

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09483

研究課題名(和文) 脊損に対する骨髄幹細胞治療後の網羅的遺伝子解析による“脳および脊髄の反応”の解明

研究課題名(英文) Therapeutic mechanism following intravenous infusion of MSCs for experimental spinal cord injury

研究代表者

押切 勉(Oshigiri, Tsutomu)

札幌医科大学・医学部・訪問研究員

研究者番号：70754612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、脊髄損傷モデルに対し、骨髄幹細胞を経静脈的に投与することによって、運動機能の回復が得られることを報告してきた。また、運動機能の回復が現れた投与3日目に大脳皮質運動野の遺伝子解析を行った結果、複数の遺伝子の発現量に変化があり、これらの遺伝子の多くは神経再生、plasticityの亢進に關する遺伝子であることを報告した(Oshigiri et al.,2019)。そこで本研究では、先行研究を進展させ、統合的なデータベースを駆使した網羅的遺伝子解析を行い、治療効果の発現に關する遺伝子のプロファイルを解析した。

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始まっている。本研究においては、骨髄幹細胞の経静脈的投与によって治療効果が発揮されるメカニズムを明らかにするために、大脳皮質の網羅的遺伝子解析を行い、骨髄幹細胞治療によって惹起される遺伝子発現の変化を総合的に明らかにすることができた。本研究成果は、骨髄幹細胞の経静脈的投与によって、喪失した神経機能の回復に貢献するメカニズムの解明につながり、次世代の治療法に展開させることが可能となることが期待できるため、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 have previously reported that intravenous administration of MSCs to a spinal cord injury model can restore motor function. We also reported that genetic analysis of the cortical motor cortex on the third day of transplantation, when motor function was restored, revealed changes in the expression levels of several genes, many of which are involved in nerve regeneration and increased plasticity (Oshigiri et al.,2019). Therefore, in this study, we expanded on previous studies and performed a comprehensive genetic analysis using an integrated database to analyze the profile of genes involved in the expression of the therapeutic effect.

研究分野：整形外科、脊椎外科、脊髄損傷

キーワード：脊髄損傷 骨髄間葉系幹細胞 静脈的投与 再生医療 遺伝子解析 脳

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷に対する骨髄間葉系幹細胞(MSC)の経静脈的投与(MSC治療)による機能回復の主な治療メカニズムとして、投与されたMSCによる損傷局所における血液脊髄関門の安定化、損傷軸索の sprouting や、損傷軸索自身の再生、脱髄軸索の再有髄化などが、協奏的に作用することが挙げられる。また、損傷した神経組織に対するMSCの静脈内投与(MSC治療)によって神経の plasticity を賦活化させ、シナプス新生を起こすことが、機能回復に貢献することを見出している(Sasaki et al., 2016; Sakai et al., 2018; Nagahama et al., 2018)。

さらに我々は、先行研究において、脊髄損傷ラットモデルに対するMSC治療を行い、運動機能の回復が現れた投与3日目に大脳皮質運動野の網羅的遺伝子解析を行った結果、複数の遺伝子の発現量に変化があり、これらの遺伝子の多くは神経再生、plasticityの賦活化に関与する可能性がある遺伝子であることを報告した(Oshigiri et al., 2019)。

また、これまでの基礎研究における良好な結果を踏まえて行なった「急性期～亜急性期の脊髄損傷患者を対象とした自家培養MSCによる医師主導治験」(Honmou et al., 2021)、実臨床におけるステミラック注®の使用においても、MSC治療により著明な治療効果が得られることを経験している。

2. 研究の目的

これらの背景から、本研究においては、先行研究を発展させ、大脳皮質から採取したサンプルの網羅的遺伝子解析を行い、MSC治療によって惹起される遺伝子のプロファイルの変化を総合的に解析することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、ラット用脊髄損傷作成装置(IH-0400 Impactor; PSI社製)を用いて、SDラットのTh9に実験的脊髄損傷を作製した(Morita et al., 2016; Oshigiri et al., 2019)。脊髄損傷作製後翌日にラットから採集・培養したMSCを経静脈的に投与し、観察期間終了後まで飼育した。なお、対照群にはMSCなしのVehicleを投与した。

