

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08974

研究課題名（和文）血液脳関門の破綻に注目した新規ALS動物モデルの開発と骨髄幹細胞による治療

研究課題名（英文）Intravenous infusion of mesenchymal stem cells for experimental ALS

研究代表者

小野寺 理恵（Rie, Onodera）

札幌医科大学・医学部・客員講師

研究者番号：60393328

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）：筋萎縮性側索硬化症（ALS）動物モデルに対して、骨髄間葉系幹細胞（MSC）を経静脈的に投与した結果、有意に病状の進行を抑制した（運動機能低下および脊髄運動神経細胞の減少、血液脳関門の破綻が抑制）。さらにMSC治療群は神経栄養因子NeurturinのmRNAの発現量が高くMSCの治療効果の1つであることが示唆された。これらの結果からMSCは血液脳関門の破綻を抑制し、神経栄養因子（Neurturin）を分泌することで運動神経保護作用が示唆され、ALS治療の1つとして有用であると推察された。さらに、MSCを複数回投与した結果、単回投与に比べて、有意に病状の進行は抑制され、寿命延伸効果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋萎縮性側索硬化症に対する骨髄間葉系幹細胞の経静脈的投与は、病状の進行を抑制した（運動機能低下および脊髄運動神経細胞の減少）。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、骨髄間葉系幹細胞の投与によって、血液脳関門の破綻が抑制され、脊髄前角の運動神経細胞の保護が惹起されることが神経機能の回復に貢献している可能性を明らかにした。さらに、骨髄間葉系幹細胞の複数回投与により、単回投与に比べて、さらに有効な治療効果が得られることを明らかにしており、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。

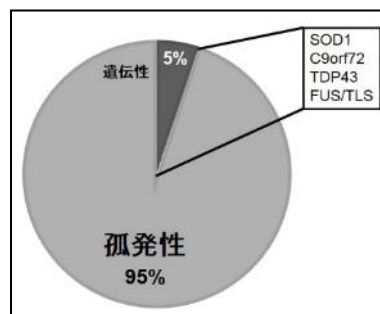
研究成果の概要（英文）：We demonstrated that an intravenous infusion of MSCs delay disease progression through the preservation of BSCB function and increased expression of a neurotrophic factor, neurturin, in SOD1G93A ALS rats. The MSC group exhibited reduced deterioration of locomotor activity compared to the vehicle group, which displayed progressive deterioration of hind limb function. We observed the protection of motor neuron loss and preservation of microvasculature in the MSC group. Neurturin expression levels were significantly higher in the MSC group. Thus, restoration of the BSCB and the protection of motor neurons might be contributing mechanisms to delay disease progression in SOD1G93A ALS rats. We also showed that repeated administration of MSCs (weekly, four times) increased the survival period, protected motor functions, and reduced deterioration of locomotor activity compared to a single infusion and vehicle infusion.

研究分野：再生医療

キーワード：骨髄幹細胞

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、運動ニューロンの変性により発症後数年で死に至る進行性の難治性神経疾患である。ALS は原因不明の孤発性が約 95%、遺伝性が約 5%を占めるとされる。これまでに、原因遺伝子として SOD1 をはじめとする多くの遺伝子の関与が報告されており (右図: Taylor et al., 2016 より改変)、なかでも、SOD1 遺伝子改変モデル動物を用いた前臨床試験における良好な結果を基に、ALS を対象とした複数の臨床試験が行われてきた。



