

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390180

研究課題名(和文) 神経変性疾患に対する骨髄幹細胞移植による新規治療法開発の基礎研究

研究課題名(英文) Basic reserach for developing a new therapy by transplantation of mesenchymal stem cells against neurodegenerative diseases

研究代表者

下濱 俊 (Shimohama, Shun)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：60235687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、自己の骨髄幹細胞による細胞移植治療が難治性神経変性疾患の制圧に向けた治療体系の新たな選択肢になりうるか否かを明らかにすることを目的とした。ヒト骨髄間葉系幹細胞の静脈内投与は6-OHDA線条体導入パーキンソン病モデルラットに対し、メタンフェタミン誘発異常旋回運動を抑制し、6-OHDA誘導ドーパミン神経細胞死を有意に抑制していることが確認された。また、Iba1を用いたミクログリア活性比較解析においてヒト骨髄間葉系幹細胞移植によりミクログリア活性抑制効果が認められた。以上より、ヒト骨髄間葉系幹細胞はパーキンソン病の進行性の神経変性に対して神経保護作用を示す可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To explore a novel therapy against Parkinson disease, we evaluated the therapeutic effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hBM-MSCs) in 6-OHDA induced Parkinson disease model rats. Intravenous administration of hBM-MSCs inhibited methamphetamine-stimulated rotational behavior at 7, 14, 21 and 28 days after transplantation. Rats injected with hBM-MSCs displayed significant preservation of tyrosine hydroxylase (TH)-positive fibers in the striatum and the number of TH-positive neurons in the substantia nigra compacta (SNpc). In contrast, the immunoreactivity of ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) was markedly inhibited by intravenous administration of hBM-MSCs. The findings that hBM-MSCs attenuate 6-OHDA-induced dopaminergic neurodegeneration and glial activation raise the possibility that hBM-MSCs could be a novel therapeutic option to prevent Parkinson disease development.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：パーキンソン病 骨髄間葉系細胞 移植 治療 神経変性疾患 再生 血液脳関門

## 1. 研究開始当初の背景

日本は世界一の長寿・高齢化社会で、アルツハイマー病やパーキンソン病などの老年性神経変性疾患が急増している。いずれも現在の治療はアセチルコリンやドーパミンの補充による対症療法であり、薬剤投与中もシナプス脱落や神経細胞死が進行し、病状の進行は阻止できない。長期にわたる介護に要する労働力不足、および医療経済的にも画期的新規治療法の開発が必要である。

神経変性疾患の特徴は、神経細胞の変性・脱落とともに、アストロサイトやミクログリアの活性化や増殖といった多彩な応答が時間的にも空間的にも惹起されていることである。申請者らは、神経変性疾患に対する理想的な治療法は、障害を受け細胞死に至る神経細胞を保護し、生き残った神経細胞を修復・再生すること、さらに細胞を補充・移植し、機能する神経回路網を再構築することであると考えている。その方法の一つとして再生医療が現実的かつ有望である。

近年の生命科学の進歩により、自己複製能と多分化能を有する幹細胞が発見されたことにより、脳神経疾患に対しても再生医療という新しい治療が期待されるようになった。再生医療におけるドナー細胞の候補として、胚性幹細胞 (ES細胞)、人工多能性幹細胞 (iPS細胞)、神経幹細胞、骨髄幹細胞が有力である。近年注目されているより未分化な幹細胞であるES細胞やiPS細胞の利用も考えられるが、分化制御や治療効果の検証、腫瘍性等の安全性の検証、倫理的な諸問題等により、早急な実用化は期待できない。神経幹細胞の研究開発も世界的に行われているが、問題点も多く実用化への道は遠い(Nat Rev Neurosci 7:395-406,2006)。細胞の入手方法として、堕胎児由来の神経幹細胞を用いる方法と成人脳由来の神経幹細胞を用いる方法が考えられる。堕胎児を使用することは、倫理的問題も未解決であり、一般的な医療として広く定着するとは安易に推測できない。一方、成人脳由来の神経幹細胞を用いる場合は、自己の細胞を使用でき得る利点はあるが、正常の脳組織の一部を採取することが必要であり、組織採取手術の危険性は皆無でないことを考慮すると、比較的侵襲度の高い治療と言わざるを得ない。また、同細胞を培養して治療に必要な細胞数まで増やすためには、長時間を要するため速やかな対応は困難である。我々は、上記問題を解決すべく、自己の骨髄幹細胞を用いた細胞移植療法に注目した。神経再生のドナー細胞として有望である多分化能を有する幹細胞は、神経幹細胞のような成人の臓器毎に存在し臓器特異的に分化する臓器特異的幹細胞の他に、trans-differentiationが可能な未熟な臓器非特異的幹細胞がある。連携研究者の本望は、これまでの基礎研究で、骨髄間葉系幹細胞

