

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2022
課題番号：21K15618
研究課題名(和文)3D共培養における臍帯由来細胞の傷害ニューロン・ミクログリアへの遊走と被覆保護

研究課題名(英文)Migration of umbilical cord-derived cells to injured neurons and microglia in 3D co-culture

研究代表者
向井 丈雄(Mukai, Takeo)
東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60871324
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)：マウス由来のミクログリアを培養し、LPSによる活性化型ミクログリアモデルを採用した。Lentivirus vectorを用いてGFP遺伝子を導入した数ロットの臍帯由来間葉系細胞(UC-MSC)と共培養を行った。生細胞タイムラプスイメージング装置により24時間共培養の観察、動線の追跡を行った。UC-MSCの動線に関しては有意ではなく、活性化型ミクログリアと単層培養で被覆する様子が観察された。ミクログリアの傷害に関して低分子蛍光色素JC-1を用いて、ミトコンドリアの膜電位によるJC-1の集積を測定した。それにより脱分極を観察したがUC-MSC共培養群とコントロールで有意差はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でUC-MSCが活性化型ミクログリアに遊走し被覆することが示され、以前我々が証明したUC-MSCの活性化型ミクログリアの静止型ミクログリアへの特性変化に加え、UC-MSCの被覆保護作用が示唆された。ミトコンドリアの脱分極に関してはUC-MSCとの共培養でも変化がみられず、更なる実験系の最適化が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We cultured mouse-derived microglia and adopted an activated microglia model by LPS. They were co-cultured with several lots of umbilical cord-derived mesenchymal cells (UC-MSC) transfected with the GFP gene using a lentivirus vector. Observation of the co-culture for 24 hours and tracking of movement lines were performed using a live-cell time-lapse imaging device. The UC-MSC movement line was not significant, and it was observed that they were covered with activated microglia and monolayer culture. Using the small fluorescent dye JC-1 for microglial injury, we measured the accumulation of JC-1 by the mitochondrial membrane potential. Depolarization was observed, but no significant difference was observed between the UC-MSC co-culture group and the control.

研究分野：新生児学

キーワード：臍帯由来間葉系細胞 ミクログリア アクチンダイナミクス ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

間葉系細胞 (Mesenchymal stem/stromal cell : MSC) は、骨髄中に存在する骨形成能を持つ細胞として 1966 年に報告され、1991 年に Caplan らに MSC と名付けられて以降、体性幹細胞として近年広く研究が行われており、再生医療のための細胞製剤として注目されている。

MSC には多分化能の他に、hepatocyte growth factor (HGF)、brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、glial-derived neurotrophic factor、basic fibroblast growth factor (bFGF) など様々な液性因子を分泌することによる組織修復能や、HLA-DR の発現がなく indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)、PGE2、HLA-G5 などの因子を分泌することによる免疫調節能を有すると報告されている。これら MSC の特性である組織修復能と免疫調節能は再生医療において非常に注目されており、「組織傷害と炎症反応を伴う病態」に対して MSC は非常に良い治療薬となり得るため、実際に MSC の脳神経系障害に対する臨床研究が既に数多く行われている (2020 年 9 月現在、MSC を用いた臨床研究 1044 件中 ; 脊髄損傷 32 件、神経変性疾患 52 件、脳性麻痺 8 件 clinicaltrials.gov)。

MSC のソースとして、成人ソースには骨髄、脂肪、軟骨など、胎児組織ソースとしては臍帯、臍帯血、胎盤などがあるが、特に臍帯由来 MSC は、資源である臍帯が臍帯血同様医療廃棄物として廃棄されてきたものであり、ドナーへの肉体的侵襲を伴わず、倫理的問題も少ない ; 出産に伴うため資源が豊富であり、臍帯血に比して採取・保管・輸送が簡易である ; 胎盤と違い母体因子の混入がない ; 十分な免疫抑制能を兼ね備えながら低抗原性である、などの理由から申請者は臍帯由来 MSC (UC-MSC) に注目した。

神経系障害に対する UC-MSC の働きとして、投与した UC-MSC が神経系細胞に分化するという報告がある一方 (Leite C et al. PLoS One. 30;9(10):e111059. 2014) 申請者は UC-MSC が神経栄養因子を分泌することで神経保護効果を発揮することを報告したが (Mukai et al. Neuroscience. 355:175-187, 2017) 「保護」を最も端的に示す現象と考える「MSC が傷害された神経細胞まで遊走し、傷害因子から保護しようと神経細胞を被覆してその生存に寄与しているかどうか」はまだ報告されておらず、その解明には基礎研究が必須であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では「マウスのニューロン及びミクログリア初代培養傷害モデルを用いた UC-MSC の遊走能と被覆保護 (Injured cells covering) の検討」を行うことを目的とした。

マウスのニューロン、ミクログリアは細胞株ではなく初代培養を用いることで細胞株を用いるよりも生体に近いモデルを作成するとともに、傷害方法として脳梗塞 (低酸素虚血) を再現するため oxygen-glucose deprivation (OGD) による傷害モデルを作成する。また、一般的な共培養は単層で行われているが本研究では単層培養に加えコラーゲンゲルを用いた 3 次元共培養による 3D 構築解析を用いることで、より遊走・被覆保護が理解しやすいモデル作成を目指す。また生細胞タイムラプスイメージング装置により 24 時間観察することで UC-MSC の遊走を動線として追跡する。

