

令和元年6月18日現在

機関番号：13701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06729

研究課題名（和文）神経保護性マクロファージを用いたイヌの変性性脊髄症に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of new therapy for canine degenerative myelopathy using neuroprotective macrophage

研究代表者

小畠 結（Kobatake, Yui）

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：00805442

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、イヌの変性性脊髄症における神経炎症を制御するため、神経保護性マクロファージを用いた新規治療法を確立することを目的とした。末梢血単球を神経保護性マクロファージに形質転換するための至適条件を決定し、作製した神経保護性マクロファージを健常犬に投与したところ、副作用は認められなかった。今回の研究では臨床試験を実施できたDM症例は1例のみであり、治療の有効性を示すことができなかった。今後、症例数を増やし投与条件を検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

犬の変性性脊髄症に対する治療法は未だ確立されていない。したがって、本研究により新規治療法の開発が進んだことで獣医療に与えたインパクトは大きいと考えられる。また、神経炎症は変性性脊髄症以外の神経変性疾患でも起こることが報告されているため、神経保護性マクロファージを用いた治療法が確立されれば、様々な神経疾患に対して幅広く応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop a novel therapy for canine degenerative myelopathy using neuroprotective macrophages that regulate the neuroinflammation of the disease. We determined the optimum condition in the transformation from monocytes to neuroprotective macrophages. Thereafter, healthy dogs were given intravenously the prepared cells, and have not shown side effect. Unfortunately, only a case with degenerative myelopathy was included in this study, so that a novel therapy using neuroprotective macrophages could not be evaluated the effectiveness. In the future, we will require more cases of degenerative myelopathy and further modification of the therapy.

研究分野：獣医神経病学

キーワード：変性性脊髄症 犬 神経炎症 マクロファージ 単球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イヌの変性性脊髄症 (DM) は慢性進行性の脊髄変性疾患であり、四肢の進行性麻痺から始まり、最終的に発症後約 3 年で呼吸筋麻痺により死亡する。現在まで DM に対する有効な治療法は確立されていない。

これまでの研究成果から、DM 発症犬の脊髄白質および灰白質における神経炎症の存在が示された。神経炎症は神経細胞死 (非細胞自律性細胞死) を引き起こすことから、DM の病態に深く関与している可能性が高い。神経炎症では、抗原提示細胞であるミクログリアが中心的な役割を果たす。また、ミクログリアだけでなく末梢血単球が脊髄内に浸潤して炎症性マクロファージとなり、神経炎症を増悪させている可能性がある。このことから、神経炎症の制御ができれば、DM の進行を遅延させ発症を阻止できると考えた。

DM における神経炎症を制御するため、DM 発症犬から末梢血単球を採取し、神経保護性マクロファージに形質転換した後、静脈内に移入する細胞療法を着想した。移入した神経保護性マクロファージが DM 症例の末梢血から脊髄に移行することで、脊髄に存在するミクログリア/マクロファージによる神経炎症が抑制され、さらに神経保護性因子の分泌が促進されることが考えられる。この細胞療法により、神経炎症の制御に加え神経保護効果も期待できると考えた。

2. 研究の目的

神経保護性マクロファージを用いた DM に対する細胞療法を確立するため、末梢血単球を神経保護性マクロファージへと形質転換させる至適条件を決定し、細胞療法の安全性および有効性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 末梢血単球を神経保護性マクロファージに形質転換する至適条件の決定

正常犬の末梢血から分離した単球を刺激因子により刺激し、神経保護性マクロファージへと形質転換した。刺激した単球から total RNA を抽出し、real-time RT-PCR により炎症性サイトカイン (*TNF- α*) および抗炎症性サイトカイン (*IL-10*) の mRNA 転写量を定量し、神経保護性マクロファージに形質転換する至適条件を決定した。

(2) 形質転換した神経保護性マクロファージへの標識

生体への投与後も形質転換した神経保護性マクロファージを認識できるようにするため、MRI 装置で検出可能な超常磁性酸化鉄 (SPIO) を用いて標識した。標識後の単球を固定し、鉄染色を行うことで、SPIO を導入したマクロファージの割合を算出した。標識によって神経保護性マクロファージの表現型が変化しないことを確認するため、標識後に再度炎症性および抗炎症性サイトカインの転写量を測定した。

(3) 健常犬を用いた安全性試験

健常犬 3 頭に対して、神経保護性マクロファージを 1.0×10^4 cells/kg で投与した。副作用の有無を評価するため、投与 5 分、30 分、2 時間、8 時間、24 時間、3 日、7 日、2 週間、1 ヶ月および 3 ヶ月に一般身体検査を実施した。また、投与前、投与後 7 日および 1 ヶ月の時点で CBC 検査および血液化学検査を実施し、副作用の有無を評価した。

(4) DM 発症犬に対する臨床試験

疾患末期 (グレード 4/4) の DM 発症犬 1 頭に対して、神経保護性マクロファージを用いた細胞療法を実施した。

4. 研究成果

(1) 末梢血単球を神経保護性マクロファージに形質転換する至適条件

健常犬の末梢血を用いて単球分離条件を検討した。比重遠心法および接着培養法を用いて単球を分離した場合には精製率が 82-92%であったのに対し、比重遠心法および磁気ビーズ法を用いた場合には 86-99%であった。しかしながら、接着培養法を用いた方が分離できる単球数は磁

