

令和元年6月3日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09719

研究課題名(和文) 複数栄養因子の髄腔内反復パルスタイプ投与による筋萎縮性側索硬化症モデル動物治療

研究課題名(英文) Intraventricular pulsatile injection of trophic factors in mice model of ALS

研究代表者

渡辺 保裕 (WATANABE, Yasuhiro)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：20335540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々が開発した栄養因子を高発現する細胞を用いて、その細胞をシート状に培養してマウス脳に移植する方法の検討を進めた。現時点では本法が最も確実に栄養因子を供給できると考えられるが、シート状の細胞移植でも以下に記載した宿主側の拒絶反応が見られるため、この反応の制御が重要と考えられた。

細胞をシート状にマウス脳表面に移植した場合、移植細胞シート中に宿主のミクログリアが多数浸潤していることが確認され、このミクログリアはM1(細胞障害性)とM2(細胞保護性)の両方が浸潤していることを確認した。現在中枢神経内のミクログリアを選択的に消去する方法を開発し、移植に対する影響を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在有効な治療法のない筋萎縮性側索硬化症の基礎的な研究を行った。本検討が即座に疾患の治療に繋がるわけではないが、細胞治療の可能性と方向性を広げるものである。実際の臨床応用に関して、さらに安全性と有効性の評価を進める必要があると考え、それを実践している。

研究成果の概要(英文)：1.Sustained delivery of neurotrophic factors to mice brain. We developed HAC-MSCs which highly expressed neurotrophic factors. Transplanting this cells as a monolayer sheet structure, we confirmed this method is so far the most promising way to deliver the trophic factors to mice brain. However, the HAC-MSC sheet eliminated from host tissue in a quite short term after the transplantation. We considered controlling this immune-rejection is necessary for further improvement of the efficacy of transplantation.

2.Establishing the method to detect cell survival signals efficiently. We observed that the host microglial cells are numerous infiltrating into transplanted cell sheet structure. We also confirmed these infiltrating microglia are both cytoprotective (M2) and cytotoxic (M1) populations. By selectively eliminate the host microglia, we are examining this procedure improve the survival of the transplanted cell sheet.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 神経栄養因子

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

## 1. 研究開始当初の背景

我々は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) モデルマウスを用いて ALS の細胞移植治療, 神経栄養因子治療を検討してきた。細胞移植治療において, 新たな移植法の開発と移植細胞としての骨髄間葉系幹細胞 (MSC) の有用性を報告した<sup>1)</sup>。更に人工染色体 (HAC) 技術を利用して, グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF), 肝細胞増殖因子 (HGF), インスリン様成長因子 1 (IGF-1) を高発現する MSC 細胞株 (HAC-MSC) を樹立し, 複数の栄養因子による相乗的な治療効果を証明した<sup>2)</sup>。

この過程で, 移植片細胞である MSC はホストの ALS モデルマウスの脊髄ですみやかに (一週間以内で) 消失することが明らかとなった<sup>1,2)</sup>。このことは複数の栄養因子が一過性に発現することのみで ALS への治療効果を発揮しうることを示しており, 持続的な栄養因子の投与が必須でない可能性を示唆すると考えられた。本研究では複数栄養因子の効果に焦点を当て, 栄養因子の髄腔内投与による反復性一過性の上昇を目的とする治療の, モデル動物での妥当性の実証を試みる。

## 2. 研究の目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) において神経栄養因子治療への期待は細胞移植治療とともに大きい。いまだ栄養因子が臨床応用に到達しない理由として, 血液脳関門による栄養因子の中枢移行の制限, 持続的な栄養因子治療が negative feedback によってその受容体の減少を招く, さらに ALS の進行に伴う運動神経での栄養因子受容体の減少, その結果 単一の栄養因子治療では十分な神経保護効果を期待できない可能性, が挙げられる。これらの問題を克服し臨床応用の可能性を追求するため, 本研究では多種類の神経栄養因子により細胞内生存シグナルを活性化する最適な投与方法を検討し, ALS における神経細胞死の抑制・臨床症状の改善効果を検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス髄腔内への複数回投与手技の確立

