

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860716

研究課題名(和文)パーキンソン病の間葉系由来グリア細胞移植による画期的治療法開発

研究課題名(英文)Developing a novel therapy for Parkinson disease using mesenchymal cell-derived glial cells

研究代表者

松瀬 大(Matsuse, Dai)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70596395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの骨髄間葉系細胞から種々の栄養因子を加えることで、シュワン細胞(BM-SCs)を誘導。片側パーキンソン病モデルラットを作成し、線条体への移植実験を行った。しかしBM-SCs移植群は、全体としては有意な改善を認めなかった。組織学的評価を行うと、本細胞は、移植後シュワン細胞としてのとしての特徴を失っていき、排除されていることが示唆された。

したがって、間葉系細胞内に存在する多能性幹細胞、Muse細胞を移植する方針へ変更。Muse細胞の未分化マーカーの発現、3胚葉系の細胞への分化能も確認した。本細胞を用いたパーキンソン病の移植治療研究を引き続き継続する予定である。

研究成果の概要(英文)：At first, we induced to differentiate Schwann cells (BM-SCs) from bone marrow-derived mesenchymal cells (MSCs) of Wistar rats by adding several trophic factors. Hemiparkinsonian rats were induced, and cells were engrafted in the affected portion of the striatum. Immunohistochemical study indicated that transplanted cells had lost the characteristic of Schwann cells after transplantation and then been eliminated.

Then we decided to use Multi-lineage differentiating Stress Enduring (Muse) cells for transplantation. Muse cells were obtained from human bone marrow stem cells. We confirmed their expression of immature markers and ability of triploblastic differentiation. We will continue to develop the novel therapy for Parkinson disease with Muse cells.

研究分野：神経内科学

キーワード：細胞移植治療 間葉系細胞 シュワン細胞 Muse細胞 パーキンソン病

1. 研究開始当初の背景

近年パーキンソン病の新たな治療法として、細胞移植治療が注目されている。すでにES細胞や中絶胎児由来神経幹細胞から誘導したドパミン産生細胞を使用した移植実験はいくつか報告されているが、これらは倫理的問題、腫瘍化の問題がある。申請者らは最近、サルの骨髄間葉系細胞から誘導したドパミン産生細胞を自家移植し、組織学的、機能的改善をもたらしたことを報告した(Hayashi, Matsuse et al, J Clin Invest, 2013)。間葉系由来細胞は腫瘍化の危険性がないといわれており、自家移植も可能で、安全で倫理的問題も少ない、実用性の高い細胞である。しかし、ヒトのパーキンソン病患者に移植された中絶胎児神経幹細胞由来のドパミン産生移植細胞は、移植後にレビー小体の沈着が起こることが報告されており(Kordower et al, Nat Med, 2008)、パーキンソン病の病態の本質であるドパミン産生細胞の変性に、移植細胞自体も巻き込まれる可能性が指摘されている。したがって、パーキンソン病における細胞移植治療は、必ずしもドパミン産生細胞を移植するという方法が最良とは限らず、ホストの細胞死を防ぎ、新たなドパミン産生細胞をホスト細胞から誘導するというアプローチがより有効である可能性が考えられる。事実、上記を含むパーキンソン病の細胞実験では、機能的改善のピークは移植細胞のドパミン発現が最も高い移植直後から数カ月遅れている報告がほとんどで、その原因は分かっていない。移植細胞のホストに対する間接的な働き掛けが機能改善に寄与する部分がむしろ多いのではないかと申請者は考えている。

一方でシュワン細胞は、末梢神経系が損傷されると活性化・増殖し、様々な成長因子やサイトカインを放出することで、神経細胞を障害から保護し、また軸索再生に適した微小環境を作る。シュワン細胞はまた、それ自身が機能的回復に必要なミエリンを再形成し、末梢神経再生に重要な役割を果たす。さらに、シュワン細胞を移植した場合、末梢神経障害だけでなく、通常十分に再生しない脊髄損傷などの中枢神経障害においても、軸索の再生をサポートすることが知られている(Oudega et al, J Neurotrauma, 2006)。加えて、シュワン細胞は神経幹細胞と共培養することで、神経幹細胞をドパミン産生細胞へ誘導することが報告されている(Grothe et al, Neurobiol Dis, 2004)。これらの理由から、シュワン細胞はパーキンソン病に対する移植治療においても神経機能回復に大きく寄与することが予想される。

