

幹細胞プロファイルモニタリングによる機能性食材の抗加齢効果の検討

本 望 修 [札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所神経再生医療学部門／教授]

佐々木 祐典 [札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所神経再生医療学部門／講師]

岡 真一 [札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所神経再生医療学部門／特任講師]

進 藤 聰 [ニプロ株式会社札幌支店／課長]

Jeffery D. Kocsis [Yale University／Professor]

吉 川 義 洋 [ニプロ株式会社総合研究所／主席研究員]

背景・目的

高齢化の急速な進展、生活習慣病とその予備軍、認知症の増加に伴い、日常の食生活のなかで、食品の持つ機能を疾病予防や生活の質の改善等に活用し、健康の維持・増進を図ることができる社会の構築が国の役割として求められている。なかでも、機能性を有する食品の研究開発には期待が集まっており、多くの企業・アカデミアが研究を推進している。

これまで、われわれは、骨髓間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell: MSC)の有する治療効果に注目して、脳梗塞や脊髄損傷などの神経損傷モデル動物に対する移植実験を行ってきた。特に、脳梗塞においては、脳梗塞患者を対象として臨床試験(脳梗塞12症例へ自己MSCの静脈内移植)を行った結果、安全性と効果が確認された。これらの結果を受け、現在、札幌医科大学では、脳梗塞(Phase III)および脊髄損傷(Phase II)に対する医師主導治験を実施している。

一方、われわれは MSC が骨髄のみならず末梢血中にも存在し、全身の多くの臓器の cell replacement に貢献していることを解明してきた。さらに、MSC を抽出・培養・増幅して経静脈内に投与すると、各種神経疾患(特に虚血性疾患や外傷性疾患など)に対して強い治療効果をもたらすことを報告してきた。このように骨髄および末梢血中の MSC は、生体の恒常性維持や損傷治癒に大きな役割を果たしていることが判明している。従って MSC のプロファイルをモニタリングすることによって、いわゆる生体機能の評価を可能にすると考えている。

本研究では、ラット動物モデルに対して生理活性物質を投与し、MSC プロファイルの継時的变化を治療効果とともに詳細な比較解析を行い、幹細胞の恒常性という観点から、幹細胞プロファイル評価方法の確立、同時に、新たな機能性食品による抗加齢効果を有する機能性食品の開発に結びつけることを目的とした。

内容・方法

本研究においては、下記(A)から(G)までの項目に関して、行った。

- (A) 若年ラット(11週令)および老齢ラット(33週令)より、末梢血を採集し、Ficoll によって単核球分画を抽出し、FACS 解析を行った。
- (B) 若年ラット(11週令)および老齢ラット(33週令)より、骨髄を採集し、Ficoll によって単核球分画を抽出し、FACS 解析を行った。
- (C) 若年ラット(11週令)および老齢ラット(33週令)より、骨髄を採集し、骨髄幹細胞の培養を行い、FACS 解析を行った。
- (D) 老齢(33週令)ラットへ生理活性物質を含んだ水と生理活性物質を含まない水を2週間投与した。2週間後、末梢血を採集し、Ficoll によって単核球分画を抽出し、FACS 解析によって、細胞表面抗原マーカーによる MSC のプロファイルを比較検討した。
- (E) 老齢(33週令)ラットへ生理活性物質を含んだ水と生理活性物質を含まない水を2週間投与した。2週間後、骨髄を採集し、Ficoll によって単核球分画を抽出し、FACS 解析によって、細胞表面抗原マーカーによる培養 MSC のプロファイルを比較検討した。
- (F) 老齢(33週令)ラットへ生理活性物質を含んだ水と生理活性物質を含まない水を2週間投与した。2週間後、骨髄より MSC を採集し培養を行った。FACS 解析によって、細胞表面抗原マーカーによる培養 MSC のプロファイルを比較検討した。
- (G) ラット疾患モデルへ応用するために、行動学的評価方法の確立へ向けた、動物行動学的実験(認知機能検査として、Morris water maze 試験など)を行った。特に、汎用行動学解析用ソフト (ANY-maze) を用いたゴールまでの到達時間、遊泳速度、遊泳距離をはじめとする多種のパラメーターでの解析を行った。

