

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16554

研究課題名(和文) 新たな神経疾患治療の開発に向けた骨髄間葉系幹細胞治療の免疫修飾機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the immunomodulatory mechanism of bone marrow mesenchymal stem cell therapy for the development of new neurological disease treatments

研究代表者

横川 和樹 (Yokokawa, Kazuki)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：30781273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は骨髄間葉系幹細胞(BMSC)治療のアルツハイマー病(AD)モデルマウスに対する有用性を報告し、ミクログリアにおけるCD14の発現促進を介してアミロイド貪食作用を促進することを示した。今回は治療メカニズムの詳細をさらに検討すること、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症(MS)などのモデルにおいてもBMSC治療を行い、末梢血のリンパ球解析などを通して治療メカニズムを検討することを試みた。BMSC治療によってADモデルマウス脳やIn vitroのミクログリア株細胞においてApoEの発現が促進することを示した。MSモデルとして自己免疫性脳脊髄炎モデル作成を試みたが安定したモデル作成に至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BMSCはGVHD・脊髄損傷・脳梗塞などで臨床使用が開始されており、本学はBMSC治療のノウハウや品質管理・安全性の面で実績がある。神経疾患に関しては筋萎縮性側索硬化症患者への臨床治験も進めている。本研究の成果により神経変性疾患における疾患修飾作用のメカニズムの一つを明らかにし、臨床応用へさらに近づいたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We reported the usefulness of bone marrow mesenchymal stem cell (BMSC) therapy in Alzheimer's disease (AD) model mice, and showed that γ -amyloid phagocytosis was promoted through upregulation of CD14 in microglia. In this study, we aimed to examine the details of the therapeutic mechanism. In addition, we tried BMSC treatment in models such as amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis (MS), and aimed to examine the therapeutic mechanism through peripheral blood lymphocyte analysis. We showed that BMSC treatment promoted ApoE expression in AD model mouse brains and in vitro microglial cell lines. We attempted to create an autoimmune encephalomyelitis model as an MS model, but we were unable to create a stable model.

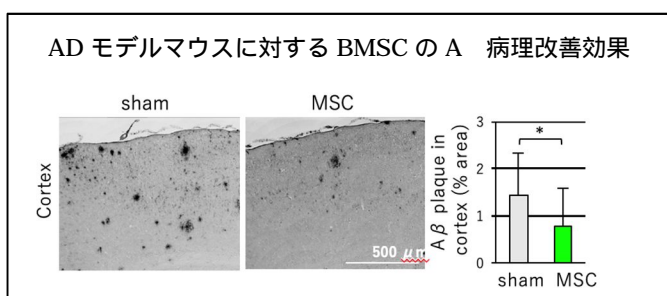
研究分野：脳神経内科

キーワード：間葉系幹細胞 アルツハイマー病 多発性硬化症 アミロイド

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会へ突入してもなお高齢化の加速が止まらない我が国において、脳血管障害や認知症、そして様々な神経難病の患者数は増加し神経疾患治療へのニーズは年々大きくなっている。骨髄間葉系幹細胞(BMSC)の移植治療は脳梗塞や脊髄損傷に対して臨床使用が開始されており、神経変性疾患にも応用が期待されている。しかしその詳細な治療メカニズムの検討は不十分である。我々はBMSC治療のアルツハイマー病(AD)モデルマウスに対する有用性を報告した(下図)。そのメカニズムの一つとして脳内の免疫担当細胞であるミクログリアについてCD14の発現促進を介してアミロイド貪食作用を促進することを示した。また、In vitroのミクログリア系株細胞においてBMSCを処置するとApoEならびにCD14の遺伝子発現や蛋白量が増加することを明らかにした(未発表データ)。

また、移植されたBMSCは脳内への生着を認めなかったことから脳外での治療メカニズムの関与も十分考えられる。BMSCは免疫調整作用を有することから、神経疾患への治療効果を発揮する鍵となるメカニズムとして全身の免疫系への作用が重要であるとの仮説を立てた。本学ではBMSC治療の設備や安全性が確立していることから、本研究の成果によりBMSCの治療メカニズムを明らかにすることができれば、広く神経疾患や神経免疫疾患への応用実現性が広がる。