現在数多く行われている脳神経系障害に対する MSC を用いた臨床研究の多くは MSC を髄注 (Intrathecal; IT) もしくは静注 (Intravenous; IV) で投与しているが、IV では投与した MSC の多くは肺でトラップされ、また血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) を通過できずに主に液性因子による paracrine effect を期待することとなる。本研究で MSC の Injured cells covering が傷害細胞の生存に重要であると解明された場合は、より IT の方が血液脳関門を介さずに傷害細胞付近まで MSC を到達させることができる可能性がある意味で非常に有用な基礎研究であると考えた。

3. 研究の方法

マウス由来のニューロンとミクログリアを MACS により磁気分離した後、単層あるいはハイドロゲル内で培養する。単層培養とゲル内 3 次元培養で OGD による傷害程度が異なることが予想されるため、OGD 時間について 1 時間 ~ 6 時間程で最適時間の同定を行う。

Lentivirus vector を用いて数ロットの UC-MSC へ GFP 遺伝子を導入する。

OGD による傷害が確認された後、UC-MSC と液体培地あるいはハイドロゲル培地で接触系の共培養を行う (右図はトランスウェルを用いた非接触系の共培養)。

生細胞タイムラプスイメージング装置により 24 時間共培養の観察、動線の追跡を行う。ニューロン、ミクログリアを MAP2、Iba1 でそれぞれ染色して位相差顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡により観察する。また、UC-MSC を GFP で検出する。

傷害ミクログリアの形態変化とともにミトコンドリア脱分極の程度を、UC-MSC 共培養の有無で比較検討する

4. 研究成果

マウス由来のニューロンとミクログリアを培養し、OGD による傷害を作成しようとしたが傷害の

程度が一定せず再現性に乏しいため、LPS による活性化型ミクログリアモデルを採用することとした。Lentivirus vector を用いて GFP 遺伝子を導入した数ロットの臍帯由来間葉系細胞 (UC-MSC) と共培養を行った。生細胞タイムラプスイメージング装置により 24 時間共培養の観察、動線の追跡を行った。UC-MSC の動線に関しては傷害の有無で有意ではなく、活性化型ミクログリアと単層培養で被覆する様子が観察された。ミクログリアの活性化に関して脱分極を観察したが、LPS により脱分極は常に認められ、LPS 活性化後の UC-MSC 共培養群とコントロールで有意差はみられなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Masahiro Tsuji, Takeo Mukai, Yoshiaki Sato, Yasue Azuma, Saki Yamamoto, Florence Cayetanot, Laurence Bodineau, Atsuto Onoda, Tokiko Nagamura-Inoue, Jacques-Olivier Coq	4. 巻 1
2. 論文標題 Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cell therapy to prevent the development of neurodevelopmental disorders related to low birth weight.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 3841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-30817-3	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 Makoto Nabetani, Takeo Mukai, Haruo Shintaku	4. 巻 39
2. 論文標題 Preventing Brain Damage from Hypoxic Ischemic Encephalopathy in Neonates: Update on Mesenchymal Stromal Cells and Umbilical Cord Blood Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American journal of perinatology	6. 最初と最後の頁 1754-1763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0041-1726451	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 Takeo Mukai, Kenshi Sei, Tokiko Nagamura-Inoue	4. 巻 21
2. 論文標題 Mesenchymal stromal cells: cell-based therapies for traumatic central nervous system injuries	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of integrative neuroscienc	6. 最初と最後の頁 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31083/j.jin2102044	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 Masahiro Tsuji, Takeo Mukai, Yoshiaki Sato, Yasue Azuma, Saki Yamamoto, Florence Cayetanot, Laurence Bodineau, Atsuto Onoda, Tokiko Nagamura-Inoue, Jacques-Olivier Coq	4. 巻 13
2. 論文標題 Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cell therapy to prevent the development of neurodevelopmental disorders related to low birth weight	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 3841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-30817-3	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 Makoto Nabetani , Takeo Mukai , Akihiko Taguchi	4. 巻 32
2. 論文標題 Cell Therapies for Autism Spectrum Disorder Based on New Pathophysiology: A Review	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell transplantation	6. 最初と最後の頁 9.6369E+13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0963689723116321	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 Mukai T, Sei K, Nagamura-Inoue T.	4. 巻 18
2. 論文標題 Mesenchymal stromal cells: cell-based therapies for traumatic central nervous system injuries	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Integr Neurosci	6. 最初と最後の頁 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31083/j.jin2102044	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 Shitara Y, Kakiuchi S, Mukai T, Kashima K, Kato M, Takahashi N.	4. 巻 9
2. 論文標題 Case Report: Treatment of Extremely Preterm Infants With Birthweight Below 300 g: Case Series	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Pediatr	6. 最初と最後の頁 758683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fped.2021.758683	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 He H, Takahashi A, Mukai T, Hori A, Narita M, Tojo A, Yang T, Nagamura-Inoue T.	4. 巻 12
2. 論文標題 The Immunomodulatory Effect of Triptolide on Mesenchymal Stromal Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 686356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.686356	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 Mukai T, Sei K, Nagamura-Inoue T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Mesenchymal Stromal Cells Perspective: New Potential Therapeutic for the Treatment of Neurological Diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13081159	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 Nabetani M, Mukai T, Shintaku H.	4. 巻 1
2. 論文標題 Preventing Brain Damage from Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in Neonates: Update on Mesenchymal Stromal Cells and Umbilical Cord Blood Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Perinatol	6. 最初と最後の頁 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0041-1726451	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 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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