しかし移植のためのシュワン細胞を、末梢神経を損傷することで得るのは現実的でな

い。申請者は近年、ヒト臍帯間葉系細胞からシュワン細胞を誘導することに初めて成功した。そしてそれを末梢神経障害部へ移植することで、移植細胞自身が再髄鞘化し軸索再生を促進することで神経機能回復を果たすことを明らかにした(Matsuse et al, J Neuropathol Exp Neurol, 2010)。同様にヒト、ラット、サルの骨髄間葉系細胞からもシュワン細胞を誘導し、移植により末梢神経障害の機能回復に大きく寄与することを報告した(Wakao, Matsuse et al, Exp Neurol, 2010)。これらの方法を用いることで、臍帯や骨髄の間葉系細胞から、細胞移植治療に使用するシュワン細胞を確保することが可能となる。

以上より、安全で倫理的問題も少ない間葉系細胞を用い、優れた神経再生促進作用を持つシュワン細胞を誘導し、移植することによる、パーキンソン病治療法の開発を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、間葉系細胞をもちいた、パーキンソン病に対する新たな細胞移植治療法を確立することである。そのためにまず、間葉系細胞由来シュワン細胞をパーキンソンモデル動物へ移植し、治療効果の高い細胞移植治療を確立することを目指した。

間葉系細胞由来シュワン細胞は、パーキンソン病の病態である、ドパミン産生細胞の変性に巻き込まれないことが予想される。また、過去のドパミン産生細胞移植での治療効果が、失った細胞の補充よりもホストへの細胞保護、分化、増殖促進作用の面が大きいと考え、間葉系細胞由来シュワン細胞はその効果をより発揮できる細胞と考えた。

モデル動物として、6-OHDAを用いて片側パーキンソンモデルラットを作成し、細胞を患側の線条体に注入し、治療効果を評価することで、パーキンソン病に応用可能な間葉系由来細胞の、移植治療法の樹立を行う。

3. 研究の方法

1) ラット骨髄間葉系細胞からシュワン細胞の誘導

Wistar Rat (8週齢、)の骨髄から間葉系細胞(BM-MSCs)を採取し、3代継代培養。その後beta-mercaptoethanol(BME)、All-trans retinoic acid(ATRA)で処理した後、human basic fibroblast growth factor(FGF)、forskolin(FSK)、platelet-derived growth factor-AA(PDGF)、heregulin-beta1-EGF-domain(HRG)の trophic factorを加えることで誘導を行った。

誘導細胞は、S100、PMP22、GFAP、P0、O4等の発現を免疫細胞化学で調べることで、シュワン細胞への分化を確認した。またS100については、定量的PCRにて、誘導の段階

ごとの mRNA の発現も調べた。移植細胞は、GFP の標識を行った。

2) パーキンソンモデルラットに対する細胞移植

275-290g の Wistar rat () に対し、イソフルレンで麻酔後 6-OHDA 12 μ g を線条体へ注入することで作成。6 週後、アポモルフィン誘発回転運動を施行し、1 分間に 10 回転以上の個体をモデルとして選択。同部位へ細胞を移植 (1×10^5 cells/ 2μ l PBS)。行動評価は、週に 1 回のアポモルフィン誘発回転運動で評価。PBS 移植群 (n=3) と BM-SC 群 (n=6) とで比較した。また、移植細胞の発現しているマーカーを確認し、移植細胞がシュワン細胞の性質を維持できているか、host の TH 陽性細胞の増加を来しているか等について評価する。評価期間は最大 6 か月を想定したが、まず移植 7 日後、28 日後に組織評価する群を設け、移植後比較的早期の移植細胞状態について評価した。