過去の手技を改善し長期間の留置でも感染にも抵抗性のある複数回投与のための安定した投与ルート of 留置法を確立する。

### (2) 細胞シートの作成とマウスへの移植

HAC-MSC をシート状に培養し, マウス大脳を頭蓋骨から露出しその表面に移植する。移植による副作用を評価する。

### (3) 臨床症状による治療効果判定

移植に引き続き, 臨床評価項目 (hind limb extension reflex, foot print, body weight) を毎週評価する。同時にマウスの発症 症状進行の程度の判定を行う。マウスの苦痛の軽減のため, ピーク時体重の 20% の減少, 横臥位として 30 秒以内に立ちなおることができない, 眼に高度の感染を認める, の 3 項目のうち 1 項目を満たした時点で, 臨床的死亡と判定し安楽死を施行する。安楽死に先立ち, 血清の採取, 生化学的解析のための脳・脊髄の凍結保存, 病理標本の作製を行う。

### (4) 病理学的解析, 生化学的解析

(神経変性の評価) 脳・脊髄の凍結サンプルに対して, アストログリオシス, ミクログリアの

活性化を western 解析で施行する。作製した病理標本で、残存運動神経細胞数の定量測定、残存運動神経細胞内のレビー小体様硝子様封入体の定量、アストログリオシスおよびミクログリアの活性化の定性測定を行う。ミクログリアに関してはさらに細胞障害性(M1)か細胞保護性(M2)であるかのフェノタイプの同定も行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) マウス脳脊髄腔内への持続的な栄養因子投与手技の確立

マウス脳内にデバイスを残置して持続的に神経栄養因子を投与する際に、脳内や留置デバイスの感染やマウス自身が留置デバイスを損傷する例が多く見られた。結論として、背中にアルゼットポンプを残置しチューブを通じて脳内に栄養因子を供給するよりも、栄養因子を高発現する細胞を樹立して、その細胞をシート状に培養してマウス脳に移植する方法がより有効と考えられた。

一方細胞シート法でも、シート状の細胞移植でも宿主側の拒絶反応が見られるため、この反応の制御が重要と考えられた。病理観察では、移植細胞シート中に宿主のミクログリアが多数浸潤していることが確認され、このミクログリアのキャラクターの解明と制御が重要と考えられた。

すなわち筋萎縮性側索硬化症の治療において、神経栄養因子をどのように供給することが最も効率的で有効かを他覚的に検討している。現時点では栄養因子の高分泌細胞を利用する方法が最適とのデータが集積しており、細胞レベル、動物レベルでの検討を進める。

##### (2) 細胞生存シグナルの検出手技の確立

生存シグナルは十分な発現量が見られればEnzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) で確認する技術を確認した。微量の場合はreal time PCRでの検出となるが、検出感度は現時点ではさらに精度の向上が必要である。

##### (3) 細胞生存シグナルの検出手技の確立

細胞をシート状にマウス脳表面に移植した場合、移植細胞シート中に宿主のミクログリアが多数浸潤していることが確認され、このミクログリアはM1(細胞障害性)とM2(細胞保護性)の両方が浸潤していることを確認した。現在中枢神経内のミクログリアを選択的に消去する方法を開発し、移植に対する影響を検討している。

#### <引用文献>

- 1) A novel cell transplantation protocol and its application to an ALS mouse model. Morita E, Watanabe Y, et al. Experimental Neurology 213: 431-8, 2008.
- 2) Use of a human artificial chromosome for delivering trophic factors in a rodent model of amyotrophic lateral sclerosis. Watanabe Y, et al. Molecular Therapy - Nucleic Acids 4:e253, 2015.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- 1) Watanabe Y, Matsuba T, Nakanishi M, Une M, Hanajima R, Nakashima K. Tetanus toxin fragments and Bcl-2 fusion proteins: cytoprotection and retrograde axonal migration.

- 2) 種田健太, 足立正, 足立芳樹, 渡辺保裕, 花島律子. 下肢筋力低下で発症しSOD1L126S変異を認めた家族性筋萎縮性側索硬化症の3例. 神経内科 87, 2017, p 545-549. 査読有
- 3) Watanabe Y, Beeldman E, Raaphorst J, Izumi Y, et al. Japanese version of the ALS-FTD-Questionnaire (ALS-FTD-Q-J). J Neurol Sci 367, 2016, p51-55.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2016.05.036>. 査読有
- 4) Yamakawa MY, Uchino K, Watanabe Y, Adachi T, Nakanishi M, Ichino H, Hongo K, Mizobata T, Kobayashi S, Nakashima K, and Kawata Y. Anthocyanin suppresses the toxicity of Aβ deposits through diversion of molecular forms in in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease. Nutr Neurosci 19, 2016, p32-42. 10.1179/1476830515Y.0000000042. 査読有
- 5) Ida M, Ando M, Adachi M, Tanaka A, Machida K, Hongo K, Mizobata T, Yamakawa MY, Watanabe Y, Nakashima K, and Kawata Y. Structural basis of Cu, Zn-superoxide dismutase amyloid fibril formation involves interaction of multiple peptide core regions. J Biochem 159, 2016, p247-260. 10.1093/jb/mvv091. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