気ビーズ法より約5倍多くなることが明らかとなった。この結果を受け、本研究では比重遠心法および接着培養法を用いて単球を分離することにした。

単球を神経保護性マクロファージに形質転換するための刺激条件を検討したところ、ヒトマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) を添加して5日間培養し、その後イヌインターロイキン-4 (IL-4) を添加して2日間培養した場合、刺激前より刺激後の方が炎症性サイトカインの産生が低下し、抗炎症性サイトカインの産生が亢進することが明らかとなった (図1)。したがって、M-CSF および IL-4 を添加することで、末梢血単球を神経保護性マクロファージへ形質転換を誘導できると考えられた。

作製した神経保護性マクロファージを標識するため超常磁性酸化鉄 (SPIO) を培地へ添加すると、98-100%の神経保護性マクロファージが細胞質内に SPIO を取り込むことが明らかとなった (図2)。また、SPIO 導入後も神経保護性マクロファージの表現型は変化しないことが明らかとなった (図1)。

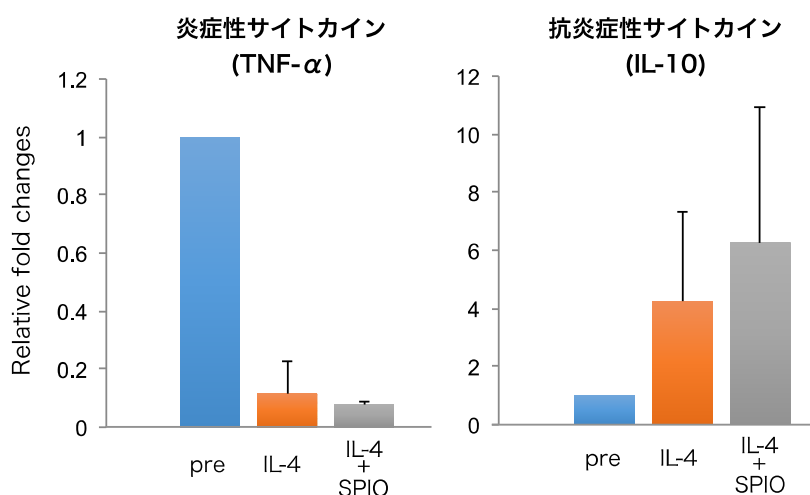


図1. 炎症性サイトカイン (TNF-) および抗炎症性サイトカイン (IL-10) の mRNA 転写量解析

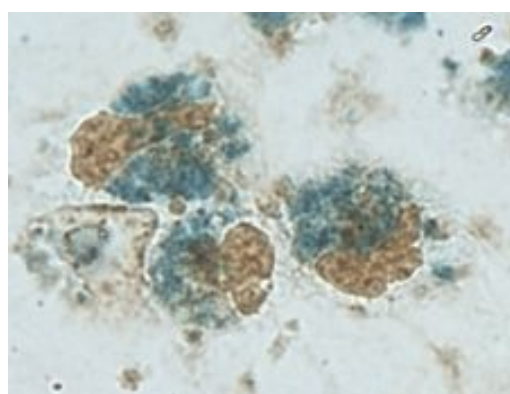


図2. 超常磁性酸化鉄により標識した神経保護性マクロファージ (青色：鉄、褐色：核)

(2) 健常犬を用いた神経保護性マクロファージ投与の安全性試験

健常犬の末梢血から、比重遠心法および接着培養法を用いて単球を分離した。分離した単球はヒト M-CSF およびイヌ IL-4 で刺激し、神経保護性マクロファージに形質転換した。その後、作製した神経保護性マクロファージを SPIO にて標識し、健常犬に投与して安全性を確認した。投与前、投与後5分、30分、2時間、8時間、24時間、3日、7日、2週間、1ヶ月および3ヶ月で身体検査を実施したが、特に異常は認められなかった。また、投与前、投与後7日および1ヶ月で血液検査を実施したが、特に変化は認められなかった。

(3) DM 発症犬に対する臨床試験

末期のDM症例 (stage4/4) に対してSPI0により標識した神経保護性マクロファージの投与を実施した。投与直後および投与後2時間の身体検査では特に異常を認めなかったが、投与後7日に斃死した。脊髄組織を鉄染色して神経保護性マクロファージの移行を確認したが、脊髄組織中にはSPI0を有した細胞は認められなかった。症例の死亡の直接的原因は明らかでないが、神経保護性マクロファージ投与後数日は全身状態に変化はなく、その後呼吸状態が悪化したことから、DMの病態により死亡した可能性が高いと考えられた。

今回臨床試験を実施した症例は末期の症例1例のみであったことから、神経保護性マクロファージを用いた細胞治療の効果および副作用について評価することが困難であった。今後、複数の症例に対する投与を実施し、長期の治療効果および副作用を評価する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔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)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
岐阜大学応用生物科学部獣医内科学研究室
<https://www1.gifu-u.ac.jp/~naikahp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁):

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。