

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861289

研究課題名(和文) 骨髄間葉系幹細胞の頭部外傷性高次脳機能障害に対する治療改善機構の解析

研究課題名(英文) Analysis for therapeutic effects of mesenchymal stem/progenitor cells on neuropsychological disorder after traumatic brain injury.

研究代表者

渡邊 潤 (Watanabe, Jun)

昭和大学・遺伝子組換え実験室・助教

研究者番号：50649069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄間葉系幹細胞(MSCs)とその分泌タンパク質、TNF-alpha stimulated gene/protein 6 (TSG-6)の投与により脳外傷モデルマウスの外傷性脳損傷と高次脳機能障害に改善がみられることが明らかとなった。さらに、この時血液脳関門の破綻が抑制されていた。MSCはアストロサイトの活性化を介して血液脳関門の破綻を抑制している可能性が示唆された。またTSG-6の投与により新生神経細胞の増加が起きることが明らかとなった。この研究成果によりMSC及びTSG-6が新たな頭部外傷の治療方法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Traumatic brain injury (TBI) causes multiple long-term defects including a loss of working memory that is frequently incapacitating. Administrations of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) previously produced beneficial effects in models of TBI as well as other disease models. In several models, the beneficial effects were explained by the MSCs being activated to express TSG-6. In a mouse model of TBI, we found the intravenous human MSCs or TSG-6 decreased the blood brain barrier leakage. In this time, the expression of GFAP was significantly increased. Administration of TSG-6 also decreased the lesion size at 2 weeks. Importantly, the acute administration of TSG-6 within 24 h of TBI was followed 6 to 10 weeks later by improvements in memory, depressive-like behavior and the number of newly born-neurons. The data suggested that acute administration of TSG-6 may be an effective therapy for decreasing some of the long-term consequences of TBI.

研究分野：神経組織学・神経発生学

キーワード：頭部外傷 骨髄由来間葉系幹細胞 高次脳機能障害

1. 研究開始当初の背景

頭部外傷は交通事故や高所からの落下などにより引き起こされる神経外傷性疾患であり、急性期の死亡や全身性機能不全を免れても、慢性期に認知障害や情緒障害のため社会適応障害(高次脳機能障害)が顕著となる症例が多く報告されている。リハビリテーション訓練に一部効果があることは示されているものの根本的な治療法は確立されていないのが現状である。

骨髄間葉系幹細胞(MSCs)は骨髄由来の間葉系幹細胞の総称で、患者やボランティアより容易に得ることができる。MSCsの移植は中枢神経系疾患に対する新規治療法として、脳梗塞、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などに効果があることが報告されている。我々はヒト由来MSCs(hMSCs)を移植した脳虚血、心筋梗塞および肺炎のヒト遺伝子の網羅的解析からTNF- α -stimulated gene/protein 6(TSG-6)という共通のタンパク質の増加を見出し、hMSCs由来TSG-6の心筋梗塞や角膜障害への回復効果を明らかにした。これらの結果はMSCsおよびTSG-6が脳外傷に対しても画期的な治療法となる可能性を示している。しかし、その効果・作用機序は不明であり、臨床応用には適正投与時期、濃度、経路の解明を含めた多くの課題が残されている。

2. 研究の目的

骨髄間葉系幹細胞(MSCs)とその分泌タンパク質、TNF- α -stimulated gene/protein 6(TSG-6)が脳外傷モデルマウスの外傷性脳損傷を抑制するかどうか、さらには高次脳機能障害が改善されるかを解析する。また詳細な機序の解明を行う。

3. 研究の方法

- ①MSCの外傷性脳損傷抑制効果の検討
頭部外傷モデルマウスを作成後、MSCおよびTSG-6を投与し、組織学的に外傷性脳損傷抑制効果を測定する。
- ②MSCの高次脳機能障害改善効果の検討
頭部外傷モデルマウスを作成後、MSCおよびTSG-6を投与し、行動学的に認知・学習機能および情動の変化について解析する。
- ③MSC及びTSG-6の頭部外傷改善効果の機序の解析
頭部外傷モデルマウスを作成後、MSCおよびTSG-6を投与し、血液脳関門破綻、神経新生について分子生物学的、組織学的に検討する。

