

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10917

研究課題名(和文) 多能性成体幹細胞(Muse細胞)移植による損傷脊髄の修復

研究課題名(英文) Transplantation of Multilineage-differentiating stress-enduring cells after spinal cord injury in mice

研究代表者

熊谷 玄太郎(Kumagai, Gentaro)

弘前大学・医学研究科・講師

研究者番号：90529679

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)：不安障害モデルマウスにおける脊髄損傷後の病理解析、脊髄損傷後の性差による不安障害の違いと運動障害との関連を報告した(Journal of Neurotrauma 2018、2020に掲載)。
マウスからMuse細胞を初めて抽出し、抽出された細胞がMuse細胞の特徴であるクラスター形成能、自己複製能、多能性マーカー、自発的分化能を有している事を確認した。さらにMuse細胞をin vitroで神経分化誘導を行い、Muse細胞が神経細胞、オリゴデンドロサイトやアストロサイトのグリア細胞への分化能を有していることがわかった(Cell transplantation 2019に掲載)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自家骨髄由来間葉系幹細胞は、札幌医科大学を中心に脊髄損傷に対して、平成25年から平成29年まで医師主導治療が実施され、その有効性が報告されている。一方でヒト骨髄由来Muse細胞も令和1年7月から臨床治療が開始されている。本研究は再生医療研究のプラットフォームであるマウスMuse細胞を確立した。この研究によって詳細なMuse細胞治療効果の検討が可能となる。また、本研究結果から、不安障害は脊髄損傷後の神経障害を悪化させることが示唆された。この知見は脊髄損傷の実臨床において、非常に役立つ知見と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We established the evaluation of anxiety after spinal cord injury (Journal Neurotrauma 2018, 2020 published).

We established mouse adipose tissue-derived Muse cells in vitro. Mouse Muse cells were isolated and characterized for the first time. Muse cells showed greater pluripotency-like characteristics, survival, neurotrophic factor secretion, and neuronal and glial differentiation capacities than non-Muse cells, indicating that they may have better neural-regeneration potential (Cell Transplantation 2019 published).

研究分野：医歯薬学

キーワード：脊髄損傷 Muse細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、脊髄損傷後の麻痺を改善させる目的で胚性幹細胞 (Embryonic stem cells ; ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells ; iPS 細胞) を神経幹細胞に誘導し、移植後に運動機能の改善が得られることを明らかにした (Kumagai G, et al. PLoS one 2009、Tsuji O, Kumagai G, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010)。しかしながら、ES 細胞は受精卵を用いることから移植には倫理的なハードルがあり、iPS 細胞は移植細胞の移植部での腫瘍化を防ぐ必要がある。そこで、申請者らは間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells; MSCs) に注目した。MSCs は多分化能や自己複製能を有し、腫瘍化の危険性が低く、倫理的な問題も少なく、培養が比較的容易であるメリットを有するが、運動機能改善効果に関しては限定的である。そこで申請者らは、新しい神経栄養因子である NGF、BDNF、NT-3 すべてを発現した Multineurotrophin (MNTS1) を遺伝子導入した同種 MSCs をラット脊髄損傷モデルに移植し、神経障害性疼痛を改善させる効果があることを明らかにした (Kumagai G, et al. Experimental Neurology. 2013)。しかしながら、MSCs に遺伝子導入するためにはレンチウイルスなどのベクターを介する必要がある、臨床応用へのハードルは高い。

近年、成人ヒトの間葉系組織に多様な細胞に分化する能力を有する新たなタイプの多能性幹細胞である Muse 細胞が発見され、再生医療への活用に注目を浴びている。Muse 細胞は MSCs と多能性幹細胞の両方の特徴を備えており、間葉系マーカー CD105 とヒト ES 細胞マーカー SSEA-3 の二重陽性細胞として組織や間葉系の培養細胞から単離可能である。Muse 細胞の持つ最大の利点は腫瘍を作らないという安全面だけでなく、分化誘導もせずにそのまま生体内に投与するだけで組織修復細胞として働く簡便性にあるということである。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究はいまだ明らかとなっていない自家組織由来の Muse 細胞の損傷脊髄修復効果を解明するための基礎的研究を完成し、脊髄損傷に対する Muse 細胞を用いた臨床応用に展開するための基盤となる研究を行う。研究期間内に以下のことを明らかにする。