(MSC) が神経再生医療に極めて有用であることを世界に先駆けて明らかにした。骨髄中の細胞の中でも特に神経系細胞へ高率に分化誘導が可能な、CD34(-)、CD45(-)、CD73(+)、CD105(+)、SH2(+)、SH3(+ )等の表面マーカーの発現プロファイルにより特徴付けられるMSCを同定し、この細胞を神経系細胞へ分化誘導する方法を開発し、多くのin vivoの動物実験を経て、既に脳梗塞亜急性期の患者を対象として自己由来のMSCを静脈内投与する臨床研究をスタートしている。現在までのところ重篤な副作用は認められなく、また、従来の脳梗塞治療と比べて、治療効果が上がっていることを示唆する所見も得られている。

一方、神経変性疾患に対する骨髄幹細胞移植研究は実験的にも臨床的にもほとんどなされていない。臨床研究として、筋萎縮性側索硬化症患者の脊髄へMSCを移植し症状の進行の抑制や筋力アップを認めたとの報告(Mazzini L et al. Amyotroph Lateral Scler Motor Neuron Disord 4:158-161, 2003)や多系統萎縮症患者へMSCを動脈内および静脈内投与して症状および脳代謝の改善を認めたとの報告(Lee PH et al. Clin Pharmacol Ther 83:723-30,2008)がある。しかしながら、臨床応用を始める前には疾患モデル動物を用いた詳細な基礎研究が必須である。研究代表者の下濱はこれまでアルツハイマー病やパーキンソン病の発症機序の解明ならびに新たな治療法の開発を目指して、剖検脳の生化学的解析や神経変性疾患の細胞および動物モデルの作製を進め、神経栄養因子、神経伝達物質、サイトカインなど生理活性物質の神経保護作用とその分子機構を研究してきた(Proc Natl Acad Sci USA 86: 9011-4,1989; 99:3288-93,2002; Neuron 15: 253-7,1995; Ann Neurol 42:159-63,1997; 44:110-9,1998; 44:796-807,1998; FASEB J 14:1202-14,2000; 16: 601-03,2002; J Biol Chem 276:13541-46,2001;278:12130-4,2003;279:1071 0-9,2004; 282: 4364-72, 2007; 282:15823-32,2007; J Neurosci 21: 3017-23, 2001; JAMA 293:932-,2005; Am J Pathol 175:17-24, 2009)。また、脳構成細胞の1つであるミクログリアの脳移植が脳内Aβ除去に有効であることを動物実験で明らかにした(FEBS Lett. 581: 475-478, 2007)。近年、国外のいくつかの研究グループにより、骨髄造血系幹細胞の骨髄単核球細胞がミクログリアに分化し得ること(Exp. Neurol. 186:134-144, 2004; FASEB J. 18: 998-1000, 2004; Neurobiol. Dis. 18:134-142, 2005)、さらに、脳内にAβプラークを形成する遺伝子改変マウスに末梢よりマウス由来の骨髄幹細胞やヒト臍帯血細胞を移植すると、骨髄幹細胞はミクログリアに分化しAβプラークに集積することが報告された(Neuron 49:489-502, 2006, Stem Cells

Dev 17:423-439,2008)。また、パーキンソン病モデル動物への MSC 脳内移植により機能改善を示したとの研究報告もなされている (*J. Neurochem.* 107:141-151, 2008)。本研究は、骨髄幹細胞移植を神経変性疾患に対する新規治療法として開発するために、動物実験により科学的根拠に基づく有効性と安全性の評価を行うことを目的に計画した。