3) ヒト骨髄間葉系細胞からの Muse 細胞の採取

他の移植細胞候補として、間葉系組織に存在すると近年報告されている Muse 細胞についても検討するため、Muse 細胞についても採取、評価を行った。市販のヒト骨髄間葉系細胞を購入し、培養。培養、継代した細胞から、stage-specific embryonic antigens (SSEA)-3 陽性細胞を、FACS を用いて採取。採取した細胞を poly-hema coating した dish にて単細胞培養。7 日後に形成された cluster を回収し、免疫細胞化学にて評価する。また、その cluster を接着培養に移し、7-14 日後に免疫細胞化学でその分化能について評価した。

なお、本研究は九州大学の倫理委員会において承認を受け、動物実験においては当施設の動物実験施設の規約およびマニュアルにそって行った。

4. 研究成果

1) ラット骨髄・ヒト臍帯間葉系細胞からシュワン細胞の誘導

8 週齢の Wistar Rat 骨髄から間葉系細胞を採取し、3 代継代培養。2.86 $\times 10^3$ cells/cm² の密度で細胞を撒き、BME (1 mmol/L) を含む無血清培地で 24 時間培養。その後 ATRA (35 ng/mL)、10%FBS を含む培地で 72 時間培養。最後に、10%FBS を含む培地へ FGF (10 ng/mL)、FSK (5 μ mol/L)、PDGF (5 ng/mL)、HRG (200 ng/mL) の栄養因子を加え、5-7 日培養することで、シュワン細胞の誘導に成功した。誘導した細胞は S100、PMP22、GFAP などのシュワン細胞のマーカーを発現していた (図 1)。また、S100 については、誘導の最終段階で、

FGF、FSK、PDGF、HRG といった 4 つの trophic factors (TF) を加えることで、大きく発現を上昇させることが分かった (図 2)。

図1 ラット骨髄間葉系細胞(BM-MSCs)から誘導したシュワン細胞(BM-SCs)におけるマーカー発現

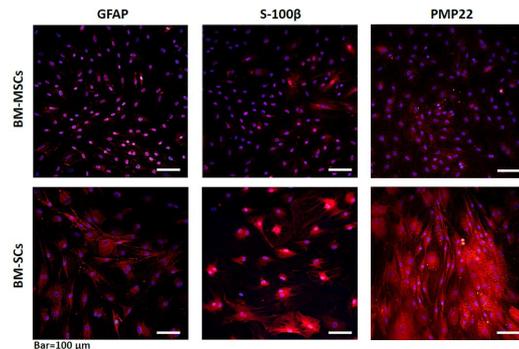
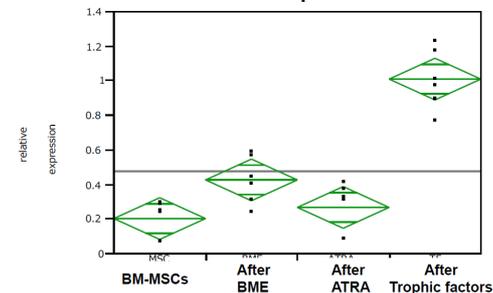


図2 BM-SCs誘導段階ごとのQ-PCRでの、S100βのmRNA発現



2) パーキンソンモデルラットに対する細胞移植

移植後 7 日毎に、アポモルフィン誘発回転運動による行動評価を行った。移植後 4 週間での回転運動の増減は、PBS 群 1.7 ± 1.5 、BM-SC 群 2.5 ± 1.5 (p=0.47) と、コントロールと比べても数値上はより増加する結果となり、有意差を認めなかった (図 3)。また、組織学的には、移植 28 日後では GFP 陽性細胞を認めず、移植 7 日目は移植細胞を確認できたが、移植細胞は、シュワン細胞のマーカーを発現していない、あるいは低下させていた (図 4)。移植細胞が、移植後徐々に生体内から排除されていることが示唆された。Trophic effect の可能性についても、明らかな行動評価の改善が見られなかった。

