

## 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 3月31日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590458

研究課題名（和文） 骨髄内骨髄移植による神経保護的微小環境の誘導と神経変性病態の制御

研究課題名（英文） Induction of neuroprotective microenvironment and intervention of neurodegenerative condition by the intra-bone marrow bone- marrow transplantation

研究代表者

島田 厚良（SHIMADA ATSUYOSHI）

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・病理学部・室長

研究者番号：50311444

研究成果の概要（和文）：

脳が老化するのは、脳内免疫細胞が脳組織保護機能を失うことが原因ではないかという仮説を立てた。脳の老化が早く進むマウスでは、脳損傷後にニューロンとグリアが相互作用して脳組織を保護する反応が欠落していた。この病的マウスに正常マウスの骨髄を移植してやると、移植された骨髄細胞は病的マウスの脳内へと進入し脳内免疫細胞に分化した。本研究により、骨髄移植によって脳の老化を抑制できることを示す重要な知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

We hypothesized that brain aging might be caused by a loss of neuroprotective function from brain immune cells. Mice with accelerated brain aging lacked the neuroprotective responses exerted by neuron-glia interaction after being challenged with brain tissue injury. When these diseased mice received bone marrow transplantation from normal mouse donors, donor-derived marrow cells entered the recipients' brains and differentiated into brain immune cells. These results indicate the possibility of preventing brain aging by bone marrow transplantation.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000   | 2,080,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2011年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：骨髄移植、老化、神経変性

## 1. 研究開始当初の背景

老化は神経変性疾患の最大の危険因子であるが、変性を誘発するメカニズムは不明である。「脳組織における防御機構の機能不全に起因する神経変性の仕組みの解明」という全体構想のもと、本研究では、ミクログリアに代

表される脳内免疫担当細胞が老化によって本来の神経保護機能を失うことが神経変性を引き起こすという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

(1) 加齢とともに神経変性を発症する SAMP10

マウスがもつミクログリアの機能を正常対照 SAMR1 マウスと比較しながら明らかにしたい。(2) ミクログリアが脳細胞の中で唯一骨髄由来であることを利用し、骨髄内骨髄移植によってミクログリアを置換する実験を試みる。骨髄キメラマウスの脳内で、レシピエントのミクログリアはドナーの骨髄由来細胞によって置換されるのか、また、骨髄由来細胞はどんな時間経過でどこに分布し、何に分化するのかについて明らかにしたい。(3) ドナー由来骨髄細胞が脳実質に進入する数が加齢に伴って変化するか否かを明らかにしたい。

### 3. 研究の方法

(1) 加齢とともに神経変性を発症する SAMP10 マウスの3ヵ月齢個体に 40 mg/kg のカイニン酸 (KA) を腹腔投与し、海馬に興奮毒性損傷を誘導した。KA 投与3日後の海馬におけるサイトカイン遺伝子発現を DNA マイクロアレイおよび定量的リアルタイム RT-PCR を用いて網羅的に検討した。比較対照として、神経変性を発症しない SAMR1 マウスの3ヵ月齢および15ヵ月齢個体を用いた。(2) SAMR1 の骨髄幹細胞を SAMP10 に骨髄内骨髄移植し、脳における骨髄由来細胞を SAMR1 由来の細胞に置換したキメラマウスを作製するためのパイロットスタディとして、5週齢の GFP 遺伝子導入 C57BL/6 マウス(ドナー)の骨髄を8週齢の通常 C57BL/6 (レシピエント) に移植し、2週、1ヵ月、4ヵ月、8ヵ月後にドナー由来骨髄細胞がレシピエントの脳実質内に進入するか、また、どの細胞に分化するかを検討した。とくに、骨髄移植法として、最近開発された骨髄内骨髄移植法の有効性を確認するために、従来行われてきた静脈内骨髄移植法と比較検討した。(3) レシピエントとして若齢 SAMP10、老齢 SAMP10、若齢 C57BL/6、老齢 C57BL/6 の4群を設け、それぞれにドナー(若齢 GFP-C57BL/6)由来の骨髄幹細胞を骨髄内骨髄移植して脳組織を比較検討した。

