

平成 21 年 4 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006-2008
 課題番号：18591147
 研究課題名（和文） 動物実験モデルを用いた小児急性脳脊髄炎に対する骨髄幹細胞移植療法の開発
 研究課題名（英文） Development of a bone marrow stem cell transplantation treatment for childhood acute encephalomyelitis using animal experimental models
 研究代表者
 市川 元基（ICHIKAWA MOTOKI）
 信州大学・医学部・教授
 研究者番号：60223088

研究成果の概要：

ラットの骨髄造血幹細胞を採取し、実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症時の中枢神経組織に移植したが、脳脊髄炎の臨床症状は移植群と非移植群の間に差はみられなかった。移植した骨髄造血幹細胞は脳脊髄炎を起こしていた腰部脊髄組織には確認できなかった。さらに NOD マウスに髄鞘オリゴデンドロサイト糖蛋白を感作して発症させた再発寛解型脳脊髄炎に骨髄造血幹細胞を移植した。この NOD マウスでは脳脊髄炎とともに視神経炎を起こしており、少量ではあるが移植した骨髄造血幹細胞が寛解期の視神経に確認され、今後骨髄造血幹細胞移植の生着の促進と臨床症状の改善に関する研究を行う必要がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	570,000	3,970,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：実験的自己免疫性脳脊髄炎、骨髄造血幹細胞移植

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ、麻疹、単純ヘルペスなど急性ウイルス感染症に伴う小児の脳炎・脳症は予防接種、インフルエンザに対する迅速診断法や抗ウイルス剤による治療法の進歩にもかかわらず現在でも重い神経学的後遺症

を残す可能性が高く、その治療法を開発すべき重要な疾患である。近年骨髄における造血幹細胞が心筋細胞や血管内皮細胞など、さまざまな細胞に分化する可能性が示唆されつつある。骨髄造血幹細胞を神経組織や神経細胞を支持するグリア細胞などに分化させることにより、小児の脳炎・脳症の治療に対し

て、骨髄造血幹細胞を移植することによって脳炎・脳症の症状の改善や、破壊された脳神経組織の再構築を図ることができる可能性が生まれており、この新しい脳炎に対する骨髄造血幹細胞移植療法について、実験的自己免疫性脳脊髄炎動物を用いて開発する。

2. 研究の目的

小児の急性ウイルス感染に伴う脳脊髄炎の発症にはウイルスそのものが中枢神経系に波及して症状を起こす場合とウイルス感染によって引き起こされる免疫担当細胞の異常な活性化に関わっている機序が想定されている。日本脳炎の予防接種の副反応として問題になった急性散在性脊髄炎あるいは麻疹脳炎は後者の機所による、つまり免疫担当細胞が中枢神経系で異常に活性化して炎症性サイトカインのストームが発生し、コントロール不能になるため脳炎を発症すると考えられている。小児のインフルエンザ脳炎・脳症の病態においても同様な機所が働いていると考えられている。実験的自己免疫性脳脊髄炎はラットあるいはマウスに髓鞘塩基性蛋白などの髓鞘蛋白を感作することにより免疫担当細胞の活性化を誘導し発症する脳脊髄炎であり、この動物実験モデルによる脳脊髄炎の発症機所は小児の急性ウイルス感染症に伴う脳炎の発症機所に近いと考えられている。この実験的自己免疫性脳脊髄炎に対して骨髄造血幹細胞を脳内に移植し、その治療効果を臨床的に解析する。

3. 研究の方法

(1) 急性一過性実験的自己免疫性脳脊髄炎の誘導：モルモットの中枢神経組織から髓鞘塩基性蛋白を抽出し、完全フロイントアジュバントと共に雌のルイスラットに感作して実験的自己免疫性脳脊髄炎を誘導する。

