

令和元年5月22日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10794

研究課題名(和文) 実験的脊髄損傷に対する骨髄幹細胞移植におけるエクソソームを介したペリサイトの再生

研究課題名(英文) Functional recovery following intravenous infusion of mesenchymal stem cells in experimental spinal cord injury

研究代表者

佐々木 祐典 (Sasaki, Masanori)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：20538136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：SCIに対してMSCを経静脈的に移植した結果、運動機能の改善が得られることが判明した。運動機能の改善が得られた動物の脳組織からmRNAを抽出し、マイクロアレイ解析によってスクリーニングされた遺伝子のうち、運動機能スコアであるBBBスコアと相関のある遺伝子を“behavior associated DEGs”として同定した。大脳皮質における特定の遺伝子発現の一過性の変化により、運動機能回復に関与していることが示唆された。MSCは経静脈的な全身投与により、脊髄局所だけでなく脳に対しても運動機能回復を促進させる効果があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷に対する骨髄間葉系幹細胞の経静脈的投与は、すでに臨床における安全性や有効性の検討がなされている。本研究における研究成果によって、骨髄間葉系幹細胞の経静脈的投与による治療効果を発揮するメカニズムとして、骨髄間葉系幹細胞によって脳における遺伝子の変化が生じ、それが運動機能の回復に貢献している可能性を明らかにしたことは、骨髄間葉系幹細胞の経静脈的投与によって、損傷局所のみならず遠隔部位に対して喪失した神経機能の回復に貢献するメカニズムが作動することを示唆しており、今後の臨床における有用性を考慮した際の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)：Recent studies has demonstrated that remote responses in the brain, as well as local responses in the injured spinal cord, can be occurred following spinal cord injury (SCI). Intravenous infusion of mesenchymal stem cells (MSCs) has been shown to elicit functional recovery in SCI through local mechanisms. We studied brain response that might be associated with the functional improvements induced by the infused MSCs following SCI. Genomewide RNA profiling was conducted in the motor cortex of SCI rats at 3 days post infusion. Then, qRT-PCR revealed that the ‘behaviorally-associated differentially expressed genes (DEGs)’ were identified by the Pearson’s correlation analysis with the behavioral function, suggesting that these genes may be related to the functional recovery after infused MSCs. These results suggested that the infused MSCs alter the gene expression signature in the brain and that these expression changes may contribute to the improved function.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脊髄損傷

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

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、これまで骨髄間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSC)移植が、脊髄損傷モデルに対して治療効果を有することを明らかにし(Sasaki et al., 2001, 2004, 2006, 2007, 2009, 2011; Lankford and Sasaki et al., 2008, Osaka et al., 2010)、治療効果を発揮するメカニズムとして、MSCの産生する神経栄養因子による神経栄養・保護作用、損傷軸索の再生、損傷ミエリンの修復、免疫調節作用、血管新生作用などが協奏的に作用することを提唱してきた(Sasaki et al., 2007, 2009, 2011)。さらに、急性期脊髄損傷モデルに対するMSC移植による機能回復には、ペリサイトを含む血液脊髄関門(blood spinal cord barrier: BSCB)の安定化と修復が強く関与することを、evans blueの組織内漏出の定量、von Willebrand因子などの免疫組織学的解析、微小血管の直径の変化などで示し、BSCBの安定化・修復が、運動機能の改善に貢献する可能性を示唆した(Matsushita et al., 2015)。

## 2. 研究の目的

本研究では、脊髄損傷を受けた個体の脳脊髄において変化する分子に注目し、動物モデルを用いた解析を行い、新しい治療効果を発揮するメカニズムの解明を目的とした。さらに、MSCの経静脈的投与により、脊髄損傷の慢性期に治療効果を発揮するかどうかを検討した。

## 3. 研究の方法

実験的脊髄損傷は、SDラットに対して、IHインパクト(IH-0400, Precision Systems and Instrumentation)を用いて作成した。作成後にGFPトランスジェニックラットより採集・培養したMSCを経静脈的に投与した。

