

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25870502

研究課題名(和文) 脂肪由来間葉系幹細胞のサイトカイン機能解析と効率的な脳梗塞再生治療法の開発

研究課題名(英文) Cytokine function analysis of adipose-derived mesenchymal stem cells and development of regenerative therapies in acute cerebral infarction

研究代表者

古田 興之介 (FURUTA, Konosuke)

高知大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：60546571

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)：我々は、脂肪由来間葉系幹細胞(Adipose-derived mesenchymal stem cell: AD-MSC)が急性期脳梗塞の再生医療に役立つ可能性を考えており、その理論的基盤・技術を確立することを目標とした。まず中大脳動脈閉塞のマウス脳梗塞モデルを確立し、次にAD-MSCを分離培養することができた。ただ、研究環境の移転に伴う研究認可の遅れと研究設備環境の変化により、事業期間内に研究を完遂することはできなかった。

研究成果の概要(英文)：We are considering the possibility that adipose-derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) may be useful for regenerative therapy in acute cerebral infarction, and we aim to establish its theoretical foundation and techniques. First, we established a transient middle cerebral artery (MCA) occlusion mice model. Secondly, AD-MSC could be isolated and cultured from mice fats. However, due to delays in research approval accompanying the transfer of research environment and changes in research facility, it was impossible to complete the research within the project period.

研究分野：脳血管障害 再生医療

キーワード：脳梗塞 再生医療 脂肪由来間葉系幹細胞 マウス

## 1. 研究開始当初の背景

近年、様々な幹細胞を用いた再生医療が注目され、脳梗塞治療についても、iPS 細胞をはじめとして骨髄幹細胞や間葉系幹細胞を用いる方法等が検討されている。研究協力者の松瀬は、骨髄由来間葉系幹細胞(Bone marrow-derived mesenchymal stem cell: BM-MSC)をラット脳梗塞モデルに移植して、脳梗塞巣を著しく軽減させることに成功した(Matsuse et al, Tissue Engineering, 2011)。BM-MSC は脳梗塞患者への臨床試験も開始され、長期的な安全性も確認されている(Jin SL, et.al. Stem Cells, 2010)。しかし BM-MSC を用いる場合は骨髄穿刺が侵襲的である上に、骨髄液中細胞の 0.0001-0.001%しか採取できない。しかも BM-MSC の治療能力は年齢依存性があるとされており(K.Stenderup et al, Bone, 2003)、高齢者の多い脳梗塞患者への臨床応用を考えた場合、自家移植治療効果は十分でない可能性がある。一方で、脂肪由来間葉系幹細胞(Adipose-derived mesenchymal stem cell: AD-MSC)も、脂肪・筋組織や骨・軟骨組織、皮膚、神経、血管などへの多分化能を有し(Zuk et al, Tissue Engineering, 2001)、マウス脳梗塞モデルに AD-MSC 移植すると、梗塞巣を軽減し神経機能回復することが確認されている(Leu et al, Journal of Translational Medicine, 2010)。さらにマウス急性期脳梗塞モデルにおいて AD-MSC 移植群は BM-MSC 移植群よりも脳梗塞体積を減少させ、24 時間後の麻痺も軽減した(Ikegame et al. Cytotherapy, 2011)。また AD-MSC は採取・培養も容易で、1g の脂肪組織から豊富に(数十万個)得られる(Sen et al, 2001)。しかもヒト AD-MSC において高齢者と若年者の分化増殖速度は同等であり、高齢者にも有利である(Chen et al, Journal of cellular and Molecular Medicine, 2012)。安全面でも、脊髄損傷患者に AD-MSC を経静脈的に投与した臨床試験では肺塞栓や腫瘍などの副作用は確認されていない(Jeong Chan Ra et al. Stem Cells and Development, 2011)。このような背景から、AD-MSC は脳梗塞再生医療に最も有望な細胞のひとつと考えられた。今後、AD-MSC 移植を臨床応用するためには、脳梗塞改善の理論的根拠が必須であるが、そのメカニズムは血管新生による脳血流回復、サイトカインによる神経保護、新生作用、幹細胞ホーミング、AD-MSC から神経細胞への分化などが考えられているもの(Leu et al, Journal of Translational Medicine, 2010)ほとんど解明されていない。その中で我々は、脳梗塞時(傷害時)の AD-MSC 由来のサイトカインは平常時と成分や分泌量が異なり、病状回復に中心的役割を果たしているのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、AD-MSC 移植の脳梗塞治療効果について、その理論的基盤・技術を確立することを主目的とした。このため、マウス脳梗塞モデルの確立、AD-MSC の分離培養法の確立、脳梗塞時における AD-MSC 由来サイトカインの Bio-Plex 法による網羅的検索とノックアウトマウスによる効果の証明、蛍光標識ナノ粒子を用いた、移植 AD-MSC の長期的な臓器分布、分化、神経ネットワーク再構築の機序の解明、AD-MSC への CXCR4 過剰発現法や磁気誘導法による障害部位へのホーミング効率向上の検討、AD-MSC 由来ニューロンへの CXC3CL1 過剰発現によるミクログリアを介したアポトーシス抑制の検証の 6 点を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス脳梗塞モデルの作成