(2) タイラー脳脊髄炎ウイルス誘導による脱髄疾患の誘導：タイラー脳脊髄炎ウイルスを雌の SJL/J マウスの大脳半球に接種して脱髄疾患を発症させる。

(3) 慢性進行性実験的自己免疫性脳脊髄炎の誘導：髓鞘オリゴデンドロサイト糖蛋白の脳炎起炎ペプチドである 35-55 を完全フロイントアジュバントと共に雌の C57/BL6 マウスに感作して実験的自己免疫性脳脊髄炎を誘導する。

(4) 慢性再発寛解型実験的自己免疫性脳脊髄炎の誘導：髓鞘オリゴデンドロサイト糖蛋白の脳炎起炎ペプチドである 35-55 を完全フロイントアジュバントと共に雌の NOD マウスに感作して実験的自己免疫性脳脊髄炎を

誘導する。

(5) 臨床症状の判定：脳脊髄炎の臨床症状は以下のように判定する。1：尾のトーヌス低下、2：下肢の不全麻痺、3：下肢の完全麻痺、4：上肢の麻痺、5：瀕死状態あるいは死亡。

(6) 骨髄造血幹細胞の移植：雄のラットあるいはマウス大腿骨の骨髄から骨髄造血幹細胞を採取し、脳脊髄炎の発症期に大脳半球内あるいは脳室内に骨髄造血幹細胞を移植する。

(7) 病理組織：病理組織標本は動物をパラホルムアルデヒドで還流固定し、中枢神経組織を取り出して作成する。炎症所見はヘマトキシリン・エオジン染色を用いて、脱髄所見はクリューバ・バレラ染色を用いて観察する。移植した骨髄造血幹細胞の生着については Y 染色体プローブを用いることにより観察する。

4. 研究成果

(1) モルモットの中枢神経組織から髓鞘塩基性蛋白を抽出し、雌のルイスラットに完全フロイントアジュバントと共に感作し、実験的自己免疫性脳脊髄炎を誘導した。これにより一過性で寛解型の脳脊髄炎の動物実験モデル(ラット)を作成することができた。また、ミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白の脳炎起炎性分子であるリコンビナントミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白あるいはミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白 35-55 ペプチドを作成し、雌の NOD マウスあるいは雌の C57B/6 マウスに完全フロイントアジュバントと共に感作した。これらの手技により NOD マウスには再発寛解型の慢性脳脊髄炎、C57B/6 マウスには慢性進行性の脳脊髄炎の動物実験モデル(マウス)を作製することができた。マウスの脳脊髄炎の発症には個体差があり、NOD マウスにおいて再発寛解を繰り返す個体は 10 匹中 3~4 匹であり、C57B/6 マウスにおいて慢性進行性の脳脊髄炎は 10 匹中 4~5 匹であった。残りのマウスは脳脊髄炎を発症しない個体あるいは一過性で寛解型の脳脊髄炎のパターンをとる個体であった。さらにタイラー脳脊髄炎ウイルスを雌の SJL/J マウスの大脳半球に接種して、慢性進行性の脳脊髄炎の動物実験モデル(マウス)を作製することができた。

(2) これらの脳脊髄炎モデルラットあるいはマウスに対して雄ラットあるいは雄マウスの大腿骨から採取した骨髄造血幹細胞を脳脊髄炎発症期に大脳半球あるいは脳室内に移植した。ラットの急性一過性実験的自己免疫性脳脊髄炎、C57B/6 マウスの慢性進行性の脳脊髄炎、タイラー脳脊髄炎ウイルス誘導