### (1) 行動学的評価:

経時的にBasso Beattie. Bresnahan (BBB) スコアを用いて行った。

### (2) 免疫組織学的解析:

経時的に組織採集を行い、作成した凍結切片に免疫染色を行い、超解像共焦点顕微鏡(ZeissLSM780, ELYRAS.1)を用いて定量解析を行った。使用した一次抗体: ペリサイト(PDGFR-β; #3169, Cell Signaling, NG2; AB5320A4, Merck Millipore、血管内皮細胞(RECA-1; NB100-64647, Novus Biologicals)、アストロサイト(GFAP; ab4674)。

### (3) 生体内色素の組織内漏出:

生体用色素である Evans Blue (961Da)を大腿静脈より投与した。24時間後に、脊髄組織を採集し、IVIS imaging systemでの定量、組織内への漏出を吸光度計にて定量的に測定し、BSCBの機能的再生度の変化を評価した。一部のラットは4%PFAで灌流固定し、凍結切片を作成し、共焦点顕微鏡を用いて血管外漏出を観察した。

(4) 組織学的解析：

エポン封埋によりプラスチック切片を作製し、トルイジンブルー染色による光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡による超微細構造の解析を行った。

(5) Ex vivo MRI Diffusion Tensor Imaging (DTI)：

動物用 MRI (7T) を用いた Ex vivo MRI Diffusion Tensor 法により、軸索の進展・損傷を検出した。

(6) マイクロアレイ解析

MSCの経静脈的投与を行った脊髄損傷ラットの大脳運動野からRNAを抽出し、Clariom™ D/Gene Chip\_ Rat Transcriptome Array (RTA1.0., Affymetrix, Santa Clara, CA)によるマイクロアレイ解析を行った。

(7) qRT-PCR

マイクロアレイ解析でMSCによる発現変動遺伝子(differential expressed genes: DEGs)について、TaqMan\_ Gene Expression assayを用いてqRT-PCRによる発現解析を行った(PRISM7500, 7500 software v2.3, Thermo Fisher Scientific Inc.)。(Gapdh, Rn01775763\_g1; Kcnp2, Rn01411450\_g1; lipid phosphate phosphatase-related protein type 4 [Lppr4], Rn01522267\_m1; Pde10a, Rn00673152\_m1; calcium binding protein 7 [Cabp7], Rn01443564\_m1; plakophilins-2 [Pkp2], Rn01404502\_m1; Scn3b, Rn01422019\_m1; nuclear receptor binding protein 2 [Nrpb2], Rn01505756\_m1; Sik1, Rn00572495\_m1; Fos, Rn02396759\_m1; Dusp1, Rn00678341\_g1; Btg2, Rn00568504\_m1; Ier2, Rn02531674\_s1; Cyr61, Rn00580055\_m1; Apold1, Rn02131262\_s1; Id2, Rn01495280\_m1).

#### 4 . 研究成果

実験的脊髄損傷モデル作製後1日目にMSCを経静脈的投与した結果、運動機能の改善が得られた。MSCの経静脈的投与ののち3日目の大脳運動野の脳組織から、mRNAを抽出して、Microarray解析(68,842遺伝子)によってスクリーニングされた differentially expressed genes (DEGs) 38遺伝子のうち、BBBスコアとの相関のある7 coding 遺伝子を” behavior associated DEGs ”とした。これらの遺伝子をqRT-PCRで発現を確認した。これらの7coding遺伝子は、脊髄損傷により発現が軽度増加し、MSCの経静脈的投与により、さらに発現が増加していた。GSEA解析にて、これらの” behavior associated DEGs ”とBBBスコアには強い相関が得られたことから、” behavior associated DEGs ”は治療効果判定に有用な遺伝子である可能性があることがわかった。さらに、Promoter領域の遺伝子配列の解析により、神経再生に関与するNRSFおよびPPARにより発現量が調整されていることが示唆された。さらに、8つの” non-behavior

associated DEGs” は、脊髄損傷により発現が増加したが MSC の経静脈的投与により軽減していた。これらの 8 つの遺伝子は immediate early response に関与する遺伝子だった。