4. 研究成果

①MSC及びTSG-6投与は外傷性脳損傷を抑制する。
MSC及びTSG-6を頭部外傷6時間後、もしくは6時間と24時間後に連続投与したところ、外傷性脳損傷が抑制されることが明らかとなった。(図1)

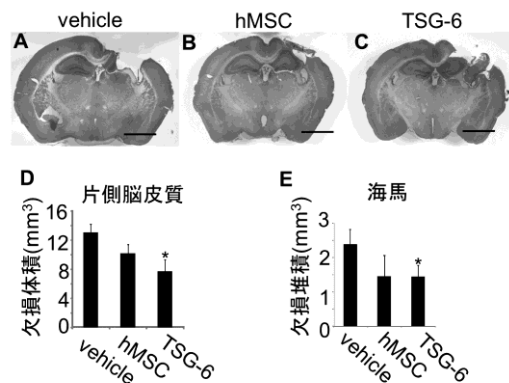


図1.hMSC、TSG-6の神経保護作用

②TSG-6投与は外傷後記憶学習障害及びうつ様行動を抑制する。

TSG-6を頭部外傷6時間と24時間後に連続投与し、モリス水迷路試験と新規餌への食餌行動抑制試験を行ったところ記憶学習障害とうつ様行動が改善していた。(図2)

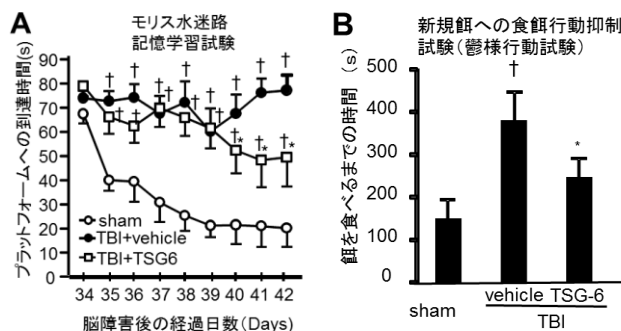


図2.TSG-6の記憶障害、鬱様行動の改善効果

③MSC及びTSG-6投与は血液脳関門の破綻を抑制する。

MSC及びTSG-6を頭部外傷6時間後、もしくは6時間と24時間後に連続投与し、血液脳関門の破綻をEvans Blueを用いて検討したところ、コントロール群に比べて有意に抑制されていることが明らかとなった(図3)。

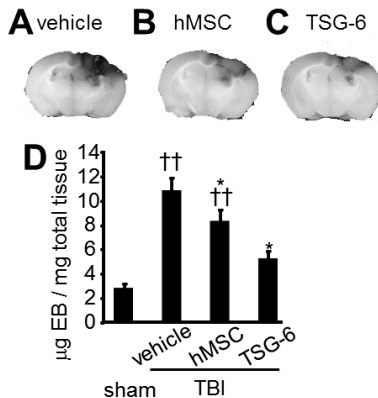


図3.hMSC、TSG-6の血液脳関門の保護効果

さらに MSC を投与したときにはアストロサイトのマーカーである GFAP の顕著な発現増加が確認された。(図 4)

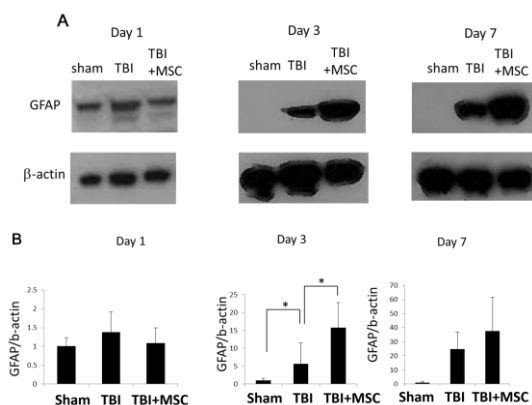


図 4. hMSC 投与による GFAP 発現上昇

培養アストロサイトに Scratch Wound モデルを作成し、hMSCs と共培養したところ顕著な傷修復作用が確認された(図 5)。以上の結果により hMSC はアストロサイトの活性化を通して血液脳関門の破綻を抑制していることが示唆された。