図3 アポモルフィン誘発回転運動の変化(回)

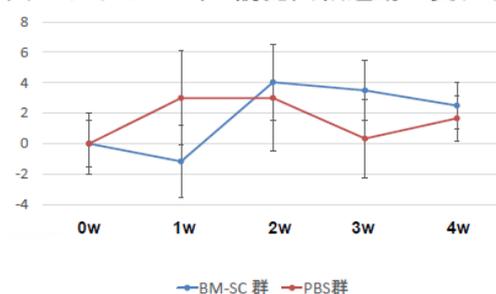
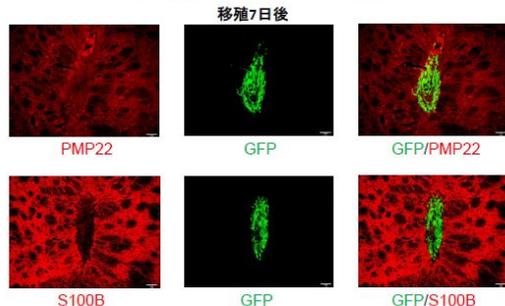


図4 移植後BM-SCsのシュワン細胞のマーカ-



移植28日後ではGFP陽性細胞を認めず、移植7日目は移植細胞確認できたが、移植細胞は、シュワン細胞のマーカ-を発現していない、あるいは低下させていた。

3) 現状では間葉系細胞由来シュワン細胞での治療効果が見いだせないため、ヒト骨髄間葉系細胞から Muse 細胞を採取し、これを利用してパーキンソン病の移植治療法を開発することを検討。

FACS でソーティングした後に形成された cluster は、免疫組織化学にて、Nanog, Sox2, Oct4 などの未分化マーカ-を発現していた。(図5)また、接着培養後の cluster からは、細胞の自発的分化が確認され、-fetoprotein(内胚葉)、smooth muscle actin(中胚葉)、neurofilament(外胚葉)陽性の細胞への分化が確認され、3胚葉への分化能を有していることが示された(図6)。これらより、多能性幹細胞の Muse 細胞が採取されていることが確認され、これを用いて移植実験を行う予定である。

図5 Muse Clusterは未分化マーカ-を発現

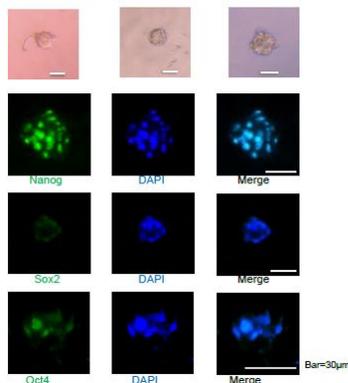
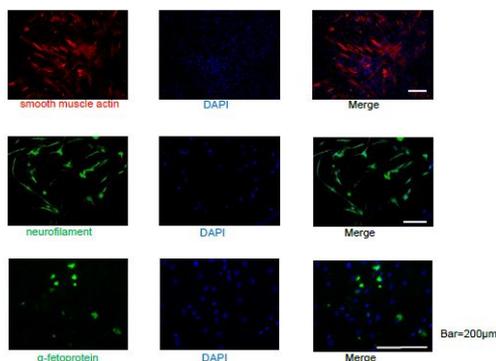


図6 Muse Clusterは3胚葉の細胞へ分化



以上より、ラット骨髄間葉系細胞からシュワン細胞を誘導し、シュワン細胞特異的なマーカ-の発現を確認した。そして、パーキンソン病モデルラットに対して病変部に細胞移植を行い、治療を試みた。しかしこれまでのところ、有意な機能改善、組織学的改善が得られなかった。原因としては、誘導したシュワン細胞が移植後にシュワン細胞としての機能を失い、また生体内から排除されている可能性が示唆された。これらの点を改善させていくことが、今後の研究課題である。