Day7 の PCR では発現量の変化が減少していることから、DEGs 発現量は day3 がピークであり、一過性の遺伝子発現の変化により、治療効果を発揮するメカニズムに関与する遺伝子と考えられた。したがって、SCI ラットモデルの脳 Microarray 解析から、大脳皮質における特定の遺伝子発現の一過性の変化により、幹細胞の増殖や分化、脳の活性化が生じることで、運動機能回復に関与していることが示唆された。

MSC は経静脈的な全身投与により、脊髄局所だけでなく脳に対しても運動機能回復を促進させる効果があり、この脳における遺伝子発現の変化は、移植後早期の機能回復の治療メカニズムの一つと考えられ、さらにこれらの DEGs は治療効果判定にも有用である可能性が示唆された。

また、脊髄損傷作製後 10 週目に MSC を経静脈的に投与した結果、運動機能の改善が得られることが判明した。この治療効果を発揮するメカニズムとして、投与された MSC が脊髄損傷の損傷部位に集積し、BSCB の安定化・修復が生じ、再有髄化、損傷軸索の sprouting などが関与していることを、種々の方法により確かめた。

さらに、脊髄損傷後に神経系の細胞に生じる変化について、Heat Shock Factor 1(HSF1)に注目した。immediate stress 反応により HSF1 の活性化を惹起する遺伝子改変動物を用いて、脊髄損傷後に脳および脊髄に発現する HSF1 を組織学的および電気生理学的に解析した。

以上より、本補助金は適切に使用された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Oshigiri T, Sasaki T, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Nakazaki M, Oka S, Morita T, Hirota R, Yoshimoto M, Yamashita T, Hashimoto-Torii K, Honmou O. Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells Alters Motor Cortex Gene Expression in a Rat Model of Acute Spinal Cord Injury. J Neurotrauma、査読有、36 巻、2019、411-420.

DOI: 10.1089/neu.2018.5793.

Hashimoto-Torii K, Sasaki M, Chang YW, Hwang H, Waxman SG, Kocsis JD, Rakic P, Torii M. Detection of local and remote cellular damage caused by spinal cord and peripheral nerve injury using a heat shock signaling reporter system. IBRO Rep、査読有、5 巻、2018、91-98

DOI: 10.1016/j.ibror.2018.11.003.

Morita T, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Nakazaki M, Nagahama H, Oka S, Oshigiri T, Takebayashi T, Yamashita T, Kocsis JD, Honmou O. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells promotes functional recovery in a model of chronic spinal cord injury. Neuroscience、査読有、335 巻、2016、221-231

〔学会発表〕(計5件)

佐々木 祐典、脳梗塞と脊髄損傷の再生医療、第123回日本解剖学会総会、日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学、2018.3.28

佐々木 祐典、脳梗塞・脊髄損傷に対する再生医療－医師主導治験による実用化－(特別講演)、日本生態心理学会第6回大会、北海学園大学、2017.9.4

佐々木 祐典、脳梗塞と脊髄損傷の再生医療、第59回日本小児神経学会学術集会、大阪国際会議場、2017.6.15

佐々木 祐典、脳梗塞・脊髄損傷に対する再生医療－医師主導治験による実用化－(教育講演)、第33回日本リハビリテーション医学会北海道地方会、札幌医科大学、2016.4.23

佐々木 祐典、脳梗塞・脊髄損傷に対する再生医療－医師主導治験による実用化－、第28回代用臓器・再生医学研究会、北海道大学、2016.2.27

〔図書〕(計1件)

Masanori Sasaki and Osamu Honmou, Springer, Mesenchymal Stem Cells, Cell Therapy Against Cerebral Stroke, 2017, 147-156

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：鳥越 俊彦

ローマ字氏名：Toshihiko Torigoe

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：20301400

研究分担者氏名：本望 修

ローマ字氏名：Osamu Honmou

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 90285007

研究分担者氏名：押切 勉

ローマ字氏名：Tsutomu Oshigiri

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 70754612

## (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。