## 2. 研究の目的

本研究では、アルツハイマー病およびパーキンソン病モデル動物に骨髄幹細胞（骨髄間葉系幹細胞および骨髄単核球細胞）を移植し、病態に対する（1）治療効果およびその作用メカニズムを詳細に解析し、（2）作用メカニズムに基づく治療効果の増強方法を検討することにより、（3）自己の骨髄幹細胞による細胞移植治療が難治性神経変性疾患の制圧に向けた治療体系の新たな選択肢になりうるか否かについて判断できる基礎的資料を提供することを研究目的とする。

## 3. 研究の方法

### （1）移植細胞の調製・培養

神経系細胞への分化能、遊走能およびケモカインや神経栄養因子分泌能を有する、骨髄間葉系幹細胞を移植細胞として用いた。骨髄間葉系幹細胞は線維芽細胞様の紡錘形の接着細胞であり、血清培地、プラスチック培養皿を用い 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で特性を維持した状態で培養可能である。以前よりマウスおよびラット骨髄間葉系幹細胞の分離・培養方法は確立しているが (*Brain Res.* 1123:27-33, 2006)、今回の研究では臨床応用を念頭にヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hBM-MSC) を選択した。表面マーカープロファイルが検証済の hBM-MSC を購入し上記条件下にて培養した。移植に用いる細胞の継代数は 6 回までとした。

（2）パーキンソン病ラット作製、細胞移植  
9 週齢 200-240g の Sprague-Dawley 雌性ラットをケタミン、キシラジン深麻酔下で脳定位装置に固定した。0.02% アスコルビン酸を含む滅菌生理食塩水を溶媒に用い、6-hydroxydopamine (6-OHDA) 40 nmol をそれぞれ左線条体背内側、腹外側にマイクロシリンジを用いて微量投与した。投与部位はブレグマを起点として前方 0.5 mm、左側方 2.5 mm、腹側 5.0 mm 及び後方 0.5、左側方 4.2 mm、腹側 5.0 mm とし、incisor bar を 3 mm 腹側に設定した。各溶液量は 5  $\mu$ L とし 5 分間かけて投与と行い、投与後 5 分間針を静置し、その後ゆっくりシリンジを引き上げた。薬物投与後 14 日目にメタンフェタミン誘発旋回運動を 120 分間測定し 1 分間あたりの回転数が 6 回転以上 20 回転未満のラットをパ

ーキンソン病ラット (PD ラット) とし本研究の対象とした。PD ラットを 2 群に分け、1 群を移植群として左大腿静脈より 1 個体あたり hBM-MSC  $1 \times 10^7$  個、PBS 0.5 ml に希釈し投与した。非移植群には溶媒として用いた PBS のみを投与した。

### （3）移植群、非移植群の行動学的、免疫組織学的比較解析・評価

移植後 1 週間おきにメタンフェタミン誘発旋回運動を測定し行動学的評価を行い、4 週間の観察の後、PBS、4% パラホルムアルデヒドでラットを灌流固定した。ラット脳を摘出し 4% パラホルムアルデヒドで後固定後、10%、20% スクロースに浸漬した。その後、ラット脳を急速凍結しクリオスタットを用いて薄切切片を得た。抗 tyrosine hydroxylase (TH) 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、線条体、中脳黒質切片におけるドーパミン産生神経細胞の染色性を免疫組織学的に比較した。また、抗 ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) 抗体を用いて同様に染色を行い、6-OHDA 投与部位である背内側線条体切片におけるミクログリア活性を群間比較した。更に組織切片を同一条件で撮像した顕微鏡画像を用いて半定量的比較解析を行った。線条体 TH 染色半定量比較解析はブレグマを基点として 0.3 mm 前方、0.6 mm 後方、1.6 mm 後方の切片を用い病側の線条体の光学濃度を対側の脳皮質との比から算出した。中脳黒質 TH 陽性細胞半定量比較解析はステレオロジーに基づき 240  $\mu$ m 間隔、計 6 枚の中脳黒質切片を使用し Stereo Investigator を用いて解析を行った。ミクログリア活性の半定量化は 6-OHDA 投与背内側線条体切片のミクログリア集積領域  $4 \times 1.5$  mm<sup>2</sup> を関心領域とし一定の閾値のもと 2 値化し面積を算出した。統計処理は Student の t 検定を行い、有意水準 5% 未満を有意差ありとした。