(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) 網羅的遺伝子解析

サンプルからmRNAを抽出し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析(The Clariom™ D/Gene Chip Rat Transcriptome Array (RTA1.0., Affymetrix, Santa Clara, CA: GeneChip® Scanner 3000 7G System, Affymetrix)を行った。

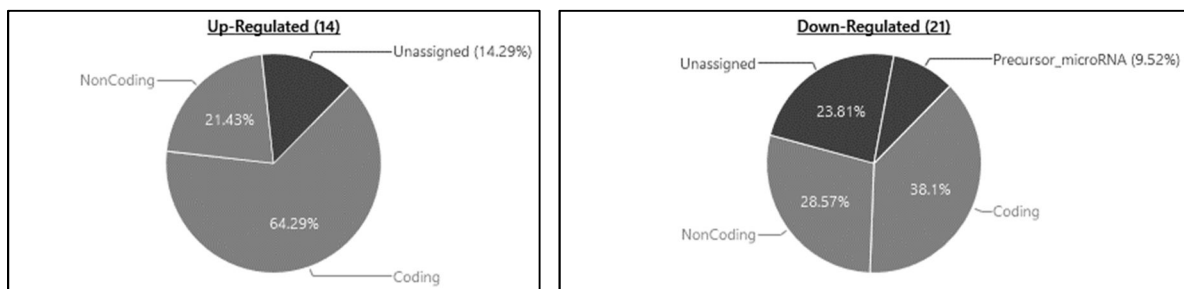
4. 研究成果

(1) 行動学的評価：

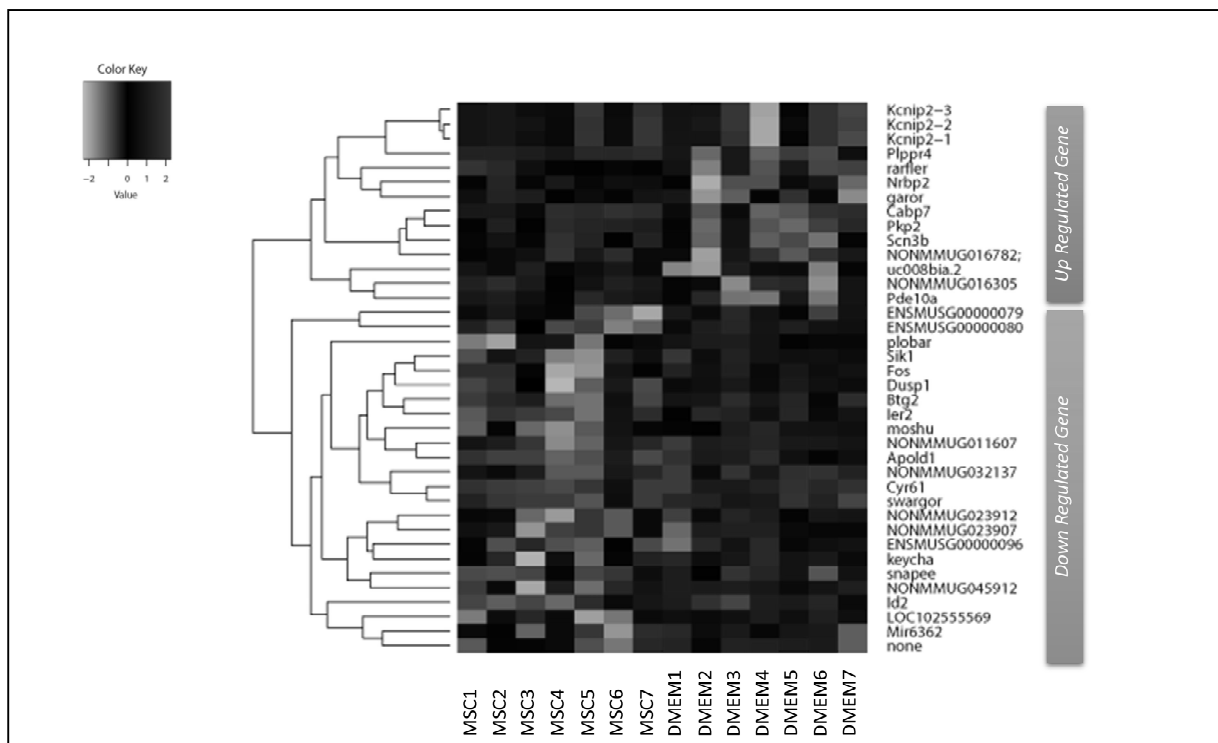
脊髄損傷に対する MSC 治療後の運動機能は MSC 治療群で有意に改善を認めた。この行動学的解析によって有意差のあるサンプルを用いて網羅的遺伝子解析を行った。