実験の詳細に関しては、下記に記す。

1. 末梢血の採集

SD ラットに塩酸ケタミン 90mg/kg、塩酸キシラジン 10mg/kg を腹腔内投与し、麻酔を行ったのち、ピンセットなどで皮膚をつまみ、深麻酔を確認後、胸部正中切開により開胸し、上行大動脈にカニュレーションを行い末梢血を採集した。

2. 骨髓の採取

SD ラットに塩酸ケタミン 90mg/kg、塩酸キシラジン 10mg/kg を腹腔内投与し、麻酔を行ったのち、ピンセットなどで皮膚をつまみ、深麻酔を確認後、大腿骨を採取、骨髓を採取した。

3. 骨髓幹細胞の培養

SD ラットに塩酸ケタミン 90mg/kg、塩酸キシラジン 10mg/kg を腹腔内投与し、麻酔を行ったのち、ピンセットなどで皮膚をつまみ、深麻酔を確認後、大腿骨を採取、骨髓から幹細胞を分離して骨髓幹細胞 (MSC) 培養を行った。大腿骨を採取したラットは、致死量のペントバルビタール 100mg/kg を腹腔内へ投与し安楽死させた。1匹のラットから得られる骨髓幹細胞 (MSC) の数は継代の回数によって調整可能であり、約 10^{7-8} 個採取できた。

4. FACS(フローサイトメトリー)による解析：

サンプルとなる細胞を複数の細胞表面マーカーの蛍光抗体で標識し、フローサイトメトリー機器によってレーザー光の焦点を通過させ、個々の細胞が発色する蛍光を測定することで、細胞表面の抗原マーカーの量を定量化した。

5. 行動学的検査

トレッドミル試験、モリス水迷路法、放射状迷路法 Noble Objective Recognition 法などによる行動学的解析を検討した。特に、モリス水迷路法においては、ANY-Maze システムを用いて、多パラメーターによる詳細な行動学的解析の可能性を検討した。

6. 組織学的解析

観察終了時には、4% パラホルムアルデヒドによる cardiac perfusion を行い、脳脊髄組織を採取したのちに、組織化学的解析の確立を試みた。

結果・成果

(A) 若年ラット(11週令)および老齢ラット(33週令)よ

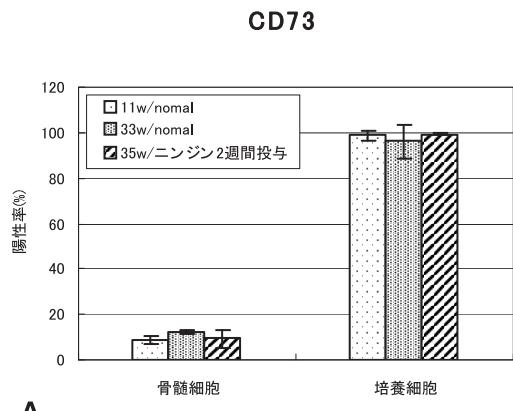


図1 フローサイトメトリーによる解析結果

り、末梢血を採取し、Ficoll によって単核球分画を抽出し、FACS 解析を行い、細胞表面抗原 (CD マーカー) の数種類について比較検討した結果、少なくとも 3 種類のマーカーについて、顕著な差異が認められた。

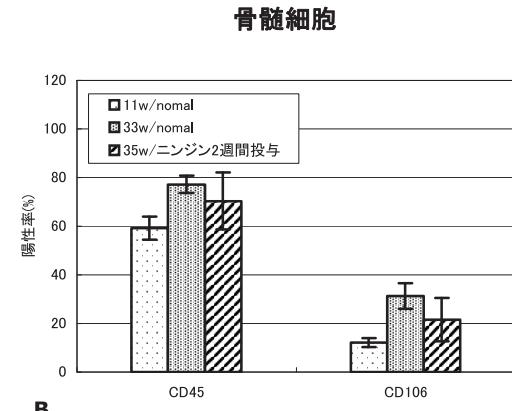
(B) 若年ラット(11週令)および老齢ラット(33週令)より、骨髓を採取し、Ficoll によって単核球分画を抽出し、FACS 解析を行い、細胞表面抗原 (CD マーカー) の数種類について比較検討した結果、少なくとも 3 種類のマーカーについて、顕著な差異が認められた。

