により“抗加齢効果”をもたらすことが可能かどうかを検討することで、健康寿命の延長をもたらす治療薬の開発に展開することができると考えた。

本研究の成果により、老化の本質の解明とともに、健康寿命の延長が可能となれば、超高齢化社会を迎えているわが国において、大きな福音となり、波及効果は極めて高いと思われる。

2. 研究の目的

我々は、これまでに経静脈的に投与されたMSCが多くの神経疾患（脳梗塞、脊髄損傷、脱髄疾患、末梢神経損傷など）において治療効果を呈するという報告を精力的に行ってきた。MSCによる治療メカニズムは、神経栄養因子を介した神経保護作用、抗炎症作用、血液脳関門の安定化、血管新生作用、神経軸索のsprouting、再有髄化、神経可塑性の亢進、神経系細胞への分化などが多段階に時間経過とともに生ずることによって治療効果を発揮すると考えている。

微小脳血管病を呈するspontaneously hypertensive rat (stroke prone)モデルにおいては、先行研究で、MSCの経静脈的投与は血液脳関門の安定化に寄与し、運動・認知機能の低下を抑制する可能性があることを報告した(Nakazaki et al., 2019)。同モデルラットに静脈内投与したMSCはtransforming growth factor- β (TGF- β)の分泌に関与し、血管内皮細胞や周細胞を増殖・分化・安定化させること微小血管系のリモデリングを惹起させ、さらにアミロイド β のクリアランスも生じることが治療メカニズムと考えられた。

本研究では、同モデルにMSCを経静脈的に投与することにより、生存期間の延伸が得られるかどうかの検討を行った。また、その機序として、MSCによって微小血管系の修復に関与するメカニズムを解明することを目的とした。

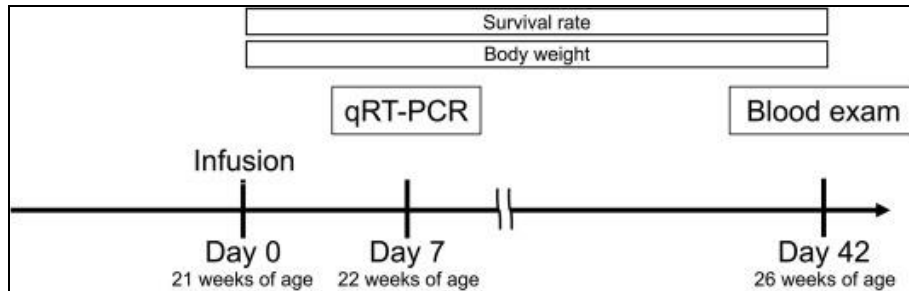
3. 研究の方法

(1) MSCの培養

SDラットの大腿骨から骨髄を採取し、培養を行った。3継代目のMSCを投与に使用した。

(2) spontaneously hypertensive rat (stroke prone)モデル

雄性 spontaneously hypertensive rats (stroke prone)を用いた。21週齢時にランダム化して、MSC投与群と対照群を設定した。本モデルは【SHR等疾患モデル共同研究会 (Disease Model Cooperative Research Association)】が保有し、系統維持管理している動物である。左大腿静脈からMSC(対照群には細胞なしの新鮮な培養液)を投与後、7日目にQuantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)による遺伝子発現解析を行い、42日間の観察期間後に血液を採取し腎機能を評価した。



(3) qRT-PCR

MSC投与7日目に腎臓・脳・心臓・肝臓から組織を採取後に、mRNAを抽出し、PRISM7500 (Thermo Fisher Scientific Inc)を用いて発現定量解析を行った。使用したプライマーは以下の通りである。

