

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463082

研究課題名(和文) マウス脳梗塞モデルにおける脱分化脂肪細胞移植による中枢神経再生

研究課題名(英文) Central nervous regeneration by transplantation of dedifferentiated fat cell in mouse brain infarction model

研究代表者

小谷 順一郎 (KOTANI, Junichiro)

大阪歯科大学・歯学部・名誉教授

研究者番号：40109327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト頬側脂肪体から得た成熟脂肪細胞を天井培養して脱分化脂肪細胞(DFAT)を単離した。DFATは神経マーカーのnestin、sox2を発現した。また、フローサイトメトリー解析により間葉系幹細胞に類似した性質を有していた。これら細胞を脳梗塞疾患モデルマウスへ異種移植すると、梗塞面積に差はなかったものの、行動テストで機能的回復が認められた。また、マウスに移植したDFATは、脳梗塞巣で検出された。したがって、移植したDFATが梗塞後の脳に影響を与え、機能的回復の促進に寄与する可能性がある。この知見は中枢神経障害を治療するための細胞補充療法の新たな供給源になる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：We isolated the dedifferentiated fat (DFAT) by ceiling culture of mature adipocytes obtained from human buccal fat pads. DFAT expressed neuronal markers nestin, sox2. Moreover, it had properties similar to those of mesenchymal stem cells from Flow cytometric analysis. Although there was no difference in the infarct side surface area by xenografting these cells to a cerebral infarction disease model mouse, functional recovery was observed in the behavioral test. In addition, DFAT transplanted into mice was detected in cerebral infarct lesion. Therefore, the possibility that transplanted DFAT influences brain after infarction and contributes to promotion of functional recovery was considered. This finding suggested the possibility of a new source of cell replacement therapy for the treatment of central nervous disorders.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：脱分化脂肪細胞 脳梗塞 中枢神経 細胞移植 再生

1. 研究開始当初の背景

(1)脳血管障害により日常生活動作が低下した高齢者は、嚥下障害や自発的な口腔内清掃が困難になることから誤嚥性肺炎の発現率が上昇するといわれている。さらに、一般的な歯科治療も困難になることから、齶蝕、歯周疾患が進行する要因ともなる。従って、脳血管障害、とりわけ脳梗塞に対する有効な治療法が確立されることは、歯科医療にとどまらず医療界全般に望まれることである。

(2)脳梗塞に対して、近年、幹細胞を用いた血管再生療法が注目されている。脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cells: DFAT)は、神経系マーカーを発現するといわれ、ラット脊髄損傷モデルへの移植における中枢神経系再生効果が報告されている。しかし、脳梗塞に対する有効性に関しては、いまだ解明されていない。したがって、脳梗塞を対象とした DFAT 移植における中枢神経系再生効果を動物実験的に評価することには意義がある。

2. 研究の目的

(1)DFAT の樹立と分子生物学的評価
ヒト類脂肪体から天井培養法を用いて DFAT を獲得し、神経系マーカーの発現について詳細を明らかにする。

(2)DFAT 移植による中枢神経再生効果の評価
ヒト DFAT をマウス脳梗塞モデルに経静脈的に移植し、行動学的・形態学的検討から脳梗塞に対する細胞治療の有効性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)「天井培養法」を用いた DFAT の単離と免疫組織化学的検討
ヒト類側脂肪体を細断後、コラゲナーゼ溶液で処理し、濾過した細胞懸濁液の上層に浮遊する脂肪細胞を含む油滴を集め遠心分離した。単離した脂肪細胞を抗生物質-抗真菌剤

混合溶液を含有する 20%ウシ胎児血清で満たしたフラスコ内に播種した。培養面を上に向けて配置し、脂質液滴を含む浮遊脂肪細胞をフラスコの内側天井表面に付着させ、37℃、5%CO₂で培養した。7日後、培地を除去してフラスコを裏返した。培地は4日ごとに交換し、細胞がコンフルエント状態になった後、EDTAで剥がし、免疫組織化学染色を行うため、培養プレートに播種した。Condition Mediumで培養し、12日後にコンフルエント状態となったことを確認した。培養したDFATは4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝生理食塩水(pH 7.4)で固定し、anti-nestin 抗体, anti-Sox2 抗体, CD45 抗体で免疫組織化学染色を行った。

(2) フローサイトメトリーによる解析

3継代目のDFAT表面抗原を分析した。
ヒト万能間葉ストローマ細胞マーカー抗体パネルを一次抗体として、二次抗体としてIgG、IgM抗体を使用した。

(3) DFAT の神経細胞への分化誘導

DFAT(3継代目)を浮遊培養用シャーレ中で3週間培養を行い、その後、neural-conditioned medium(NCM)にて1週間培養した。神経分化誘導後のDFATの組織免疫化学染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