## 4. 研究成果

（1）メタンフェタミン誘発旋回運動解析  
移植 1 週目より移植群では非移植群に比し有意にメタンフェタミンによる異常旋回運動の低下がみられた。この抑制効果は移植 4 週目まで維持された。

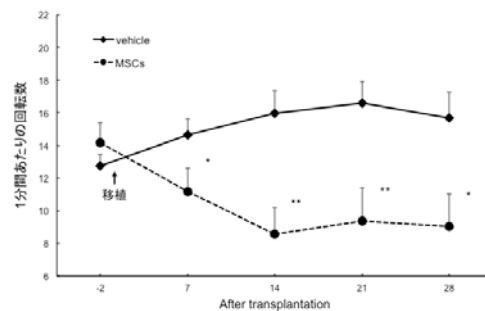


図1 6-OHDA 線条体投与後 hBM-MSC 移植, 非移植ラット群のメタンフェタミン旋回運動における経時変化, 平均値+標準誤差(SE), \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

(2) 線条体 TH 免疫染色比較解析

非移植群では移植群に比較し, 線条体においてびまん性に TH 染色の低下が認められた。移植群では 6-OHDA 投与中心部での染色低下は認められたものの, その周辺において染色性が維持されていた。光学濃度比による比較解析においても移植群では非移植群に比べ有意に染色性が維持されていた。

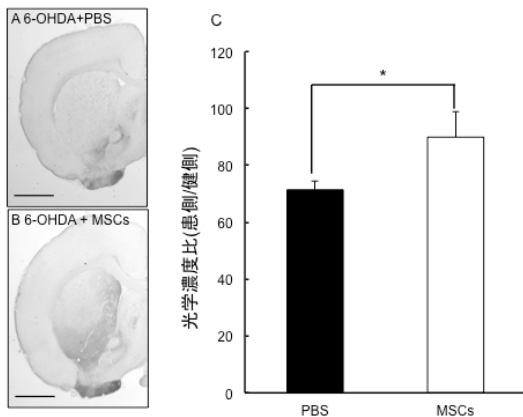


図2 各群ラットにおける線条体 TH 免疫組織化学染色像, 半定量比較解析

A: 非移植群, B: 移植群, C: 各群ラットにおける線条体 TH 光学濃度半定量解析

Scale bar 2 mm, 平均値+標準誤差, \* $P < 0.05$ .

(3) 中脳黒質 TH 免疫染色比較解析

非移植群では移植群に比較し, 中脳黒質緻密層において TH 陽性細胞の染色低下を認めた。ステレオインベスティゲータを用いた比較解析においても移植群では非移植群に比べ有意に染色細胞数が維持されていた。

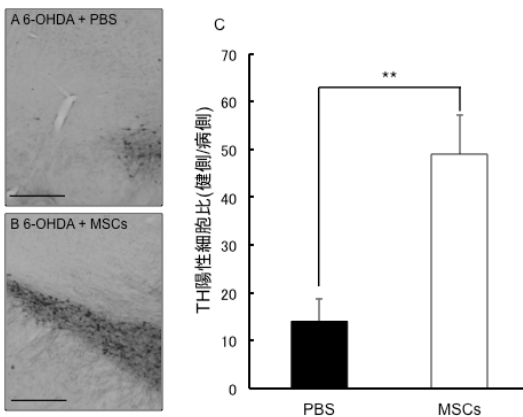


図3 各群ラットにおける中脳黒質 TH 免疫組織化学染色像, 半定量比較解析

A: 非移植群, B: 移植群, C: 各群ラットにおける中脳黒質 TH 免疫細胞数半定量解析

Scale bar 200  $\mu\text{m}$ , 平均値+標準誤差, \*\* $P < 0.01$

(4) 背内側線条体 Iba1 染色比較解析

非移植群でミクログリアは細胞体の肥大化, 突起の退縮を認め, 活性型を示した。しかし移植群では, ミクログリア突起を枝状に伸長させた, 細胞体の小さい静止型を観察した。Iba1 染色面積を比較したところ移植群において有意な面積の低下があることが確認された。