近年、孤発性 ALS の原因として、軽微な外傷に起因する血液脊髄関門(blood spinal cord barrier: BSCB)の破綻があるという報告がなされ始めた。ALS 患者においては、BSCB の破綻により透過性が亢進し、微小循環が悪化することで、運動ニューロンの変性が観察されたとの報告がある (Sasaki S, Neuropathology, 2015)。つまり、BSCB の機能不全による脊髄前角の運動ニューロンの緩徐な細胞障害が ALS の病因となり、症候性となることが考えられる。また、外傷が孤発性 ALS の危険因子になりうるという報告があり、脊髄に対する外傷が ALS の発症プロセスを起動すると考えられている (Pupillo et al., 2012)。この仮説は、一般人に比べて、身体を酷使することの多いスポーツ選手に ALS の罹患率が高いという疫学的データからも支持される (Valdes et al., 2013)。外傷によって脊髄が受ける影響は、受ける外力の強弱に依存するため、呈する病態は多彩であり、いわゆる“脊髄損傷”ほどの重篤な病態に陥らなくても、外傷が脊髄に与えた軽微な影響によって ALS へ進展する症例群が存在するものと考えられる。

我々は 90 年代より、各種の神経疾患動物モデル (脊髄損傷、脳梗塞等) に対して、骨髄間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSC)の経静脈的投与が、治療効果をもたらすことを多数報告してきた。MSC の治療効果のメカニズムには、BSCB の安定化や神経栄養因子を介した神経栄養・保護作用などが多段階・協奏的に作用するため、治療効果は、急性期に留まらず慢性期においても発揮される。

特に ALS の病態において、MSC が治療効果を呈すると思われるメカニズムは、① BSCB の安定化と、② MSC が分泌する神経栄養作用である。根拠として、

①我々の慢性期脊髄損傷に対するMSC移植の基礎研究において、MSCの移植により、運動機能の回復が認められた。慢性期脊髄損傷にMSCを移植して、生体色素を静脈内に投与してBSCBの状態を観察した結果、MSC移植群では、機能不全に陥ったBSCBが修復され、運動機能の回復に貢献することを明らかにした(Morita et al., 2016)。

② MSC は、神経栄養因子を分泌する (Horita et al., 2006)。ALS では、脊髄前角運動ニューロンが障害を受けるが、同ニューロンの生存・機能維持は神経栄養因子に依存する。

従って、MSC は、同ニューロンの障害を抑制し、治療効果を発揮する可能性があると考えられる。

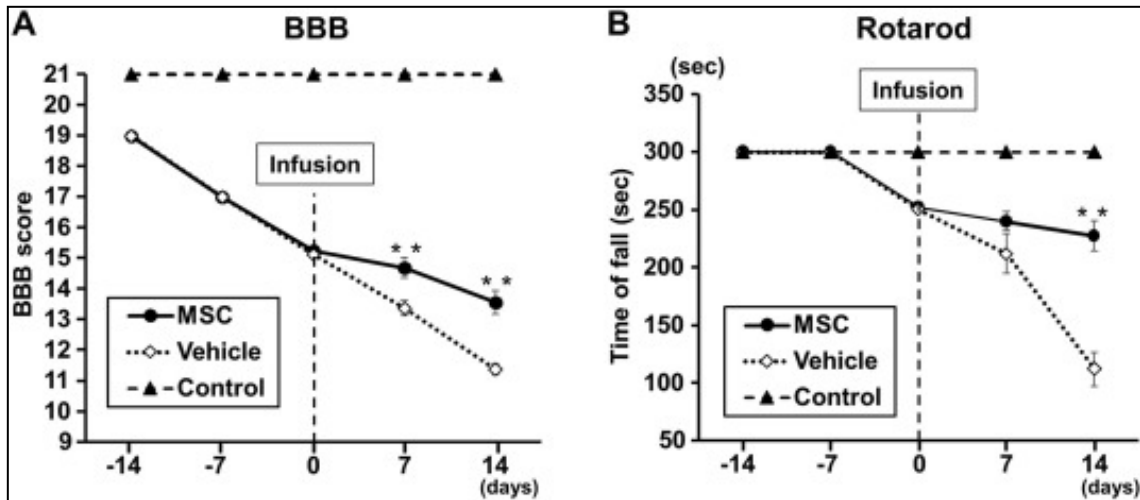
2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、ALS に対する MSC を用いた細胞移植療法による新しい治療法の開発である。