研究協力者の松瀬は、ラット脳梗塞モデルを用いて研究をしていたが、本研究ではノックアウトマウス利用などへの発展性を考慮して、マウス脳梗塞モデルを使用することとした。まずはその手技確立を目指した。既報告のマウス脳梗塞モデルとして suture を用いた糸上げ法、開頭して直視下で中大脳動脈(middle cerebral artery: MCA)を電気凝固する方法、開頭して脳血管にレーザー照射して血管内で凝血塊を形成させ血管閉塞を誘発する方法などが存在する。本研究では、設備や予算などの関係から、suture を用いた糸上げ法を用いることとした。糸上げ法にも多くの方法が報告されているが、外頸動脈(external carotid artery: ECA)から suture を挿入し、MCA を閉塞する方法、総頸動脈(common carotid artery: CCA)から suture を挿入して MCA を閉塞する方法が代表的な手技である。まずこれらの方法を実践し、手術の成功率と梗塞巣の評価をして、本研究に最適なマウス脳梗塞モデルを確立する方針とした。

マウスの性別は脳梗塞のサイズに影響を与えるため、対象とするマウスは雄に限定し、8 週齢、体重 23~30g のマウスを用いた。まず小動物用麻酔器(室町機械社製)を用いて、2%イソフルランで吸入麻酔した。体温保持装置(バイオリサーチ社製)を用いて直腸温を測定し体温を保持した。麻酔されたマウスを伏臥位にして頭蓋骨を露出し、レーザードップラー血流計(FLO-C1、OMEGAWAVE 社製)の血流測定用ファイバースコープを右中大脳動脈(MCA)支配領域に接着剤で固定した。次にマウスを仰臥位にして前頸部を正中切開して頸動脈を露出した。そのうえで上記の手技で手術を施行した。レーザードップラーで脳血流をモニタリングすることにより、MCA の suture による閉塞や、抜去による再開通の様子を確認した。なお MCA 閉塞に用いる suture はサイズを均一にするために、Doccol 社製の MCA-0 suture(ナイロン糸の先端にシリコンコーティングが施されたもの)

を用いた。

#### 脳梗塞巣の評価

脳梗塞作成から 24 時間経過後にイソフルラン深麻酔下に頸椎脱臼にてマウスを安楽死させ、脳を取り出してマウス用のブレインスライサー (Neuroscience Inc 社製) を用いて、1mm 間隔の冠状断の脳切片を作成した。2% の 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) 溶液中に 37 °C、20 分間静置して染色を行い、脳梗塞巣を評価した。染色された脳標本は、顕微鏡下でデジタル撮影し、画像処理は ImageJ を用いて梗塞巣の面積を測定した。

#### (2)AD-MSC の分離培養

正常マウスをイソフルラン深麻酔後に安楽死させ、アルコールに浸した後に、腹部切開し、両鼠経上部から脂肪を切り出した。37 °C 無菌生理食塩水で血液を洗い流した後、滅菌メスを用いて脂肪を 1mm<sup>3</sup> 以下に細かくし生食で伸ばした。脂肪組織をコラゲナーゼ液で酵素処理して、37 °C でインキュベート後、600G、5 分間室温で遠心分離した。脂肪成分、上清を除去して、血管内皮細胞や白血球などを含む間質血管細胞群を得た。さらにマイクロフィルター濾過と遠心分離を繰り返して、脂肪由来の間質細胞群 ASCs を得た。これをセルソーターで AD-MSC を分離する方針とした。