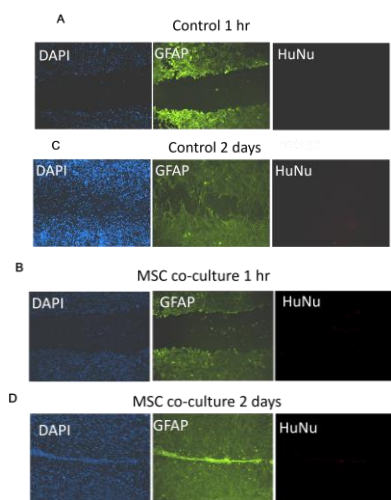


図 5. アストロサイト Scratch Wound モデルにおける hMSC との共培養の効果

④TSG-6 投与は神経新生を促進する。TSG-6 を頭部外傷 6 時間と 24 時間後に連続投与した後に新生神経細胞の数を Doublecortin 陽性細胞を指標として測定したところ、有意に増加していることが明らかとなった。(図 6)

以上の本研究の結果により MSC 及びその分泌タンパク質 TSG-6 は頭部外傷後の神経障害を血液脳関門の破綻抑制と神経新生の促進により改善していることが明らかとなった。

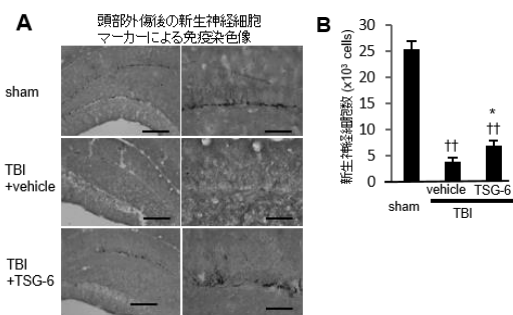


図 6. TSG-6 の神経新生促進作用

TSG-6 は新生神経細胞のマーカーである doublecortin 陽性細胞数を増加させる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Sasaki S, Watanabe J, Ohtaki H, Matsumoto M, Murai N, Nakamachi T, Hannibal J, Fahrenkrug J, Hashimoto H, Watanabe H, Sueki H, Honda K, Miyazaki A, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes eccrine gland sweat secretion. *Br J Dermatol*. 2017. 査読有. 176(2):413-422. doi: 10.1111/bjd.14885.
2. Arata S, Watanabe J, Maeda M, Yamamoto M, Matsuhashi H, Mochizuki M, Kagami N, Honda K, Inagaki M. Continuous intake of the Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) aqueous extract suppresses cancer progression and maintains body temperature in mice. *Heliyon*. 2016. 査読有. 2(5):e00111. doi: 10.1016/j.heliyon.2016.e00111. eCollection 2016 May.
3. Kim DK, Choi H, Nishida H, Oh JY, Gregory C, Lee RH, Yu JM, Watanabe J, An SY, Bartosh TJ, Prockop DJ. Scalable Production of a Multifunctional Protein (TSG-6) That Aggregates with Itself and the CHO Cells That Synthesize It. *PLoS One*. 2016. 査読有. 21;11(1):e0147553. doi: 10.1371/journal.pone.0147553. eCollection 2016.

