

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 30 日現在

機関番号：83902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790392

研究課題名(和文) 骨髄内骨髄移植によるミクログリア再生と神経幹細胞補充を介した脳老化病態の制御

研究課題名(英文) Regulation of brain aging by renewal of microglia and recruitment of neural stem cell by intra-bone marrow-bone marrow transplantation

研究代表者：石井 さなえ (HASEGAWA-ISHII SANAE)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・病理学部・リサーチレジデント

研究者番号：40435863

研究成果の概要(和文)：

GFP遺伝子導入C57BL/6マウスをドナーとした同系骨髄内骨髄移植を行った結果、健常脳において骨髄由来細胞は、髄膜・脈絡叢・血管周囲腔と血液脳関門が不完全な脳室周囲器官に進入した。血液脳関門が正常に形成されている大部分の脳実質領域には進入しなかったが、限定された離散的な小領域には進入した。脳実質に進入した骨髄由来細胞は全てIba-1を発現する骨髄系細胞であり、アストロサイトやオリゴデンドロサイト、ニューロンには分化しなかった。SAMP10マウス(SAMP10)をレシピエントとした同種骨髄内骨髄移植を行った結果、SAMP10ではより広範囲でより高密度に骨髄由来細胞が進入した。老齢SAMP10をレシピエントとした骨髄内骨髄移植の4ヵ月後にモリス水迷路を行ったが、老齢SAMP10の学習の改善は見られなかった。移植後の末梢血中のT細胞の回復が良好ではなかったことが原因の一つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：

After syngeneic intra-bone marrow-bone marrow transplantation (IBM-BMT), marrow-derived cells rapidly appeared in the leptomeninges, choroid plexus, perivascular regions and circumventricular organs, which lack the blood-brain barrier (BBB). Marrow-derived cells entered several small discrete regions of the brain parenchyma, although they did not enter the remaining major part. Marrow-derived cells exhibited ramified morphology and expressed Iba-1 but not GFAP, CNPase or NeuN, indicative of the myeloid lineage. In chimeras in which SAMP10 mice were recipients, a larger number of donor-derived cells entered more regions than in chimeras in which B6 mice were recipients. After allogeneic IBM-BMT, the learning ability of old SAMP10 mice was not ameliorated, which may be due to the failure in the recovery of peripheral T cells after IBM-BMT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：骨髄内骨髄移植、ミクログリア、脳老化病態

1. 研究開始当初の背景

老化促進モデルマウスの一系統である SAMP10 は、前頭皮質・辺縁系を主体に加齢性神経変性を自然発症する脳老化病態モデルである。私はこれまでに、SAMP10 では神経変性発症以前から脳内免疫担当細胞であるミクログリアの形態と神経保護機能に異常があることを発見した。ミクログリアは骨髄由来の単球系を起源とし、成体脳においても常時新規細胞に置換される。そこで、正常系統の骨髄を移植することによって SAMP10 のミクログリアを健全なものに置換できれば、脳老化病態を抑制できるのではないかと考えた。

2001 年に関西医科大学の池原進教授らは、骨髄細胞を髄腔内に直接注入する「骨髄内骨髄移植法」を確立した。この方法により、多能性造血幹細胞だけでなく間葉系幹細胞も効率よく骨髄内へ移植され、ドナー由来細胞の骨髄への定着効率が高まり、造血機能の早期回復と生着不全の抑制が実現された。この方法を用いて、加齢に伴う肺気腫や骨粗鬆症などの難病が実験的に予防・治療可能となることが実証されているが、神経変性における効果やドナー由来細胞がどの細胞に分化するかなどの基礎的知見はまだ得られていない。パイロット実験として GFP マウスをドナーとする骨髄内骨髄移植を行ったところ、ドナー由来細胞は各組織で免疫系細胞に分化し、脳ではミクログリアに分化した。加えて小腸では陰窩上皮に、脳では歯状回顆粒層下層に分布した。これらの結果は、骨髄細胞が各組織に浸潤して免疫系細胞のみならず組織幹細胞にも分化する可能性を示す