(4)脳梗塞の作製とDFAT移植

マウスの左中大脳動脈を電氣的切断することで永続的脳虚血を作製した。脳虚血2日後に、コントロールとしてのリン酸緩衝生理食塩水(n=6)、およびDFAT(3継代)(n=10)を各々30μl、尾静脈から静脈内投与した。Sham controlは脳梗塞後、静脈内投与を行わないマウス(n=4)とした。

(5)行動学的検討

DFAT移植後に、ホットプレート(HP)、強制水泳試験(FS)、高架式十字迷路(EPM)など9種

の行動学試験を行い、Control 群、Sham control 群と比較した。

(6)脳梗塞巣への影響

脳梗塞 4 週間後の脳組織を取り出し、固定後、脳全体を頭頂側から撮影した。画像分析プログラムソフトを使用して脳表面積を計測した。脳梗塞部位を除いた左大脳皮質を脳梗塞側皮質表面積とし、脳梗塞側皮質表面積/対側皮質表面積の比率を算出した。

(7)移植細胞の追跡

DFAT (3 継代目) 5×10^5 個に対し Vybrant® Multicolor Cell-Labeling Kit (Dil) を用いてラベリングを行った。脳梗塞発症 2 日後のマウスに対して静脈内からラベリングした細胞投与を行った。細胞投与翌日、マウスの脳、肺、肝臓、脾臓を摘出し、各臓器は 4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝生理食塩水で固定、厚さ $12 \mu\text{m}$ の標本を作成して蛍光顕微鏡で撮影を行った。

4. 研究成果

(1) DFAT の免疫組織化学的検討

培養した DFAT は線維芽細胞様の細胞形態を有していた。免疫組織化学染色では、nestin (図 1)、Sox2(図 2)の発現を認めたが、CD45 の発現は認めなかった。

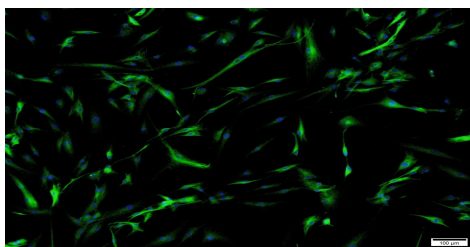


図 1 nestin 陽性細胞

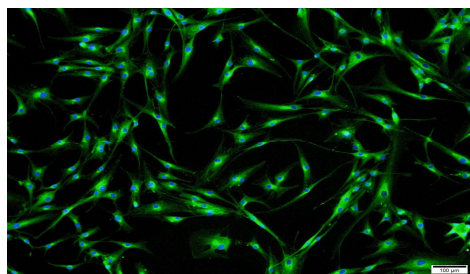


図 2 Sox2 陽性細胞

(2)フローサイトメトリーによる分析では、細胞表面マーカーとして Stro-1、CD44、CD90、CD105、CD146 が発現し、CD19、CD45、CD106 は発現しなかった。