(C) 若年ラット(11週令)および老齢ラット(33週令)より、骨髓幹細胞を採取・培養し、FACS 解析によって、細胞表面抗原 (CD マーカー) の数種類について比較検討した結果、少なくとも 3 種類のマーカーについて、顕著な差異が認められた。

(D) 老齢(33週令)ラットへ生理活性物質を含んだ水と生理活性物質を含まない水を 2 週間投与した。2 週間後、末梢血を採取し、Ficoll によって単核球分画を抽出し、FACS 解析によって、細胞表面抗原マーカーによる MSC のプロファイルを比較検討した結果、生理活性物質を含んだ水を摂取した群では、若年(11週令)ラットの MSC のプロファイルに近づくことが判明した。

(E) 老齢(33週令)ラットへ生理活性物質を含んだ水と生理活性物質を含まない水を 2 週間投与した。2 週間後、骨髓を採取し、Ficoll によって単核球分画を抽出し、FACS 解析によって、細胞表面抗原マーカーによる培養 MSC のプロファイルを比較検討した結果、生理活性物質を含んだ水を摂取した群では、若年(11週令)ラットの MSC のプロファイルに近づくことが判明した。

(F) 老齢(33週令)ラットへ生理活性物質を含んだ水と



生理活性物質を含まない水を2週間投与した。2週間後、骨髓よりMSCを採取し培養を行った。FACS解析によって、細胞表面抗原マーカーによる培養MSCのプロファイルを比較検討した結果、生理活性物質を含んだ水を摂取した群では、若年(11週令)ラットのMSCのプロファイルに近づくことが判明した。

(G) ラット疾患モデルへ応用するために、行動学的評価方法の確立へ向けた、動物行動学的解析(認知機能検査として、Morris water maze試験など)の検討を行った。特に、汎用行動学解析用ソフト(ANY-maze)を用いたゴールまでの到達時間、遊泳速度、遊泳距離をはじめとする多種のパラメーターでの解析で、評価方法を確立することができた。

また、組織学的解析方法の検証も行うことができた。

今後の展望

高齢化社会において、健康の維持増進に役立つ機能性食品を開発し、個人の健康状態に対応した供給システムを確立するのは喫緊の課題であり、多くの企業等がさまざまな検討を開始しているが、その評価方法は確立していない。本研究では、機能性食品に含まれる生理活性物質による抗加齢効果を、生体内の幹細胞のプロファイルをモニタリングすることで、評価することが可能であろうと示唆されたため、今後は、本研究を継続して検証を

推進する予定である。また、より抗加齢効果を有する機能性食品の選定、さらには抗加齢効果を高めた改変型機能性食材の開発も展開してゆく可能性も広がると考えている。

以上の基礎的検証によって、幹細胞のプロファイルを検査キット化する方向で研究を推進する予定である。今後は、幹細胞プロファイルキットのプロトタイプの開発を行い、検査キットとしての実用化を目指して開発を推進したいと考えている。本幹細胞プロファイルキットの開発が可能である場合、21世紀半ばには2.5人に1人が65歳という高齢化社会をマーケットとして、大きな事業性が見込めると考えている。

さらに抗加齢のための機能性食品の実用化を幹細胞の観点から科学的に裏付け、北海道に特色のある機能性食品に付加価値を付与し、北海道の豊富な農産物資源を用いた新しい抗加齢に寄与する食品の開発およびの普及に役立てていきたいと考えている。

行動学解析用ソフト(ANY-maze)による解析例：

認知機能を評価する目的で、モリス水迷路法を行い、ANY-mazeで解析を行った。本解析ソフトウェアは通常の行動軌跡、滞在時間などの100項目以上のパラメーターのデータを表示・解析することが可能であり、現在、今までに施行して記録していたデータを解析している最中である。