2. 研究の目的

BMSCによるApoEやCD14の発現促進作用についてIn vivoでも同様の治療メカニズムが関与することを確認するため、BMSC移植後のAPdE9マウス脳内のApoEの遺伝子発現レベルや蛋白量を検討することを目的とした。

AD、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、多発性硬化症(MS)などといった各種疾患の動物モデルにおいてBMSC治療を行い、末梢血のリンパ球サブセットの解析を通してその治療効果のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ADの動物モデルとして、家族性ADの変異型APP遺伝子、変異型プレセニン1遺伝子を導入したAPdE9マウスを用いる。ラット骨髄から分離培養したBMSCを7.5ヶ月齢のAPdE9マウスに尾静脈から移植し、9ヶ月齢にてAPdE9マウスを犠牲させる。マウスの末梢血を採取し、Tリンパ球ならびにBリンパ球のサブセットをフローサイトメトリー法で解析する。マウスのリンパ節と肺を採取し、免疫染色の手法を用いてリンパ球の動態、あるいは肺泡マクロファージの動態を観察する。仮に治療の有無によってリンパ球動態に変化を認めるようであれば特定のリンパ球系細胞とBMSCの共培養系、あるいはBMSCの培養上清を処置することでリンパ球系細胞の遺伝子発現の変化をRT-PCR法で解析する、上清中のサイトカイン量をELISA法で解析する、あるいは細胞表面マーカーの解析により細胞分化の様子を解析する。

筋萎縮性側索硬化症モデル動物としてG93A変異SOD1遺伝子組換えマウスをJackson Laboratory社から購入しBMSC治療介入を試みる。また、多発性硬化症のモデルとして広く使われる実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルに対してもBMSCの治療介入を試みる。BMSC治療を加える群とSham処置群とに分けBMSC治療効果について検討する。各種行動学的評価や死亡率、後遺障害について検討する。また、病理組織学的評価として脊髄サンプルの免疫組織学的検討を行う。いずれの動物モデルにおいても、病巣におけるミクログリアの動態について免疫組織学的検討を行う。また、末梢血におけるTリンパ球ならびにBリンパ球のサブセット、リンパ節や肺などの臓器におけるリンパ球など免疫担当細胞の動態を検索する。

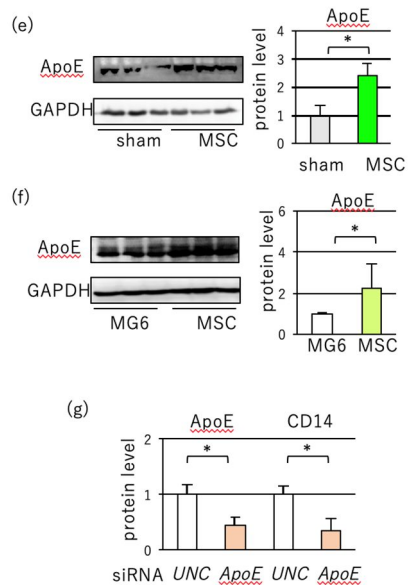
4. 研究成果

BMSC治療をおこなったAPdE9マウス脳ホモジネートのウエスタンブロット法の解析によって、脳内のApoE蛋白量が上昇していることを示した。In vitroのミクログリア系株細胞においてBMSCを処置するとApoEならびにCD14の遺伝子発現や蛋白量が増加することを明らかにし

た(未発表データ、下図)。以上より、BMSCによるAD病理改善効果にはミクログリアにおけるApoEやCD14の発現促進作用が深く関わっていることが示唆された。

多発性硬化症(MS)モデルに対するBMSC治療効果を検索するべくまずは自己免疫性脳脊髄炎モデルの作成に着手したが、研究期間内に安定した臨床症状を呈するモデル動物を確立することができなかった。

BMSCがCD14の発現を増加させる効果にはApoEが関与する(未発表データ)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kazuki Yokokawa, Naotoshi Iwahara, Shin Hisahara, Taro Saito, Hiromi Suzuki, Takashi Matsushita, Akihiro Matsumura, Syuuichirou Suzuki, Shun Shimohama.
2. 発表標題 Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Improves A-beta Pathology by Modifying Microglial Function.
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会.
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------