成体組織においては損傷細胞や老廃細胞の除去と新生細胞の増殖・分化がバランスよく起こり組織構築が保たれる。「除去」は免疫系細胞が、「新生」は組織幹細胞が担当する。パイロット実験や、組織幹細胞の一部は骨髄から供給されるという最近の報告から、骨髄は免疫系細胞と組織幹細胞という組織構築の維持に必要な細胞基盤を供給する役割を持つと考えた。免疫系細胞や組織幹細胞は加齢に伴い数や機能が低下するが、骨髄中の造血系幹細胞や間葉系幹細胞もまた加齢の影響を受ける。

従って私は、加齢に伴う骨髄の機能低下により各組織への細胞供給のバランスが崩れ、組織構築の恒常性が破綻する現象が老化の本態であり、この考えを証明することが老化病態の解明に重要だと考えた。

2. 研究の目的

(1) 骨髄由来細胞が脳内のどの部位にどの

ような時間経過で進入し、どの細胞に分化するかを調べる。

(2) 骨髄由来細胞の脳への進入が脳老化病態によりどのように変化するかを調べる。

(3) 骨髄内骨髄移植法により脳老化病態が予防できるかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) GFP 遺伝子導入 C57BL/6 マウス (GFP-B6) をドナー、C57BL/6 マウス (B6) をレシピエントとしたシンジェニック骨髄移植を行い、その 2 週、1、4、8 ヶ月後にレシピエントマウスを固定し、GFP に対する免疫組織化学的染色によりドナー由来細胞を同定した。骨髄移植の方法として、従来行われてきた静脈注射による移植法と、骨髄内骨髄移植法を比較した。

(2) GFP-B6 をドナー、B6 (若齢、老齢) と SAMP10 (若齢、老齢) をレシピエントとした骨髄内骨髄移植を行い、4 ヶ月後に固定し、GFP に対する免疫組織化学的染色によりドナー由来細胞を同定した。

(3) GFP-B6 をドナー、老齢 SAMP10 をレシピエントとした骨髄内骨髄移植を行い、さらに 4 ヶ月間飼育した後、モリス水迷路により記憶学習能を調べた。

4. 研究成果

(1) 健常脳における骨髄由来細胞の頭蓋内進入：骨髄由来細胞は頭蓋内において髄膜・脈絡叢・血管周囲腔と、血液脳関門が不完全な脳室周囲器官には移植後 2 週から 1 ヶ月間に進入した。血液脳関門が正常に形成されている大部分の脳実質領域には骨髄由来細胞は進入しなかったが、限定された離散的な小領域にのみ移植 4-8 ヶ月後に進入し、突起を持つ形態に分化した。脳実質に進入した骨髄由来細胞は全て Iba-1 を発現する骨髄系細胞であり、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ニューロンには分化しなかった。神経幹細胞への分化も確認できなかった。

(2) 骨髄由来細胞の頭蓋内進入における加齢変化：骨髄内骨髄移植 4 ヶ月後、レシピエントの B6 も SAMP10 も、骨髄由来細胞は髄膜、脈絡叢、血管周囲腔、脳質周囲器官に進入した。血液脳関門が正常に形成されている脳実質においては、限定された離散的な小領域にのみ進入した。B6 に比べて SAMP10 の方が、より広範囲でより高密度に骨髄由来細胞が進入した。脳実質に進入した骨髄由来細胞は、脳実質中のアストロサイト、オリゴデンドロサイトと非常に近接した。

(3) 骨髄内骨髄移植による脳老化病態の予防：キメラ SAMP10 マウスは学習が改善したとはいえなかった。末梢血を用いた FACS 解

析のデータから、移植後の T 細胞の回復が良好ではないことが明らかになり、それが原因の一つと考えられた。

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 10 件) 全て査読有

①島田厚良、石井さなえ。脳と免疫系の相互作用という観点から老化促進モデルマウスをとらえる。基礎老化研究。36(1): 13-20. 2012

②Hasegawa-Ishii, S., Takei, S., Inaba, M., Umegaki, H., Chiba, Y., Furukawa, A., Kawamura, N., Hosokawa, M., and Shimada, A. Defects in cytokine-mediated neuroprotective glial responses to excitotoxic hippocampal injury in senescence-accelerated mouse. Brain Behav. Immun. 25 (1): 83-100. 2011

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Defects%20in%20cytokine-mediated%20neuroprotective%20glial%20responses%20to%20excitotoxic%20hippocampal%20injury%20in%20senescence-accelerated%20mouse>.