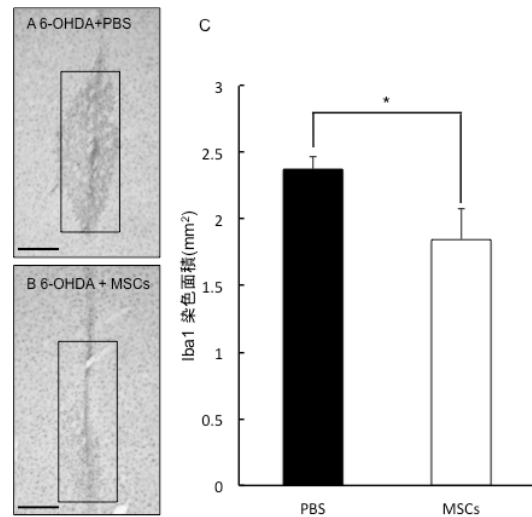


図4 各群ラットにおける線条体 Iba 免疫組織化学染色像, 定量比較解析

A: 非移植群, B: 移植群, C: 各群ラットにおける線条体 Iba1 面積

Scale bar 1 mm, 平均値+標準誤差, \* $P < 0.05$ .

まとめ

本研究により, hBM-MSC が 6-OHDA 線条体導入 PD ラットに対し, メタンフェタミン誘発異常旋回運動を抑制し, TH 免疫組織学的染色において 6-OHDA 誘導ドーパミン神経細胞死を有意に抑制していることが確認された。また, Iba1 を用いたグリア活性比較解析において hBM-MSC はグリア活性抑制効果が認められた。以上より, hBM-MSC はパーキンソン病の進行性の神経変性に対して神経保護作用を示す可能性があることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) Suzuki S, Kawamata J, Matsushita T, Matsumura A, Hisahara S, Takata K, Kitamura Y, Kem W, Shimohama S. 3-[(2,4-Dimethoxy)benzylidene]-anabasei nedihydrochloride protects against 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian neurodegeneration through  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor stimulation in rats. *J Neurosci Res*. 91(3): 462-71(2013) (査読有) doi: 10.1002/jnr.23160.

(2) Matsushita T, Kibayashi T, Katayama T, Yamashita Y, Suzuki S, Kawamata J, Honmou O, Minami M, Shimohama S. Mesenchymal stem cells transmigrate across brain microvascular endothelial cell monolayers through transiently formed inter-endothelial gaps. *Neurosci Lett*, 502:41-45 (2011) (査読有) doi:10.1016/j.neulet.2011.07.021

〔学会発表〕(計4件)

(1) 木林達也、片山貴博、松下隆司、永井健治、下濱俊、南雅文  
Development of an in vitro imaging system for the study of the mechanisms underlying mesenchymal stem cell transmigration across the blood brain barrier.  
第55回日本神経化学学会大会  
2012年9月30日-10月2日  
神戸国際会議場(兵庫)

(2) 片山貴博、木林達也、松下隆司、本望修、下濱俊、南雅文  
Mesenchymal stem cells transmigrate across the blood-brain barrier through transiently formed interendothelial gaps.  
第85回日本薬理学会年会  
2012年3月14-16日  
国立京都国際会館(京都)

(3) 木林達也、松下隆司、片山貴博、下濱俊、南雅文  
In vitro 血液脳関門モデルを用いた骨髄間葉系幹細胞の動態解析  
第62回日本薬理学会北部会  
2011年9月29-30日  
江陽グランドホテル(宮城)

(4) 片山貴博、松下隆司、木林達也、本望修、下濱俊、南雅文  
Mesenchymal stem cells transmigrate across brain microvascular endothelial

cell monolayers through transiently formed interendothelial gaps.

第54回日本神経化学学会大会  
2011年9月26-28日  
ホテル瑠璃光(石川)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

下濱 俊 (SHIMOHAMA SHUN)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 60235687

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

本望 修 (HONMOU OSAMU)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 90285007