3. 研究の方法

ALS モデルラット (SD-Tg (SOD1G93A) L26H, Taconic Bioscience, Rensselaer, NY, USA) を用いて、治療効果とメカニズムの解析を行う。生後 12 週齢のラットに週に 1 回、BBB score および Rotarod test を評価し、BBB score が正常値の 21 点から 16 点に下がった時点を Day 0 とし、MSC または Vehicle を投与した。投与後は行動学評価を週 2 回に増やし、Day1 に分子生物学的評価を、Day14 を行動評価のエンドポイントとし、組織学的解析を行った。

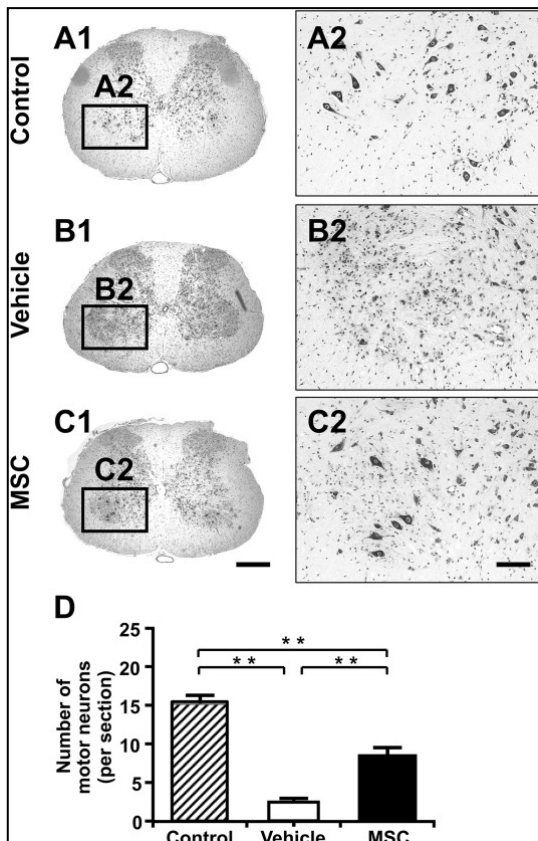
4. 研究成果



運動機能：

BBB score (A) は、実線で示した MSC 群が Vehicle 群に比べて、MSC 投与 7 日後および 14 日後の BBB score の低下を有意に抑制した。Rotarod test (B) は、MSC 群が Vehicle 群に比べて、MSC 投与 14 日後の落下までの時間を有意に抑制した。

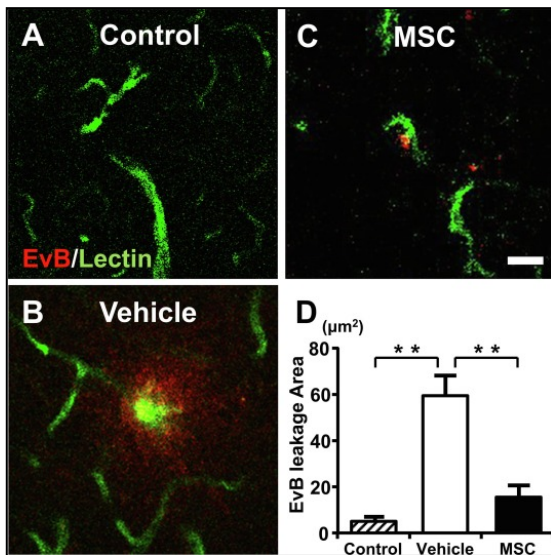
(Magota et al., Brain Res, 2021)