また、同じく間葉系組織由来の Muse 細胞は、移植後に必要な細胞へ分化し、組織修復へ寄与する可能性がある。本細胞の、パーキンソン病治療への応用の可能性について引き続き研究を進めていく必要がある。

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、すべて査読有)

1) Ogata H, Matsuse D, Yamasaki R, Kawamura N, Matsushita T, Yonekawa T, Hirotsu M, Murai H, Kira J. A nationwide survey of combined central and peripheral demyelination in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87:29-36. DOI:10.1136/jnnp-2014-309831

2) Ogata H, Yamasaki R, Hiwataishi A, Oka N, Kawamura N, Matsuse D, Kuwahara M, Suzuki H, Kusunoki S, Fujimoto Y, Ikezoe K, Kishida H, Tanaka F, Matsushita T, Murai H, Kira J. Characterization of IgG4 anti-neurofascin 155 antibody-positive polyneuropathy. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015;2:960-71. DOI: 10.1002/acn3.248

3) Song Z, Yamasaki R, Kawano Y, Sato S, Masaki K, Yoshimura S, Matsuse D, Murai H, Matsushita T, Kira J. Peripheral blood T cell dynamics predict relapse in multiple sclerosis patients on fingolimod. *PLoS One*. 2015 DOI:10.1371/journal.pone.0124923.

4) Niino M, Sato S, Fukazawa T, Masaki K, Miyazaki Y, Matsuse D, Yamasaki R, Takahashi E, Kikuchi S, Kira J. Decreased serum vitamin D levels in Japanese patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2015;279:40-45. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2015.01.007

5) Wakao S, Matsuse D, Dezawa M. Mesenchymal Stem Cells as a Source of Schwann Cells: Their Anticipated Use in Peripheral Nerve Regeneration. *Cells, tissues, organs*. 2014;200:31-41. DOI: 10.1159/000368188

6) Kawamura N, Yamasaki R, Yonekawa T, Matsushita T, Kusunoki S, Nagayama S,

Fukuda Y, Ogata H, Matsuse D, Murai H, Kira J. Anti-neurofascin antibody in patients with combined central and peripheral demyelination. *Neurology* 2013;81:714-22. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3182a1aa9c

7) Furuya T, Hashimoto M, Koda M, Murata A, Okawa A, Dezawa M, Matsuse D, Tabata Y, Takahashi K, Yamazaki M. Treatment with basic fibroblast growth factor-incorporated gelatin hydrogel does not exacerbate mechanical allodynia after spinal cord contusion injury in rats. *J Spinal Cord Med* 2013;36:134-9. DOI: 10.1179/2045772312Y.0000000030

8) Matsushita T, Tateishi T, Isobe N, Yonekawa T, Yamasaki R, Matsuse D, Murai H, Kira J. Characteristic cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles in neuromyelitis optica, relapsing remitting or primary progressive multiple sclerosis. *PLoS One* 2013;8(4):e61835. DOI: 10.1371/journal.pone.0061835

9) Hayashi T, Wakao S, Kitada M, Ose T, Watabe H, Kuroda Y, Mitsunaga K, Matsuse D, Shigemoto T, Ito A, Ikeda H, Fukuyama H, Onoe H, Tabata Y, Dezawa M. Autologous mesenchymal stem cell-derived dopaminergic neurons function in parkinsonian macaques. *J Clin Invest* 2013;123:272-284. DOI: 10.1172/JCI62516

10) Aizawa-Kohama M, Endo T, Kitada M, Wakao S, Sumiyoshi A, Matsuse D, Kuroda Y, Morita T, Jorge J, Riera, Kawashima R, Tominaga T, Dezawa M. Transplantation of bone marrow stromal cells-derived neural precursor cells ameliorates deficits in a rat model of complete spinal cord transection. *Cell Transplant* 2013;22:1613-25. DOI: 10.3727/096368912X658791

〔学会発表〕(計 8 件)

1) Ogata H, Yamasaki R, Hiwatashi A, Oka N, Kawamura N, Matsuse D, Kuwahara M, Suzuki H, Kusunoki S, Fujimoto Y, Ikezoe K, Kishida H, Tanaka F, Matsushita T, Murai H, Kira J. Characterization of IgG4 anti-neurofascin 155 antibody-positive polyneuropathy. American Neurological Association 2015 Annual Meeting. 2015.9. Chicago.