#### (3)AD-MSC の in vitro でのサイトカインの種類と分泌量の評価

正常マウスと脳梗塞マウスの AD-MSC を、上記の方法でそれぞれ分離培養し培養上清中のサイトカインをフローサイトメトリー (Bio-Plex 法) で多項目同時測定する。

#### (4)蛍光標識ナノ粒子を用いた移植 AD-MSC の臓器分布、分化、神経ネットワーク再構築の機序の解明

蛍光標識ナノ粒子 (NEO-STEM、Biterial 社) はシリカ (SiO<sub>2</sub>) の殻内に磁性体コアと蛍光色素が封入された蛍光ナノ粒子であり、細胞毒性がほとんどなく、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれた後も数か月以上細胞内にとどまる特性を持つ。マウス脳梗塞由来の AD-MSC にこの NEO-STEM を添加して、3 時間インキュベートして細胞内に取り込ませてから、マウス静脈内へ投与する。その後、経時的に蛍光モニタリングや動物用 MRI で、AD-MSC の臓器分布を明らかにする。あわせて、行動評価を行う。マウスの神経機能評価は、modified neurological severity score (mNSS) (運動、感覚、反射、バランステストから成り 0-18 点で評価) と、foot-fault test (大きさの異なる六角形のグリッドを渡するのに要した段階の総数で評価) などを用いることとした。

#### AD-MSC と血管・神経ネットワーク再構築・神経機能回復との関連

静脈投与した NEO-STEM 標識した AD-MSC が

肺を経て脳へ到達し、さらに破綻した血液脳関門を越えて梗塞巣へ到達するのか、生着するのかを経時的に免疫組織学的に観察し明らかにする。さらに脳梗塞巣周辺を vWF で染色して、特に移植 AD-MSC により誘導された血管を定量的に評価する。また、移植 AD-MSC により host の神経幹細胞の増加が惹起されるかを、脳室下帯を pax6 で染色して定量的に評価する。移植 AD-MSC 自身が神経系細胞に分化する可能性を明らかにするために AD-MSC を NeuN や GFAP で染色する。移植 AD-MSC から神経系細胞への分化を認めた場合は、そのシナプス形成を免疫組織化学的に分析する。ニューロンを抗 MAP2 抗体と抗シナプシン 抗体で多重染色して分布を明らかにし、ウェスタンブロット法でシナプシンの増大を確認する。また新規のシナプス形成は、シナプス小胞膜蛋白であるシナプトフィジン発現を、抗シナプトフィジン抗体で免疫染色して確認する。

#### (5)AD-MSC への CXCR4 過剰発現法や蛍光標識ナノ粒子を利用した磁気誘導法による幹細胞ホーミング効率向上の検討

虚血部位からのケモカイン SDF-1 の受容体 CXCR4 を、AD-MSC 上に過剰発現させるために、AD-MSC を 37 °C 10% ウシ胎児血清 (FCS)/DMEM で 24 時間培養してから移植し、ホーミング効率を検討する。

NEO-STEM には、細胞分離を行うために磁性体コアが組み込まれている。これを応用して、0.3T の小さな磁石をマウス頭部の梗塞巣直上へ固定し、その時期によって NEO-STEM で標識した AD-MSC を梗塞巣周辺へ誘導する方法を試み、その分化、生着について明らかにする。

#### (6)AD-MSC 由来ニューロンへの CX3CL1 過剰発現による、ミクログリアを介したアポトーシス抑制の検証

CX3CL1 は細胞接着とケモカインの活性を持ち、ニューロンに発現して生存を促進する。傷害時にはその受容体である CX3CR1 がミクログリアで発現してアポトーシスを抑制することが知られている。そこでまず、pMSCV-neo system (BD 社製) を用いて CX3CL3 または GFP を入れたレトロウイルスベクターを作製し、AD-MSC に導入して CX3CL1 を過剰発現させる。次にこの AD-MSC を移植して、分化したニューロンがミクログリアによるアポトーシスを抑制できるかを調べる。脳は切片を作製して Iba1 抗体で免疫染色を行い、蛍光陽性ミクログリアの数と分布を測定し、ニューロンとの関連を明らかにする。