Forehead Box 01 (FOXO1) Rn01494848_m1 NM_001191846.2

Transforming growth factor (TGF)- β 1 Rn00572010_m1 NM_021578.2

TGF- β Receptor 1 Rn00688966_m1 NM_012775.2

Smad3 Rn00565331_m1 NM_013095.3

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) Rn01775763-g1 NM_017008.4

(4) 腎機能検査

MSC投与42日目に血清中の尿素窒素、クレアチンを測定した (Hitachi 7180 Autoanalyzer)。

4. 研究成果

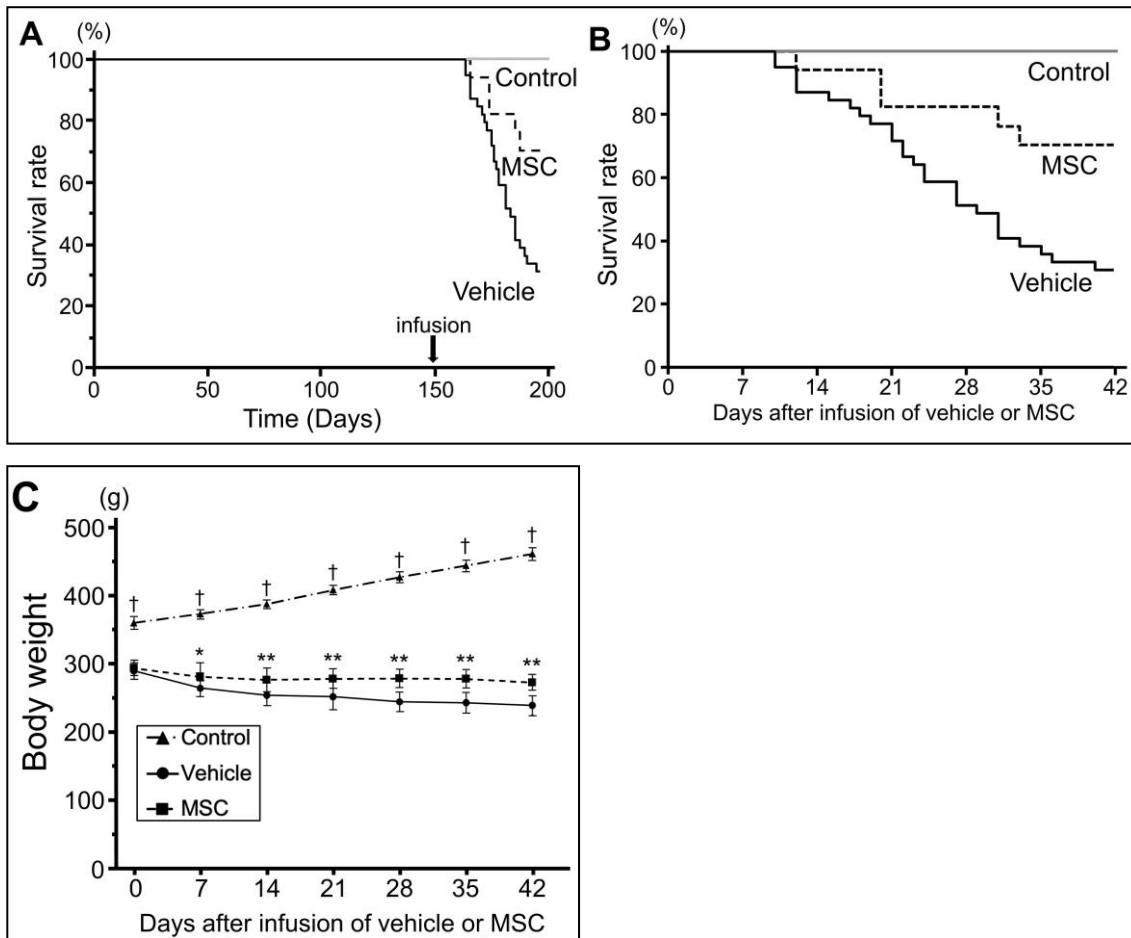
(1) 生存期間

雄性 spontaneously hypertensive (stroke prone) ラットの生存率は22週齢以降に急速に低下するため、我々は21週齢時にMSC(対照群には培養液)を投与し、42日間(26週齢)観察した。注入後42日目における生存率は、対照群は30.7%であったのに対し、MSC投与群では70.6%であった。Kaplan-Meier解析(B)では、MSC投与群の平均生存期間は、MSC投与群は対照群より有意に長いことが示された。これらの結果は、MSCの静脈内投与が、本モデルにおいて寿命を延長することを示した。

(2) 体重

生存しているすべてのラットの体重を、毎週測定した。同モデルラットの体重は徐々に減少

したが、対照群ラットの体重は年齢とともに増加した (C)。体重に有意差は認められなかった。投与前の体重に有意差は認められていない。しかし、MSC 投与群では、体重減少の進行が有意に抑制されていることが観察された。