(1) 自家組織由来 Muse 細胞培養系の確立

我々の研究室ではヒトの靭帯細胞に間葉系幹細胞が存在し、靭帯組織から間葉系幹細胞を採取樹立することに成功している (Asari T, Kumagai G et al, Biochem Biophys Res Commun. 2012)。上記、予備的研究結果を基に Muse 細胞を移植細胞として用いる。脂肪組織より抽出し、その自己複製能、神経細胞への分化能を含めた多分化能の解析を行う。

(2) マウス脊髄損傷モデルの作成および評価系の確立

損傷の強さを軽度、中等度、重度の 3 種類に分け、損傷前後の不安行動、運動障害、感覚障害について検討する。

(3) 自家組織由来 Muse 細胞移植療法の確立

重症度別損傷モデルにおける至適投与と時期 (急性期、亜急性期、慢性期) 投与量、投与方法 (経静脈的、直接投与) を自家組織由来と他家組織由来 Muse 細胞とで移植効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 重症度別脊髄損傷モデルの作成

対象として 8 週齢 C57BL/6J マウス (4 週齢で細胞移植用に単径部から脂肪を採取) を用いる (20-23g、雌)。

脊髄損傷モデルの作成 (Kumagai G, et al PLoS one. 2009)

第 10 胸椎レベル脊髄に IH インパクト (Precision System and Instrumentation, Lexington, KY) を用いて、20 (軽度損傷) 60 (中等度損傷) 80 (重度損傷) kdyn の圧を加える。

行動評価および組織学的評価

損傷前および損傷後 6 週まで行動評価、脳波評価を経時的に行う。行動評価は Open field test (マウスの歩行パターン解析) ホールボード試験 (穴を除く運動を観察) Light/Dark test (明るい部屋と暗い部屋の滞在時間を測定) を用いた不安行動の評価、BMS scale を用いた下肢運動機能評価 (Kumagai G, et al PLoS one 4:11 e7706 2009)、Rotarod test を用いた下肢協調運動評価、ビデオ解析を用いた Open field test (マウスの移動距離、加速度が測定可能) を行う。感覚機能評価は Dynamic planter test による機械的皮膚刺激評価、Planter test による熱皮膚刺激評価を行う。脳波測定は損傷前と損傷 6 週で測定する。損傷後 6 週の時点で麻酔後に脊髄および脳を摘出して組織学的評価を行う。また、Western blot 解析により、損傷脊髄内炎症性マーカーを定量評価する。

(2) 自家組織由来 Muse 細胞の抽出および性質の解析

自家組織由来 Muse 細胞の抽出

4 週齢 C57BL/6 マウスの単径部から脂肪組織を採取する。予備実験から単径部から脂肪組織を採取しても行動評価には影響を与えないことを確認している。採取した細胞を培養液 (MEM、10%FBS、penicillin/streptomycin) を用いて培養し、各組織由来の間葉系幹細胞株を樹立し、

Flowcytometry を用いて、CD105 陽性 SSEA-3 陽性の Muse 細胞を抽出し、以下の項目を評価する。

(a)コロニー形成能、増殖能、骨分化能、脂肪分化能、軟骨分化能、神経分化能を評価

(b)Real-time PCR 法：

各誘導培養 7 日目、14 日目、21 日目で骨化関連遺伝子(BMP2, Runx2, ALP)、脂肪分化関連遺伝子(LPL, PPAR 2)、軟骨関連遺伝子発現(Sox9, COL2A1, COL10A1)、神経関連遺伝子発現 (Tuj, GFAP) を評価する。

(c)エピジェネティクス変化による間葉系幹細胞特性変化の検討

移植細胞のマーカースとしてレンチウイルスをベクターとして GFP 遺伝子を Muse 細胞に導入する。移植前に GFP 陽性 Muse 細胞の導入効率を Flowcytometry を用いて評価する。

(3)自己組織由来 Muse 細胞移植療法の確立

移植方法の検討：microinjector を用いて自家組織由来 Muse 細胞および他家組織由来 Muse 細胞 5x10⁵ 個を移植する。コントロールとして PBS を用いる。

(a)直接投与：損傷中心部、(b)硬膜内投与：腰椎レベルから硬膜内に投与(c)経静脈投与：Tail vein を用いる。3 つの方法で最も移植効果が高い移植方法を用いる。

移植時期の検討：損傷直後、1 週、2 週、4 週、12 週目で移植し、移植効果を検討する。

行動評価 (損傷後 8 週間観察)