運動神経細胞数：

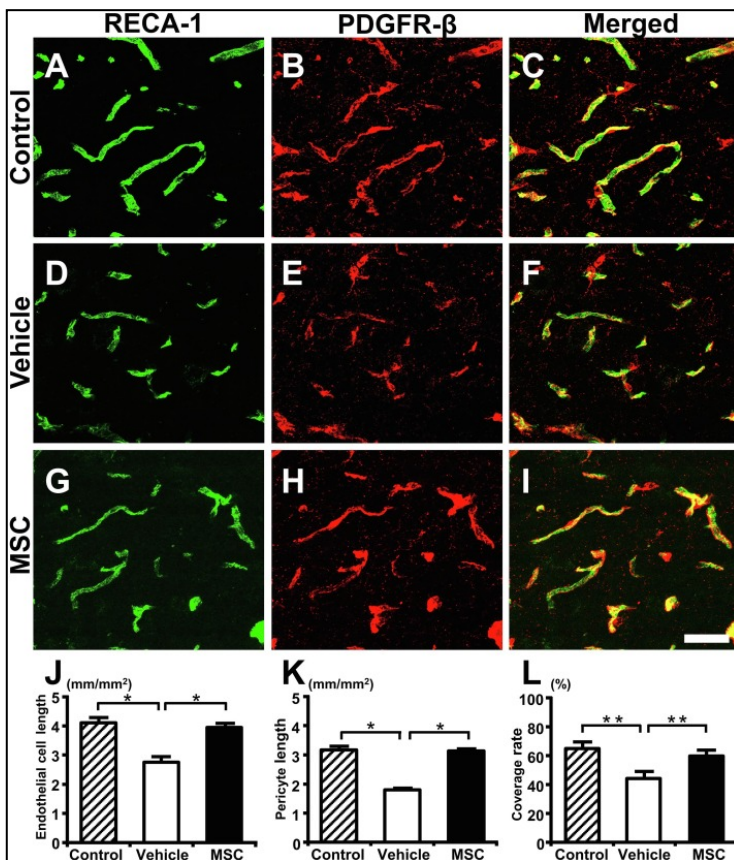
Nissl 染色による脊髄前角の運動神経細胞数を定量解析した結果、MSC 投与 14 日後、MSC 群が Vehicle 群に比べて、脊髄前角の運動神経細胞数の減少を有意に抑制した。

(Magota et al., Brain Res, 2021)



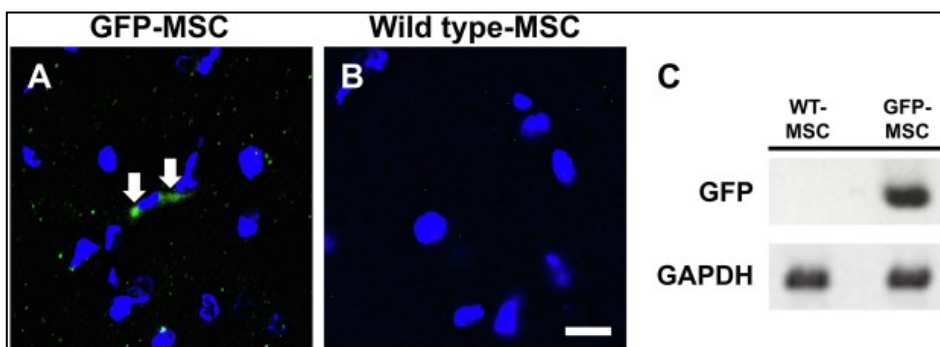
Evans Blue 解析 :

MSC 投与 14 日後に Evans Blue を用いた血液脊髄関門の評価では、MSC 群が Vehicle 群に比べ脊髄灰白質における毛細血管からの EvB の漏出を有意に抑制した。(Magota et al., Brain Res, 2021)