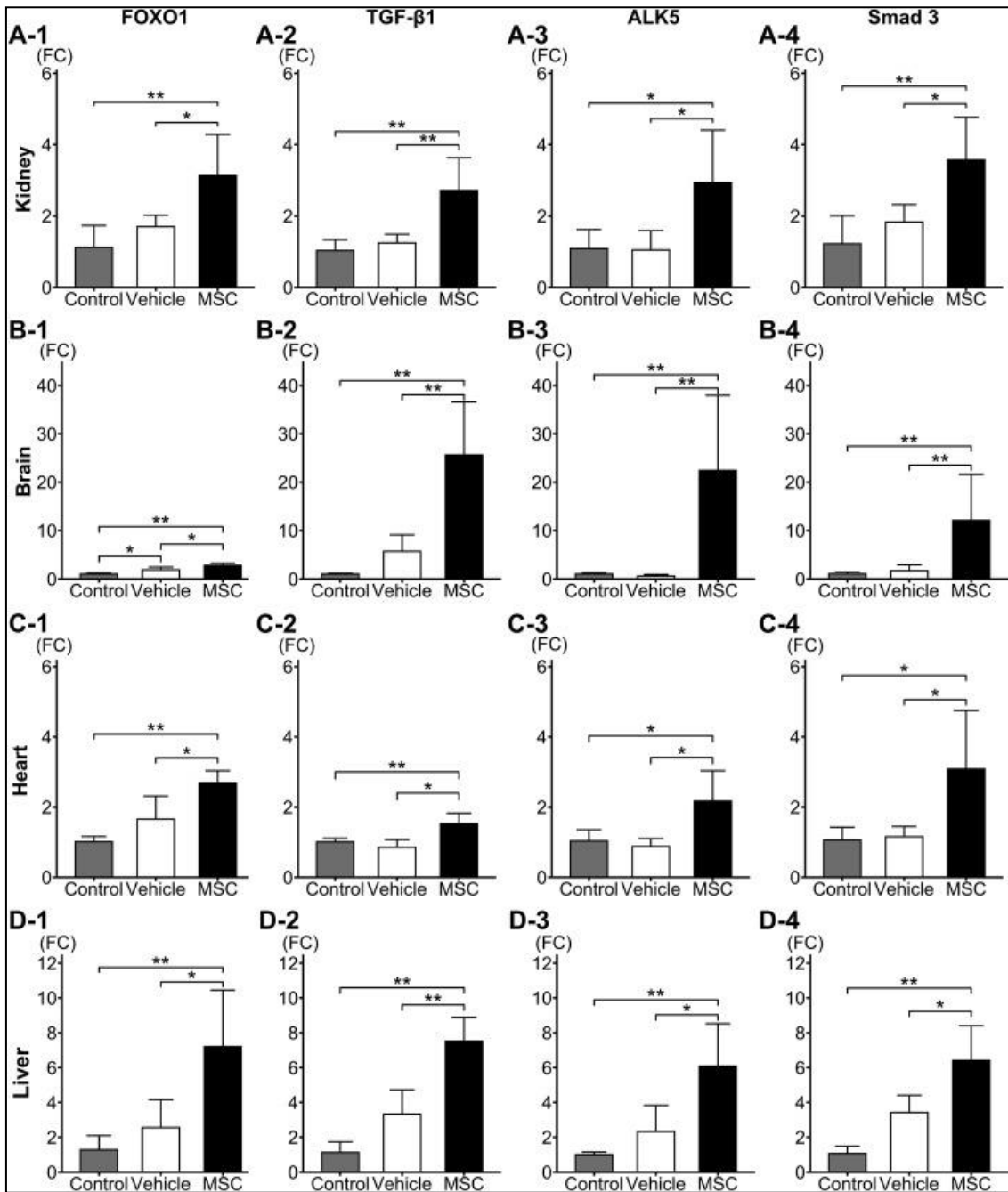
(3) 遺伝子発現解析

MSC投与7日目に腎臓・脳・心臓・肝臓から組織を採取後に、各臓器における遺伝子発現解析を行った結果、MSC治療群において長寿に関与する遺伝子であるforkhead box 01 (FOXO1)の上昇が認められた。また、TGF- β と、TGF- β のパスウェイに関与する遺伝子であるALK5およびSMAD3の発現も有意に増加していた。

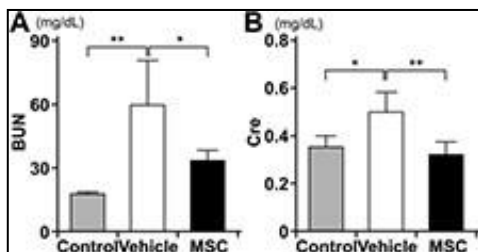
(4) 腎機能

MSC投与42日目の血清尿素窒素とクレアチニンは、対照群では上昇を認めたが、MSC治療群では正常ラットと同様の値であった。

以上の結果より、spontaneously hypertensive(stroke prone)ラットに対するMSCの経静脈的投与によって、寿命が延伸することがわかった。MSCによるTGF- β -SMAD3パスウェイの活性化により、全身の微小血管系のリモデリングが惹起されること、また、長寿に関与する遺伝子であるFOXO1の活性が上昇することにより、生体の細胞増殖に関わるプロセスが制御される可能性があることが示唆された。



MSC 投与 7 日目の腎臓(A)、脳(B)、心臓(C)、肝臓(D)における FOXO1、TGF-β、ALK5、SMAD3 の発現解析。MSC 投与群で発現が有意に上昇していることがわかる。



MSC 投与 42 日目の血清中尿素窒素 (A)、クレアチニン(B)。MSC 投与群で低下していることがわかる。

(図はすべて Nakazaki et al., 2020 より改変)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakazaki Masahito, Oka Shinichi, Sasaki Masanori, Kataoka-Sasaki Yuko, Nagahama Hiroshi, Hashi Kazuo, Kocsis Jeffery D., Honmou Osamu	4. 巻 6
2. 論文標題 Prolonged lifespan in a spontaneously hypertensive rat (stroke prone) model following intravenous infusion of mesenchymal stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e05833 ~ e05833
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2020.e05833	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	佐々木 祐典 (Sasaki Masanori) (20538136)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	
研究分担者	小野寺 理恵 (Onodera Rie) (60393328)	札幌医科大学・医学部・客員講師 (20101)	
研究分担者	岡 真一 (Oka Shinichi) (70789453)	札幌医科大学・その他部局等・講師 (20101)	
研究分担者	本望 修 (Honmou Osamu) (90285007)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鵜飼 亮 (Uai Ryo) (30896113)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	横山 貴裕 (Yokoyama Takahiro) (60896116)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Yale University			