による SJL/J マウスの慢性進行性の脳脊髄炎においては脳脊髄炎の臨床症状に関して骨髓造血幹細胞移植群と移植しなかった群との間に差はみられず、また移植した骨髓造血幹細胞はほとんど脳脊髄炎を起こした腰部脊髄組織には確認できなかつた。NOD マウスに誘導した慢性再発寛解型実験的自己免疫脳脊髄炎においても臨床症状に関して骨髓造血幹細胞移植群と移植しなかった群との間に差はみられなかつたが、このマウスは脊髄炎とともに視神経炎および小脳や脳幹部における血管周囲炎を起こしており、少量ではあるが移植した骨髓造血幹細胞が寛解期の視神経に確認された。このことは骨髓造血幹細胞移植を脳脊髄炎の治療に用いることができる可能性を示唆している。各種サイトカインの動態が骨髓造血幹細胞移植における移植細胞の生着に関係していると考えられるため、今後は炎症性サイトカインおよび調節性サイトカインの各病期における動態を調べ、これらのサイトカインを骨髓造血幹細胞移植の前後に脳脊髄炎発症動物に投与し、移植した骨髓造血幹細胞生着の促進と臨床症状の改善に関する研究を行う必要があると考えられた。

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 9 件)

1. Sekiguchi Y, Ichikawa M 他 6 名 Antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein are not involved in the severity of chronic non-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology Letters* 122, 145-149, 2009 (査読有り)
2. Uchida N, Shiohara M 他 3 名 A novel nonsense mutation of the mineralocorticoid receptor gene in the renal form of pseudohypoaldosteronism type 1. *J Pediatr Endocrinol Metab* 22, 91-95, 2009 (査読有り)
3. Matsuda K, Nakazawa Y, Sakashita K, Shiohara M 他 2 名 Acquisition of loss of the wild-type NRAS locus with aggressive disease progression on a patient with juvenile myelomonocytic leukemia and a heterozygous NRAS mutation. *Haematologica* 92, 1576-1578, 2007 (査読有り)
4. Hidaka E, Tanaka M, Matsuda K, Ishikawa-Matsumura M, Yamauchi K, Sano K, Honda T, Wakui K, Yanagisawa R, Nakazawa Y, Sakashita K, Shiohara M 他 2 名 A complex karyotype, including a three-way translocation generating a NUP98-HOXD13 transcript, in an infant with acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 176, 137-143, 2007 (査読有り)
5. 坂口けさみ, 大平雅美, 湯本敦子, 上條陽子, 芳賀亜紀子, 徳武千足, 本郷実, 市川元基 他 2 名 尿失禁を有する一般女性の QOL と関連する要因について. *母性衛生* 48, 323-330, 2007 (査読有り)
6. Matsuda K, Shimada A, Yoshida N, Ogawa A, Watanabe A, Yajima S, Iizuka S, Koike K, Yanai F, Kawasaki K, Yanagimachi M, Kikuchi A, Ohtsuka Y, Hidaka E, Yamauchi K, Tanaka M, Yanagisawa R, Nakazawa Y, Shiohara M 他 3 名 Spontaneous improvement of hematologic abnormalities in patients having juvenile myelomonocytic leukemia with specific RAS mutations. *Blood* 109, 5477-5480, 2007 (査読有り)
7. Tanaka M, Gombart AF, Koeffler HP, Shiohara M Expression of bactericidal/permeability-increasing protein requires C/EBP epsilon. *Int J Hematol* 85, 304-311, 2007 (査読有り)
8. Shiohara M 他 6 名 Effect of parathyroid hormone administration in a patient with severe hypoparathyroidism caused by gain-of-function mutation of calcium-sensing receptor. *Endocr J* 53, 797-802, 2006 (査読有り)
9. Matsuura H, Shiohara M 他 4 名 Novel compound heterozygous mutation of the MC2R gene in a patient with familial glucocorticoid deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab* 19, 1167-1170, 2006 (査読有り)

[図書] (計 1 件)

市川元基 他 47 名 日本小児医事出版社

ナーズとコメディカルのための小児科学
pp148-156, 2006

6. 研究組織

(1)研究代表者

市川 元基 (ICHIKAWA MOTOKI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：60223088

(2)研究分担者

塩原 正明 (SHIOHARA MASA AKI)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号：00293514