4. Matsumoto M, Nakamachi T, **Watanabe J**, Sugiyama K, Ohtaki H, Murai N, Sasaki S, Xu Z, Hashimoto H, Seki T, Miyazaki A, Shioda S. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Is Involved in Adult Mouse Hippocampal Neurogenesis After Stroke. *J Mol Neurosci*. 2016. 査読有 . 59(2):270-9. doi: 10.1007/s12031-016-0731-x.
5. Xu Z, Ohtaki H, **Watanabe J**, Miyamoto K, Murai N, Sasaki S, Matsumoto M, Hashimoto H, Hiraizumi Y, Numazawa S, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) contributes to the proliferation of hematopoietic progenitor cells in murine bone marrow via PACAP-specific receptor. *Sci Rep*. 2016. 査読有 . 6:22373. doi: 10.1038/srep22373.
6. **Watanabe J**, Matsumoto M, Kageyama H, Murai N, Sasaki S, Hirako S, Wada N, Arata S, Shioda S. Ghrelin suppresses proliferation of fetal neural progenitor cells, and induces their differentiation into neurons. *Peptides*. 2015. 査読有 . 69:40-6. doi: 10.1016/j.peptides.2015.03.014.
7. Karki P, Kurihara T, Nakamachi T, **Watanabe J**, Asada T, Oyoshi T, Shioda, S. Yoshimura, M. Arita, K. Miyata, A. Attenuation of inflammatory and neuropathic pain behaviors in mice through activation of free fatty acid receptor GPR40. *Mol Pain*. 2015. 査読有 . 11(1):3. doi: 10.1186/s12990-015-0003-8.
8. Tsumuraya T, Ohtaki H, Song D, Sato A, **Watanabe J**, Hiraizumi Y, Nakamachi T, Xu Z, Dohi K, Hashimoto H, Atsumi T, Shioda S. Human mesenchymal stem/stromal cells suppress spinal inflammation in mice with contribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *J Neuroinflammation*. 2015. 査読有 . 12(1):252. doi: 10.1186/s12974-015-0252-5.
9. Miyamoto K, Tsumuraya T, Ohtaki H, Dohi K, Satoh K, Xu Z, Tanaka, S. Murai, N. **Watanabe, J**. Sugiyama, K. Aruga, T. Shioda, S. PACAP38 suppresses cortical damage in mice with traumatic brain injury by enhancing antioxidant activity. *J Mol Neurosci*. 2014. 査読有 . 54 (3):370-9. doi: 10.1007/s12031-014-0309-4.
10. Nakamachi T, Sugiyama K, **Watanabe J**, Imai N, Kagami N, Hori M, Arata, S. Shioda, S. Comparison of expression and proliferative effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptors on human astrocytoma cell lines. *J Mol Neurosci*. 2014. 査読有 . 54 (3):388-94. doi: 10.1007/s12031-014-0362-z.
11. Tsuchida M, Nakamachi T, Sugiyama K, Tsuchikawa D, **Watanabe J**, Hori M, Yoshikawa, A. Imai, N. Kagami, N. Matkovits, A. Atsumi, T. Shioda, S. PACAP stimulates functional recovery after spinal cord injury through axonal regeneration. *J Mol Neurosci*. 2014. 査読有 . 54 (3):380-7. doi: 10.1007/s12031-014-0338-z.
12. **Watanabe J**, Nakamachi T, Ohtaki H, Naganuma A, Shioda S, Nakajo S. Low Dose of Methylmercury (MeHg) Exposure Induces Caspase mediated-Apoptosis in Cultured Neural Progenitor Cells. *J Toxicol Sci*. 2013. 査読有 . 38(6):931-5.
13. **Watanabe J**, Shetty AK, Hattiangady B, Kim DK, Foraker JE, Nishida H, Prockop DJ. Administration of TSG-6 improves memory after traumatic brain injury in mice. *Neurobiology of Disease*. 2013. 査読有 . 59:86-99. doi: 10.1016/j.nbd.2013.06.017.

[学会発表] (計 11 件)