(3)神経細胞への分化

浮遊培養シャーレ内で DFAT はニューロスフェア様細胞塊を形成し、樹状様突起を有する細胞に分化し(図 3)、Tuj1 の発現を有していた(図 4)。

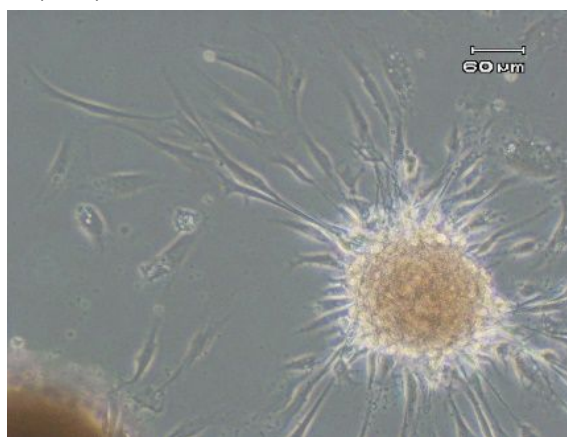


図 3 樹状突起様の突起を有する細胞

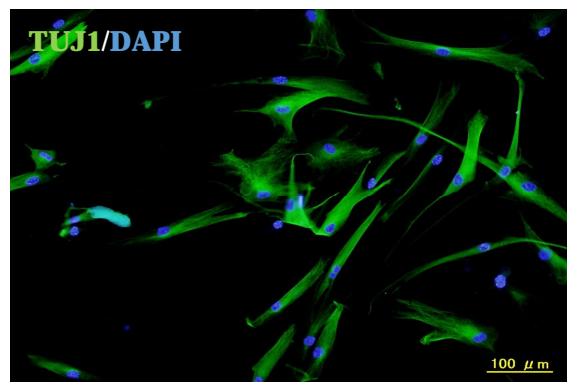


図 4 Tuj1 陽性細胞

(4) 行動学的検討

脳梗塞マウスへの DFAT 移植後、10 匹中 9 匹は、3 週間生存した。ホットプレート試験(HP)、強制水泳試験(FS)において、DFAT 移植群が有意に改善していた。

(5) 脳梗塞巣面積

脳梗塞側皮質表面積および比率に有意差は認められなかった。

(6) 移植細胞の追跡

脳梗塞モデルマウスに移植したラベリングされた細胞は、脳(図5)以外にも、肺、肝臓、脾臓、腎臓で確認された。

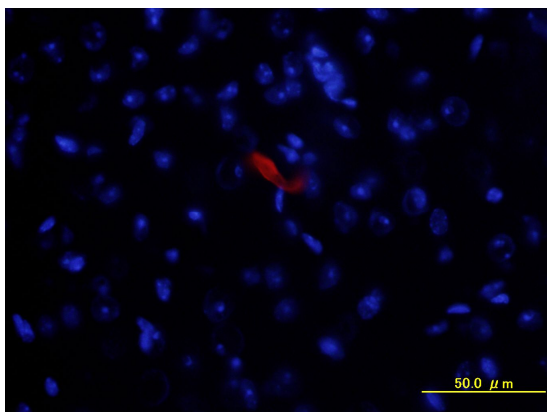


図5 脳梗塞後の脳へのDFAT集積

以上より、DFATは多分化能を有する均一な細胞集団であることから、神経系に分化し、経静脈的移植したDFATは、脳梗塞モデルマウスの脳内にも存在しうることが明らかとなった。したがって、移植したDFATが梗塞後の脳に影響を与え、機能的回復の促進に寄与する可能性がある。

この知見は中枢神経障害を治療するための細胞補充療法の新たな供給源になる可能性を示唆する。

<引用文献>

Nagayama K, Matsumoto T, Contribution of actin filaments and microtubules to quasi-in situ tensile properties and internal force balance of cultured smooth muscle cells on a substrate, *Am J Physiol Cell Physiol*, 295(6), 2008, C1569-1578

Ohta Y, Takenaga M, Tokura Y, Hamaguchi A, Matsumoto T, Kano K, Mugishima H, Okano H, Igarashi R, Mature adipocyte-derived cells, dedifferentiated fat cells (DFAT), promoted functional recovery from spinal cord injury-induced motor dysfunction in rat, *Cell Transplantation*, 17, 2008, 877-886

Sakamoto F, Hashimoto Y, Kishimoto N, Honda Y, Matsumoto N, The utility of human dedifferentiated fat cells in bone tissue engineering in vitro. *Cytotechnology*, 67(1), 2013, 75-84

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)

[学会発表](計 3件)

覚道知樹、岸本直隆、土居亜紀子、中込隆之、百田義弘、松山知弘、脱分化脂肪細胞の神経系分化とマウス脳梗塞モデルへの細胞移植による脳分布、第59回脳循環代謝学会、2016年11月11日、あわぎんホール(徳島県徳島市)

覚道知樹、岸本直隆、百田義弘、脱分化脂肪細胞による中枢神経再生、第23回日本歯科医学総会、2016年10月22日、福岡サンパレス(福岡県福岡市)

覚道知樹、岸本直隆、百田義弘、脱分化脂肪細胞の神経細胞分化、第43回日本歯科麻酔学会、2015年10月31日、学術総合センター(東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 順一郎 (KOTANI, Junichiro)
大阪歯科大学. 歯学部・名誉教授
研究者番号: 40109327

(2) 研究分担者

岸本 直隆 (KISHIMOTO, Naotaka)
大阪歯科大学. 歯学部・講師
研究者番号: 50610911

百田 義弘 (MOMOTA, Yoshihiro)
大阪歯科大学. 歯学部・教授
研究者番号: 60247880

(3) 連携研究者

松山 知弘 (MATSUYAMA, Tomohiro)
兵庫医科大学. 医学部・教授
研究者番号: 10219529

前田 光代 (MAEDA, Mitsuyo)
公益財団法人先端医療振興財団. 再生医学科学研究所・研究員
研究者番号: 40122080