③Hasegawa-Ishii, S., Takei, S., Chiba, Y., Furukawa, A., Umegaki, H., Iguchi, A., Kawamura, N., Yoshikawa, K., Hosokawa, M., and Shimada, A. Morphological impairments in microglia precede age-related neuronal degeneration in senescence-accelerated mice. Neuropathology. 31: 20-28. 2011
doi: 10.1111/j.1440-1789.2010.01126.x.

④ Shimada A. and Hasegawa-Ishii S. Senescence-accelerated mice (SAMs) as a model for brain aging and immunosenescence. Aging Dis. 2(5): 414-435. 2011
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Senescence-accelerated%20mice%20\(SAMs\)%20as%20a%20model%20for%20brain%20aging%20and%20immunosenescence](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Senescence-accelerated%20mice%20(SAMs)%20as%20a%20model%20for%20brain%20aging%20and%20immunosenescence).

⑤島田厚良、石井さなえ。免疫系と神経系の接点から老化促進モデルマウスをとらえる。日本老年医学会雑誌。48(5): 439-446. 2011

⑥Hoshino S., Kurishima A., Inaba M., Ando Y., Fukui T., Uchida K., Nishio A., Iwai H., Yokoi T., Ito T., Hasegawa-Ishii S., Shimada A., M. Li, K. Okazaki, S. Ikehara. Amelioration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by immunoregulatory dendritic cells. J.

Gastroenterol. 46(12): 1368-1381. 2011
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Amelioration%20of%202C4%2C6-trinitrobenzene%20sulfonic%20acid-induced%20colitis%20in%20mice%20by%20immunoregulatory%20dendritic%20cells>.

⑦ Yoshikawa, K., Takei, S., Hasegawa-Ishii, S., Chiba, Y., Furukawa, A., Kawamura, N., Hosokawa, M., Woodward, D.F., Watanabe, K., and Shimada, A. Preferential localization of prostamide/prostaglandin F synthase in myelin sheaths of the central nervous system. Brain Res. 1367: 22-32. 2011
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Preferential%20localization%20of%20prostamide%2Fprostaglandin%2F%20synthase%20in%20myelin%20sheaths%20of%20the%20central%20nervous%20system>.

⑧ Chiba Y., Takei S., Kawamura N., Kawaguchi Y., Sasaki K., Hasegawa-Ishii S., Furukawa A., Hosokawa M., Shimada A. Immunohistochemical localization of aggresomal proteins in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. Neuropathol. Appl. Neurobiol. In press 2011
doi: 10.1111/j.1365-2990.2011.01229.x.

⑨ Furukawa A., Kawamoto Y., Chiba Y., Takei S., Hasegawa-Ishii S., Kawamura N., Yoshikawa K., Hosokawa M., Oikawa S., Kato M., and Shimada A. Proteomic identification of hippocampal proteins vulnerable to oxidative stress in excitotoxin-induced acute neuronal injury. Neurobiol. Dis. 43(3): 706-714. 2011
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Proteomic%20identification%20of%20hippocampal%20proteins%20vulnerable%20to%20oxidative%20stress%20in%20excitotoxin-induced%20acute%20neuronal%20injury.%20>

⑩ Furukawa, A., Oikawa, S., Hasegawa-Ishii, S., Chiba, Y., Kawamura, N., Takei, S., Yoshikawa, K., Hosokawa, M., Kawanishi, S., and Shimada, A. Proteomic analysis of aging brain in SAMP10 mouse: a model of age-related cerebral degeneration. Mech. Ageing Dev. 131: 379-388. 2010
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Proteomic%20analysis%20of%20aging%20brain%20in%20SAMP10%20mouse%3A%20a%20model%20of%20age-related%20cerebral%20degen>

eration.