上記行動評価を損傷前後で経時的に行う。

組織学的評価 (行動評価後に脊髄を採取)

(a)Hematoxylin and eosin (H&E) 染色を用いた脊髄萎縮評価

(b)Luxol Fast Blue (LFB) 染色を用いた残存髄鞘評価

(c)免疫染色を用いた組織学的評価 (移植細胞の生着、神経系への分化)

4 . 研究成果

(1)重症度別脊髄損傷モデルを作成

不安障害モデルマウスである PRIP-1-/- (phospholipase C (PLC)-related inactive protein type 1 ノックアウト) マウスと WT (Wild type) マウスに圧挫損傷を加え、行動評価および組織学的評価を行った。PRIP-1-/- マウスでは脊髄損傷後の二次損傷が拡大し、運動機能回復が不良であった (Journal of Neurotrauma 2018 に掲載)。また脊髄損傷モデルマウスにおける不安行動と運動機能回復の性差について検討し、雌雄マウス共に SCI 後に不安行動を示し、雄マウスは SCI 後の不安行動と運動機能との関連を認めることを示した (Journal of Neurotrauma 2020 に掲載)。

(2)自家組織由来 Muse 細胞の樹立および性質の解析

マウスから Muse 細胞を抽出した。抽出された細胞が Muse 細胞の特徴であるクラスター形成能、自己複製能、多能性マーカー、自発的分化能を有している事を確認した。さらに Muse 細胞を in vitro で神経分化誘導を行い、Muse 細胞が神経細胞、オリゴデンドロサイトやアストロサイトのグリア細胞への分化能を有していることがわかった。脂肪由来 Muse 細胞が脂肪由来 Non-Muse 細胞と骨髄由来 Muse 細胞に比べて神経栄養因子の分泌が高値であった。以上の結果をまとめ、海外雑誌 Cell transplantation に掲載された。

(3)自家組織由来 Muse 細胞移植効果の検討

脊髄損傷モデルマウスに脂肪由来 Muse 細胞を移植し、Muse 細胞群はコントロール群と比較して運動機能の改善が得られた。現在病理学的解析を行い、海外雑誌 Cell Transplantation に投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Taku Fujita, Gentaro Kumagai	4. 巻 35
2. 論文標題 Poor motor-function recovery after spinal-cord injury in anxiety-model mice with phospholipase related catalytically inactive protein type 1 knockout.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 1379-1386
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/neu	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 -

1. 著者名 63)Nitobe Y, Nagaoki T, Kumagai G, Sasaki A, Liu X, Fujita T, Fukutoku T, Wada K, Tanaka T, Kudo H, Asari T, Furukawa KI, Ishibashi Y.	4. 巻 28
2. 論文標題 Neurotrophic Factor Secretion and Neural Differentiation Potential of Multilineage-differentiating Stress-enduring (Muse) Cells derived from Mouse Adipose Tissue.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Transplantation	6. 最初と最後の頁 1132-1139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0963689719863809.	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Taku Fujita, Gentaro Kumagai et al
2. 発表標題 The association between anxiety and motor function recovery after spinal cord injury in GABAA receptor-defective mice.
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatshuhiro Fukutoku, Gentaro Kumagai et al
2. 発表標題 A comparison of anxiety behavior after spinal cord injury in female and male mice
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長沖隼英、熊谷玄太郎他
2. 発表標題 マウス脂肪組織由来Multilineage differentiating Stress Enduring (Muse) 細胞と骨髄由来Muse細胞の神経分化能の比較
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田拓、熊谷 玄太郎、劉 希哲、和田 簡一郎、田中 利弘、福徳 達宏、平田 雅人、兼松 隆、二階堂 義和、上野 伸哉、石橋 恭之
2. 発表標題 情動障害マウスにおける脊髄損傷後運動機能回復の検討
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshiro Nitobe, Toshihide Nagaoki, Gentaro Kumagai, Ayako Sasaki, Xizhe Liu, Taku Fujita, Kanichiro Wada, Ken-Ichi Furukawa, Yasuyuki Ishibashi
2. 発表標題 Isolation of Multilineage-differentiating stress enduring cells derived from mouse adipose tissue.
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society Annual Meeting (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔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	古川 賢一 (Furukawa Ken-Ichi) (20165468)	弘前大学・医学研究科・客員研究員 (11101)	