(2) 網羅的遺伝子解析：

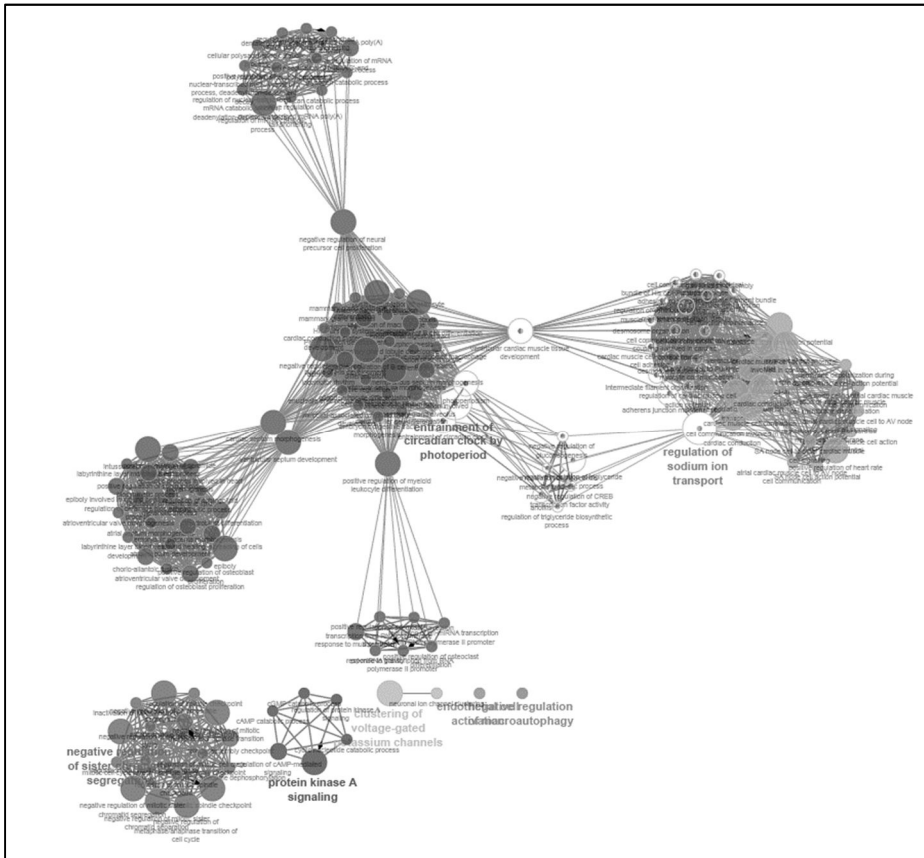
脊髄損傷に対する MSC 治療後の大脳皮質の網羅的遺伝子解析により、vehicle 群と比べて発現量に有意差のあった発現変動遺伝子 (Differentially expressing genes: DEGs)のうち、Up-regulated していた遺伝子(上)および Down-regulated していた遺伝子(下)のプロファイルを示す。DRG として Coding 遺伝子のほか、非 coding 遺伝子、precursor_micro RNA などがあることが判明した。(未発表)