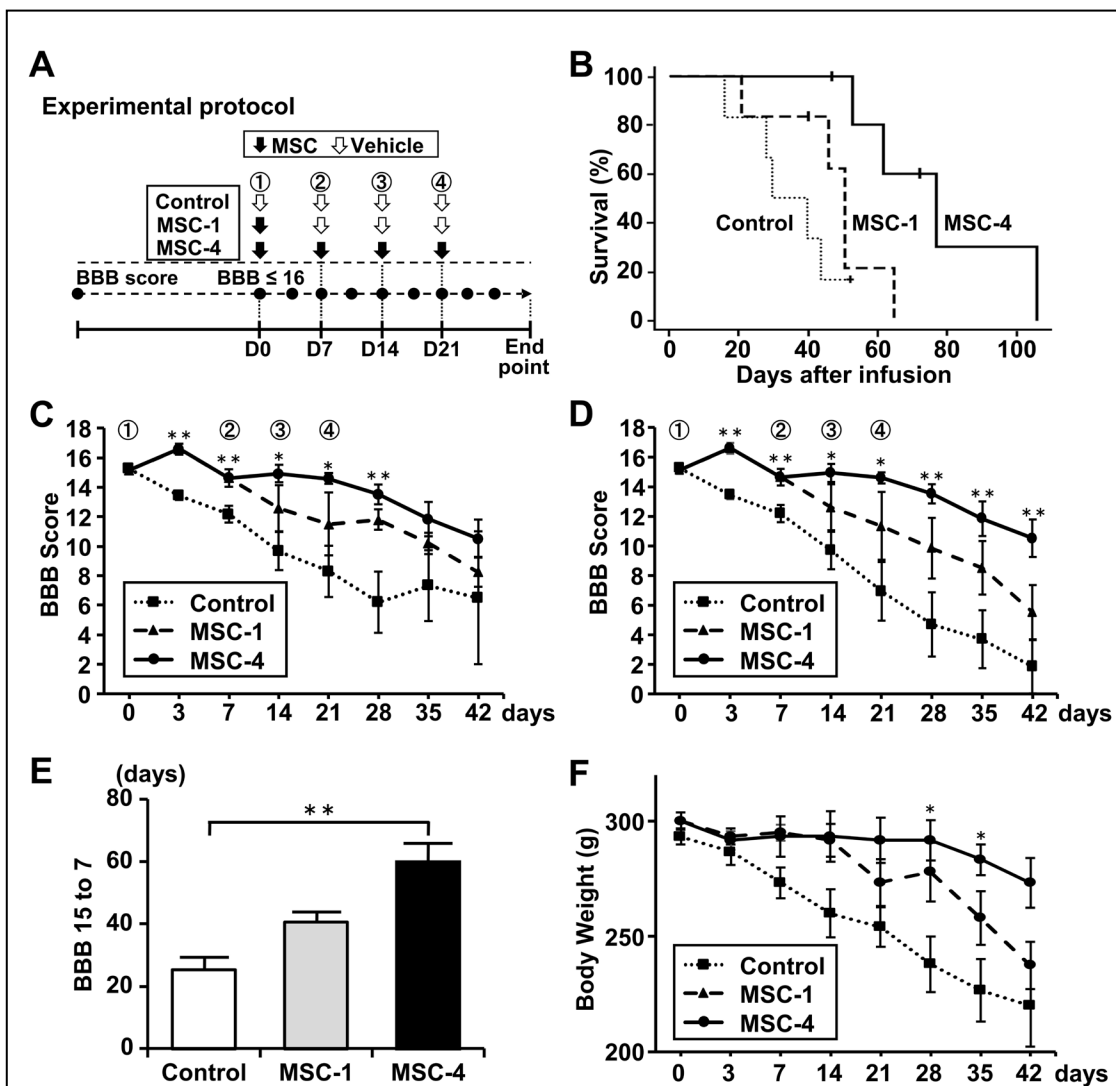
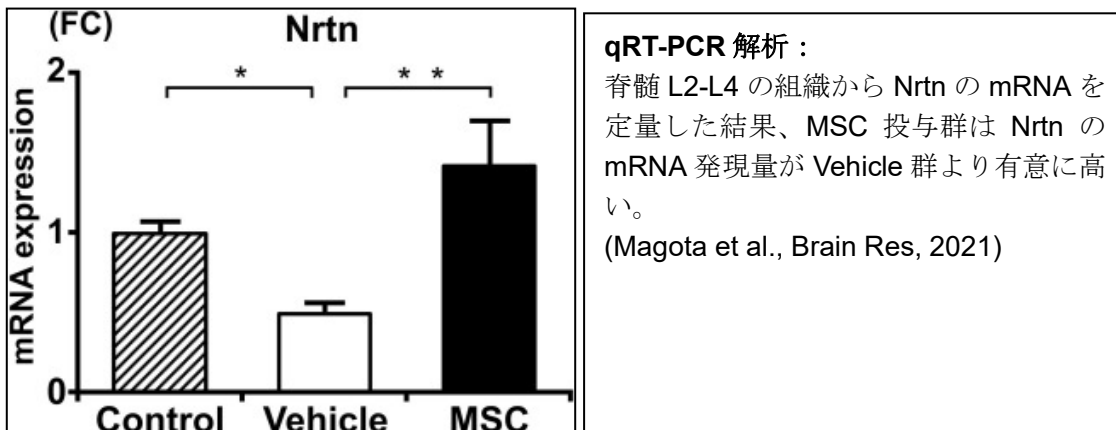