1. **渡邊潤**, 大滝博和, 矢倉一道, 本田一穂, 荒田悟. 骨髄間葉系幹細胞 (MSCs) は頭部外傷モデルマウスの血液脳関門破綻を抑制する. 第 122 回 日本解剖学会総会・全国学術集会. 2017/3/28-2017/3/30. 長崎
 2. **渡邊潤**, 佐々木駿, 中町智哉, 大滝博和, 荒田悟, 本田一穂, 塩田清二. エクリン汗腺における PACAP の汗分泌促進作用. 第 13 回 GPCR 研究会. 2016/5/13-2016/5/14. 東京
 3. **渡邊潤**, 大滝博和, 荒田悟, 本田一穂, 塩田清二. PACAP による神経幹細胞のラジアルグリアへの分化誘導作用. 第 121 回 日本解剖学会総会・全国学術集会. 2016/3/28-2016/3/30. 福島
 4. **Watanabe J**, Ohtaki H, Nakamachi T, Matsumoto M, Sasaki S, Murai M, Arata S, Shioda S. Crucial role of PACAP in neural progenitor cells during development and after degeneration. *Neuropeptides* 2015. 2015/9/28-2015/10/1. Aberdeen, UK. 招待講演
 5. **Watanabe J**, Ohtaki H, Nakamachi T, Sasaki S, Matsumoto M, Murai N, Seki T, Arata S, Shioda S. Involvement of PACAP in differentiation of neural progenitor cells via radial glia. 12th International Symposium in VIP, PACAP and Related Peptides. 2015/9/21-2015/9/26. Cappadokia, Turkey
 6. **渡邊潤**, 影山晴秋, 大滝博和, 松本皆子, 佐々木駿, 村井謙允, 荒田悟, 塩田清二. 神経前駆細胞に対するグレリンの作用の解析. 第 12 回 GPCR 研究会. 2015/5/15-2015/5/16. 東京
 7. **Watanabe J**, Ohtaki H, Xu Z, Matsumoto M, Sasaki S, Arata S, Shioda S. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by MSCs reduces neural damage and improves memory defects after traumatic brain injury in mice. 第 120 回 日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回 日本生理学会大会 合同大会. 2015/3/21-2015-3/23. 神戸
 8. **Watanabe J**, Ohtaki H, Nakamachi T, Xu Z, Sugiyama K, Sasaki S, Arata S, Shioda S. PACAP induces differentiation of neural progenitor cells into glial lineage in cerebral cortex development. 44th Annual meeting Society for Neuroscience. 2014/11/15-19. Washington, DC, USA
 9. **Watanabe J**, Ohtaki H, Nakamachi T, Xu Z, Murai N, Matsumoto M, Sasaki S, Arata S, Shioda S. PACAP plays a crucial role in differentiation of neural progenitor cells into glial lineage. 20th International Symposium on Regulatory Peptides (REGPEP2014). 2014/9/7-2014/9/10. Kyoto
 10. **渡邊潤**, 大滝博和, Darwin J. Prockop, 塩田清二. 頭部外傷モデルマウスにおける MRI を用いた神経障害の解析. 第 119 回 日本解剖学会総会・全国学術集会. 2014/3/27-2014/3/29. 栃木
 11. **渡邊潤**, 塩田清二, Darwin J. Prockop. 頭部外傷モデルマウスの記憶障害に対する、骨髄間葉系幹細胞 (MSCs) 由来タンパク質 TSG-6 の改善効果の検討. 日本解剖学会関東支部第 101 回学術集会. 2013/11/30. 東京
- [図書] (計 3 件)
1. **Watanabe J**, Seki T, Shioda S. PACAP and neural development. In: Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide-PACAP, (Eds.Regiodi D and Tamas A). Springer Nature (New York). 2016. 65-82.
 2. **Watanabe J**. Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research. Chapter 18E. Vasoactive

intestinal peptide. Chapter 18F. Peptide histidine isoleucine/methionine. Elsevier. 2015 Sep 15; 150-154.

3. 大滝博和, 渡邊潤, 塩田清二. 最新臨床脳卒中学 (上) —最新の診断と治療—. V.2.(2) 4)TNF- α . 日本臨床社. 2014 Jul; 240-245.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : Treatment of brain injury or trauma with tsg-6 protein

発明者 : Darwin J. Prockop, Dong-Ki Kim, Jun Watanabe, Ashok SHETTY, Bharathi HATTIANGADY, Jessica FORAKER, Barry Berkowitz

権利者 : Darwin J. Prockop, Dong-Ki Kim, Jun Watanabe, Ashok SHETTY, Bharathi HATTIANGADY, Jessica FORAKER, Barry Berkowitz

種類 : PCT 国際特許出願

番号 : PCT/US2013/065349

出願年月日 : 2013/10/17

国内外の別 : 国外

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 潤 (WATANABE, Jun)

昭和大学 共同研究施設 遺伝子組換え実験室 助教

研究者番号 : 50649069

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

塩田清二 (SHIODA, Seiji)

大滝博和 (Ohtaki, Hirokazu)

Darwin Prockop

Ashok Shetty