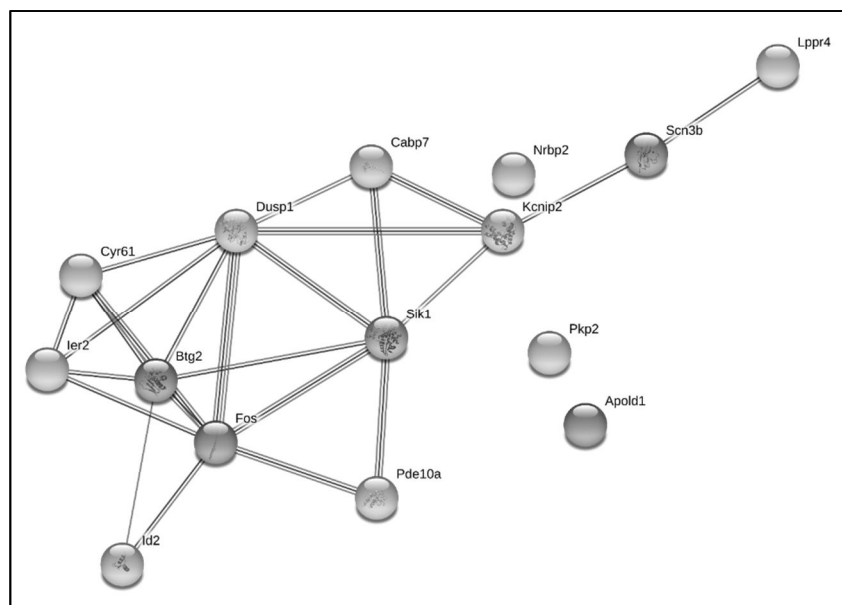
得られた遺伝子の発現を可視化するために、個々の遺伝子の発現値を色と濃淡で表現するヒートマップ解析を行うと、MSC 投与群と vehicle 群との比較において、異なる遺伝子が発現していることがわかる。(未発表)



MSC 治療後の 発現量に差のあった遺伝子 DEG の遺伝子オントロジー解析では (下)、脳の plasticity の賦活化に 関与する 遺伝子群に加えて、神経前駆細胞増殖、ナトリウムイオン輸送の調節などに関する 遺伝子群の発現が認められた。(未発表)



タンパク質間相互作用解析では (下)、 immediate early response を抑制するタンパク質群の発現 profile が特徴的であり、これらが MSC 治療の運動機能の回復に貢献する反応のトリガーとなる可能性が示唆された。(未発表)



以上より、本研究では、脊髄損傷に対する MSC の経静脈的投与後に、行動学的解析で運動機能の改善を認めた個体からサンプルを採取して網羅的遺伝子解析を行った。複数のデータベースを駆使した統合的な遺伝子発現解析により、MSC 治療により plasticity の賦活化に関わり、最終的に運動機能の回復に貢献する遺伝子のプロファイルを明らかにすることができた。今後は、このプロファイルの詳細な解明により、MSC による運動機能の回復メカニズムを駆使して、次世代の治療法の展開につながることを期待できる。従って、本研究の学術的意義は高く、社会的な波及効果も期待できると思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	廣田 亮介 (Hirota Ryosuke) (10815434)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	山下 敏彦 (Yamashita Toshihiko) (70244366)	札幌医科大学・医学部・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)	
研究分担者	佐々木 優子 (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)	
研究分担者	栗原 康太 (Kurihara Kota) (20855803)	札幌医科大学・医学部・研究員 (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	福士 龍之介 (Fukushi Ryunosuke) (00894065)	札幌医科大学・医学部・診療医 (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