免疫染色学的解析 :

脊髄毛細血管における、血管内皮細胞とペリサイトの長さおよびペリサイト被覆率の比較では、MSC 群が Vehicle 群に比べて、血管内皮細胞およびペリサイトの長さは有意に長く、ペリサイト被覆率が有意に高い。(Magota et al., Brain Res, 2021)



GFP 解析 : GFP-MSC および nested-PCR 法を用いて探索した結果、脊髄 L2-L4 の組織から GFP 陽性細胞と GFP 遺伝子を検出した。(Magota et al., Brain Res, 2021)



(a) MSC複数回投与実験プロトコル。(b) 生存解析では、MSC4回投与群の生存が有意に長いことが示された。(c, d) 運動機能解析 (c: BBB 0を除外; d:BBB 0を含む) において、MSC4回投与群の運動機能の低下が抑制された。(e) BBBスコアが15から7へ低下するために要した日数。(f) 体重の推移。(Magota et al., Mol Brain, 2021)

結論

筋萎縮性側索硬化症モデルラットに対する MSC の経静脈的投与によって運動機能の低下が抑制された。治療メカニズムとして、脊髓運動神経細胞の保護および血液脊髄関門の安定化が関与していると考えられた。さらに、MSC の複数回投与によって、運動機能の低下の抑制に加えて、生存期間の延長が得られた。

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 2件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Magota Hirotooshi, Sasaki Masanori, Kataoka-Sasaki Yuko, Oka Shinichi, Ukai Ryo, Kiyose Ryo, Onodera Rie, Kocsis Jeffery D., Honmou Osamu	4. 巻 1757
2. 論文標題 Intravenous infusion of mesenchymal stem cells delays disease progression in the SOD1G93A transgenic amyotrophic lateral sclerosis rat model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 147296 ~ 147296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2021.147296	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Magota Hirotooshi, Sasaki Masanori, Kataoka-Sasaki Yuko, Oka Shinichi, Ukai Ryo, Kiyose Ryo, Onodera Rie, Kocsis Jeffery D., Honmou Osamu	4. 巻 14
2. 論文標題 Repeated infusion of mesenchymal stem cells maintain the condition to inhibit deteriorated motor function, leading to an extended lifespan in the SOD1G93A rat model of amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-021-00787-6	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	岡 真一 (OKA Shinichi) (70789453)	札幌医科大学・その他部局等・講師 (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	佐々木 優子 (KATAOKA-SASAKI Yuko) (80631142)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	本望 修 (HONMOU Osamu) (90285007)	札幌医科大学・医学部・教授 (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			