- 1) 本多直人, 渡辺保裕, 花島律子, 寺嶋智也. 細胞シート状態で大脳へ移植した間葉系幹細胞の生着に関する因子の検討. 第 18 回日本再生医療学会総会, 2019 .
- 2) 寺嶋智也, 小橋修平, 渡辺保裕, 中西真実, 櫻美和子, 中江有希, 岡野純子, 鈴木義久, 小島秀人. 骨髄単核球および神経栄養因子群発現骨髄間葉系幹細胞併用骨髄移植による筋萎縮性側索硬化症への治療戦略. 第 18 回日本再生医療学会総会, 2019 .
- 3) 渡辺保裕, 荻野美恵子, 市川博雄, 伊藤悟, 中島健二, 花島律子: 日本語版 Edinburgh Cognitive and Behavioural ALS Screen (ECAS) . 第 59 回神経学会学術大会, 2018 .
- 4) 青江康貴, 佐藤研吾, 渡辺保裕, 小川絢女, 松浦由佳, 秋山翔太, 安田菜奈子, 大栗聖由, 花島律子, 廣岡保明. 超音波 M モードによる fasciculation 持続時間の検討. 第 48 回日本臨床神経生理学会学術大会, 2018 .
- 5) Watanabe Y, Nakanishi M, Une M, Nakashima K. The ability of retrograde axonal migration and neuroprotection of tetanus toxin fragments and Bcl2 fusion proteins. 23rd World Congress of Neurology, 2017.
- 6) Nakanishi M, Une M, Watanabe Y, Nakashima K, Hanajima R. Efficacy of long-term engraftment of modified MSCs in a mouse model of ALS - use of cell-sheet technology. 28th International Symposium on ALS/MND, 2017.

- 7) Une M, Yamakawa M, Nakanishi M, Kawata Y, Watanabe Y, Nakashima K, Hanajima R. Identification of protein-interacting Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1): participation of the SOD1 aggregation core and the protein degradation system. 28th International Symposium on ALS/MND, 2017.
- 8) Watanabe Y, Matsuba T, Nkanishi M, Une M, Hnajima R. Rretrograde axonal migration and neuroprotection of tetanus toxin fragments and Bcl2 fusion proteins. 28th International Symposium on ALS/MND, 2017.
- 9) 青江康貴, 佐藤研吾, 小川絢女, 恩田菜菜, 松浦由佳, 大栗聖由, 渡辺保裕, 花島律子, 廣岡保明. 筋萎縮性側索硬化症における筋超音波検査による fasciculation 検出の検討. 第 47 回日本臨床神経生理学会学術大会, 2017.
- 10) 渡辺保裕, 伊藤悟, 足立正, 中島健二, ALS-FTD-Q-J リサーチグループ: 筋萎縮性側索硬化症および前頭側頭型認知症の行動・性格変化評価 (ALS-FTD-Q-J). 第 57 回神経学会学術大会, 2016.
- 11) Watanabe Y, Beeldman E, Raaphorst J, Izumi Y, Yoshino H, Masuda M, Atsuta N, Ito S, Adachi T, Adachi Y, Yokota O, Oda M, Hanashima R, Ogino M, Ichikawa H, Hasegawa K, Kimura H, Shimizu T, Aiba I, Yabe H, Kanba M, Kusumi K, Aoki T, Hiroe Y, Watanabe H, Nishiyama K, Nomoto M, Sobue G, Nakashima K, and the ALS-FTD-Q-J research group. Japanese version of the ALS-FTD-questionnaire (ALS-FTD-Q-J). 27th International Symposium on ALS/MND, 2016.

〔図書〕(計 1 件)

渡辺保裕, 原田孝弘, 佐々木貴史, 中島健二: 難病支援制度. 最新精神・神経遺伝医学研究と遺伝カウンセリング 遺伝子医学MOOK別冊 シリーズ: 最新遺伝医学研究と遺伝カウンセリング, 戸田達史, pp282-286, メディカル ドゥ, 2017.

〔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

## 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：本多 直人

ローマ字氏名：HONDA Naoto

研究協力者氏名：徳岡 悠太

ローマ字氏名：TOKUOKA Yuta

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。