2) 緒方 英紀, 山崎 亮, 樋渡 昭雄, 岡 伸幸, 河村 信利, 松瀬 大, 桑原 基, 鈴木 秀和, 楠 進, 池添 浩二, 岸田 日帯, 田中 章景, 松下 拓也, 村井 弘之, 吉良 潤一. 抗 neurofascin 155 抗体陽性 CIDP の臨床的特徴. 第 26 回 日本末梢神経学会学術集会 2015.9.

松本.

3) Ogata H, Yamasaki R, Matsuse D, Nobutoshi K, Takuya M, Kira J. Prevalence and features of anti-neurofascin 155 antibody-positive CIDP. 第 56 回日本神経学会学術集会 2015.5. 新潟.

4) Ogata H, Matsuse D, Yamasaki R, Nobutoshi K, Takuya M, Kira J. Prevalence and characteristic features of anti-human neurofascin 155 antibody-associated chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. The 67th American Academy of Neurology Annual Meeting 2015.4. Washington, DC.

5) Ogata H, Yamasaki R, Matsuse D, Kawamura N, Matsushita T, Kira J. Anti-Neurofascin Antibodies in the Inflammatory Demyelinating Diseases. MS サマーカレッジ 2014 福岡 2014.8. 福岡.

6) 緒方英紀, 松瀬大, 河村信利, 松下拓也, 山崎亮, 吉良潤一. 炎症性脱髄性疾患における特異度の高い抗 neurofascin 抗体測定法の開発. 第 55 回日本神経学会学術大会 2014.5. 福岡.

7) 緒方英紀, 松瀬大, 松下拓也, 河村信利, 山崎亮, 楠進, 吉良潤一. 中枢・末梢連合脱髄症 (CCPD) における全国臨床疫学調査成績と抗 neurofascin (NF) 抗体陽性率の検討. 第 111 回日本内科学会講演会 2014.4. 東京.

8) Ogata H, Yamasaki R, Matsuse D, Kawamura N, Yonekawa T, Matsushita T, Imamura S, Kusunoki S, Nagayama S, Fukuda Y, Murai H, Kira JI. Combined Central and Peripheral Demyelination: Diagnostic Value of Anti-Neurofascin Antibody and the First Nationwide Survey In Japan : the 6th Pan-Asian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis 2013.11. Kyoto.

〔図書〕(計 6 件)

1) 松瀬大, 緒方英紀, 吉良潤一. 免疫性神経疾患 III. 中枢・末梢連合脱髄症 3. 中枢・末梢連合脱髄症の病態・診断・治療. 日本臨牀, 2015 ; 352-356.

2) 松瀬大, 吉良潤一. 骨格筋症候群(上) 「限局性結節性筋炎」. 日本臨牀, 2015 ; 394-398.

3) 松瀬大, 吉良潤一. 多発性硬化症のフィンゴリモド療法. Minds 多発性硬化症トピックス, 2014.

4) 松瀬大, 吉良潤一. 診療ガイドライン UP-T0-DATE2014-2015 中枢神経疾患 多発性硬化症・視神経脊髄炎. 2014 ; 524-529.

5) 松瀬大, 吉良潤一. 多発性硬化症. 日本医師会雑誌「神経・精神疾患診療マニュアル」.

南山堂, 2013;218-219.

6) 松瀬大, 吉良潤一. 多発性硬化症. 免疫性神経疾患ハンドブック. 南江堂, 2013;68-89.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

松瀬 大 (MATSUSE DAI)

九州大学大学院医学研究院・神経内科学・助教

研究者番号: 70596395

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

緒方 英紀 (OGATA HIDENORI)

藤田 篤史 (FUJITA ATSUSHI)