〔学会発表〕(計 11 件)

①Takei S., Hasegawa-Ishii S., Uekawa A., Furukawa A., Chiba Y., Kawamura N., Hosokawa M., Woodward DF., Watanabe K., Shimada A. Immunohistochemical demonstration of enhanced prostaglandin F_{2α} production following kainic acid-induced seizures in rat hippocampus. Bio Active Lipid Meeting. 2011 年 9 月 19 日. Seattle

②千葉陽一, 武井史郎, 石井さなえ, 細川昌則, 島田厚良, 小森拓. 学習の遅れと歩行障害で発症し, 多彩な神経症状が進行した男性の剖検例. 第 3 回日本神経病理学会東海・北陸地方会. 2011 年 9 月 10 日. 愛知

③石井さなえ, 稲葉宗夫, 武井史郎, 河村則子, 千葉陽一, 細川昌則, 島田厚良. SAMP10 に見られるサイトカインを介した神経保護的グリア応答の低下. SAM 研究協議会. 2011 年 7 月 8 日. 岐阜

④Hasegawa-Ishii S., Takei S., Shimada A. Defects in cytokine-mediated neuroprotective glial responses to excitotoxic hippocampal injury in senescence-accelerated mouse. 18th Annual Meeting of The PsychoNeuroImmunology Research Society. 2011 年 6 月 9 日. Chicago

⑤石井さなえ, 武井史郎, 稲葉宗夫, 千葉陽一, 古川絢子, 河村則子, 細川昌則, 島田厚良. 老化促進モデルマウスに見られるサイトカインを介した神経保護的グリア応答機能の低下. 日本神経病理学会. 2011 年 6 月 4 日. 京都
*優秀ポスター賞受賞

⑥武井史郎, 石井さなえ, 上川篤志, 千葉陽一, 河村則子, Woodward DF, 渡部紀久子, 島田厚良. カイニン酸誘導てんかん発作に伴う海馬プロスタグランジン F_{2α}産生亢進の免疫組織学的解析. 日本神経病理学会. 2011 年 6 月 4 日. 京都
*優秀ポスター賞受賞

⑦Atsuyoshi Shimada, Keisuke Yoshikawa, Shiro Takei, Sanae Hasegawa-Ishii, Yoichi Chiba, Ayako Furukawa, Noriko Kawamura, David F. Woodward, and Kikuko Watanabe. The distribution of prostamide/prostaglandin F synthase in the developing and adult mouse central nervous system. 第 83 回日本生化学会大会.

2010 年 12 月 10 日. 神戸

⑧千葉陽一, 島田厚良, 古川圭介, 武井史郎, 石井さなえ, 古川絢子, 河村則子, David F Woodward, 渡部紀久子. Prostamide/prostaglandin F synthase のマウス中枢神経系および培養オリゴデンドロサイトにおける分布. 第 33 回日本神経科学大会. 2010 年 9 月 3 日. 神戸市

⑨Ishii S., Inaba M, Takei S, Furukawa A, Chiba Y, Kawamura N, Hosokawa M, Ikehara S, Shimada A. Microglia as a potential target for age-related neurodegeneration in SAMP10 mice. 第 33 回日本基礎老化学会. 2010 年 6 月 17 日. 名古屋

⑩Atsuyoshi Shimada, Keisuke Yoshikawa, Shiro Takei, Sanae Hasegawa-Ishii, Yoichi Chiba, Ayako Furukawa, Noriko Kawamura, David F. Woodward, and Kikuko Watanabe. The distribution of prostamide/prostaglandin F synthase in the developing and adult mouse central nervous system. Keystone symposia. 2010 年 6 月 9 日. 京都

⑪古川絢子, 島田厚良, 河村則子, 武井史郎, 千葉陽一, 石井さなえ, 細川昌則. 興奮毒性による海馬損傷における酸化損傷タンパク質の生成. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会. 2010 年 4 月 23 日. 東京

〔図書〕(計 1 件)

① Shimada A, Hasegawa-Ishii S, Furukawa A (2011). The senescence-accelerated mouse (SAM): Achievements and Future Directions. (Toshio Takeda, ed.) Elsevier 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 さなえ (HASEGAWA-ISHII SANAE)
愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所・病理学部・リサーチレジデント
研究者番号: 40435863