## 4 . 研究成果

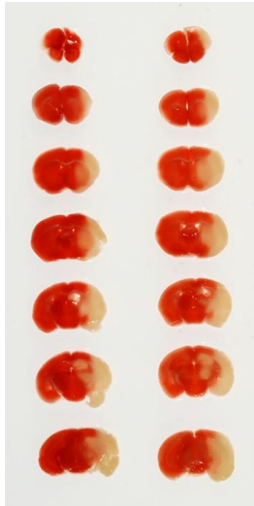
### (1)マウス脳梗塞モデルの確立

まず、suture は Doccol 社製 602056 を用いた (6-0 ナイロン糸に直径 0.20 ± 0.02mm、長

さ5-6mmのコーティングがなされたもの)を用いて、ECAからsutureを挿入する手技で脳梗塞を作成した。しかし、ECAからCCA近位方向へ挿入したsutureを引き抜きながら反転させて内頸動脈(internal carotid artery: ICA)へ挿入する手技が難しく、ECA断端からsutureが抜けてしまい、出血の合併症を生じやすかった。またICAへの挿入角度の問題から、ICA近位部から分岐する翼突口蓋動脈(pterygopalatine artery: PPA)にsutureの先端が迷入しやすいこともあり、手術時間が長引き成功率が低下する傾向にあった。ECA断端からの反転を容易にするためにコーティング長の短いsutureを使用することも検討したが、MCA閉塞が不十分になる可能性が懸念された。よって、我々はCCAからsutureを挿入する手技で脳梗塞作成してみた。CCAはECAに比べてsutureの挿入が容易であり、sutureサイズはDoccol社製602356(6-0ナイロン糸に直径 $0.23 \pm 0.02$ mm、長さ5-6mmのコーティング)に変更した。この方法は手技的に容易でPPAにsutureが迷入しにくかった。結果的に手術・麻酔時間を短くできた。MCAの閉塞時間は、15分、30分、60分のものなどを作成した。閉塞中にマウスを覚醒すると、体動により脳血流モニタリングは不可能であるため、体動によってsutureの位置がずれて、MCA閉塞が不完全となる可能性があった。よって、閉塞時間中は麻酔を継続することとした。

## (2)脳梗塞巣の評価

脳梗塞作成から24時間後に氷冷したブレインスライサーで作成した脳切片を2%TTC混合生理食塩水内に37℃で20分間静置した。切片は嗅球から1mm厚で作成したが組織が壊れ評価困難であったため、2mm,4mm,6mmの部位において2mm厚で作成した。6mmより後方では、後方循環による側副血行路によって個体差が出やすいと考えられたため、評価からは除外した。(右図は30分閉塞後の梗塞巣)



## (3)AD-MSCの分離培養

上記方法で、脂肪由来の間質細胞群 ASCs を得ることができ、プラスチックディッシュを用いてCO2インキュベータ内で継代培養し、AD-MSCと思われる細胞を得ることができた。

## 【考察と今後の展望】

本研究によって、マウス脳梗塞の作成法と梗塞巣の評価法が確立できた。脂肪由来

間葉系幹細胞(AD-MSC)と思われる細胞を分離培養できた。

研究代表者の研究環境の移転に伴い、パソコン内データが破損・喪失したこと、移転先での研究申請認可が下りるまでに時間を要したことから研究には大幅な遅れが生じた。研究再開することはできたが、レーザードップラー脳血流装置などの設備が揃わないことから、脳梗塞サイズを揃えることができず、梗塞体積の比較研究の継続は断念した。また移転先の研究室に、フローサイトメトリーと、セルソーターは設置されているが、抗体標識が揃っておらず、当初計画していたセルソーターによるAD-MSC分離は断念し、従来のプラスチック培養ディッシュによる分離方法を選択せざるを得なかった。さらに動物用MRIも故障中で使用の目途が立たなかった。事業期間内には当初予定した研究を完遂できず、期待した成果を得るには至らなかったが、異なる手法を検討して研究を継続中である。

## 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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

高知大学医学部神経内科学

[https://www.kochi-ms.ac.jp/html/gakubu/fm\\_nurly.html](https://www.kochi-ms.ac.jp/html/gakubu/fm_nurly.html)

九州大学外学院医学研究院神経内科学

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/neuro/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

古田 興之介 (FURUTA, Konosuke)

高知大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：60546571

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

松瀬 大 (MATUSE, Dai)  
九州大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：60546571

田中 弘二 (TANAKA, Koji)  
九州大学・大学院医学研究院 院生