### 4. 研究成果

(1) 正常マウス (SAMR1 系) では KA 投与による海馬損傷後、活性化ミクログリアがインターフェロン $\gamma$ を、アストロサイトがその受容体を発現した。この刺激によりアストロサイトは SOCS3、CXCL10、MIP-1 $\alpha$  を発現した。ミクログリアはまた GM-CSF やオステオポンチンを発現し、ニューロンがオステオポンチン受容体 CD44 を発現した。このことは、損傷後の海馬がニューロン・グリア間相互作用を構築し、神経保護作用をもつオステオポンチン/CD44 の系を介して、組織を修復へと誘導

することを示す。ミクログリアの反応として、細胞体が伸長・肥大した特徴的形態を有する活性化ミクログリアが多数出現した。一方、SAMP10 系マウスでは、海馬損傷後にミクログリアの活性化とサイトカイン発現が不十分であり、グリア・ニューロン間相互作用に基づく組織修復機構が構築されなかった。さらに、SAMP10 の活性化ミクログリアは細胞体が小さく、また突起も少なかった。

(2) 骨髄由来細胞は頭蓋内においてはまず髄膜・脈絡叢・血管周囲腔に進入した。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、突起を持つ形態に変化した。静脈注射法に比べて骨髄内骨髄移植法の方が、より多くの小領域に骨髄由来細胞が進入し、より長期間存在した。脳実質に進入した骨髄由来細胞は全て Iba-1 を発現した。

(3) C57BL/6 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。特に老齢 SAMP10 ではその傾向が顕著であった。この結果は老齢 SAMP10 では脳組織が骨髄由来細胞をリクルートする作用が亢進していることを示唆しており SAMP10 に早期に生じる神経変性と因果関係があると考えられた。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者に下線)

[雑誌論文] (計13件)

① Chiba, Y., Takei, S., Kawamura, N., Kawaguchi, Y., Sasaki, K., Hasegawa-Ishii, S., Furukawa, A., Hosokawa, M., and Shimada, A.\* Immunohistochemical localization of aggresomal proteins in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* (in press). 査読有. doi: 10.1111/j.1365-2990.2011.01229.x.

② Shimada, A.\* and Hasegawa-Ishii, S. Senescence-accelerated mice (SAMs) as a model for brain aging and immunosenescence *Aging Dis.* 2:414-436, 2011. 査読有. [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).

③ 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.* 48(5):439-446, 2011. 査

読無

④ 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. 査読有

⑤ Hoshino, S., Kurishima, A., Inaba, M., Ando, Y., Fukui, T., Uchida, K., Nishio, A., Iwai, H., Yokoi, T. Ito, T., Hasegawa-Ishii, S., Shimada, A., Li, M., Okazaki, K., and Ikehara, S. Amelioration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by immunoregulatory dendritic cells. *J. Gastroenterol.* 46:1368-1381, 2011. 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Amelioration%20of%202%2C4%2C6-trinitrobenzene%20sulfonic%20acid-induced%20colitis%20in%20mice%20by%20immunoregulatory%20dendritic%20cells>.

⑥ Furukawa, A., Kawamoto, 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.* 43:706-714, 2011. 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Proteomic%20identification%20of%20hippocampal%20proteins%20vulnerable%20to%20oxidative%20stress%20in%20excitotoxin-induced%20acute%20neuronal%20injury.%20>

⑦ Hasegawa-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* 31:20-8, 2011. 査読有. doi: 10.1111/j.1440-1789.2010.01126.x.

⑧ 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. 査読有.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Preferential%20localization%20of%20prostamide%2Fprostaglandin%20F%20synthase%20in%20myelin%20sheaths%20of%20the%20central%20nervous%20system>.

⑨ Hasegawa-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.* 25:83-100, 2011. 査読有. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Defects%20in%20cytokine-mediated%20neuroprotective%20glial%20responses%20to%20excitotoxic%20hippocampal%20injury%20in%20senescence-accelerated%20mouse>.

⑩ Takei, S., Tokuhira, Y., Shimada, A., Hosokawa, M., and Fukuoka, S. The eosin-shadow method: a selective enhancement of light microscopic visualization of pancreatic zymogen granules on hematoxylin-eosin sections. *Anat. Sci. Int.* 85:245-250, 2010. 査読有. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=The%20eosin-shadow%20method%3A%20a%20selective%20enhancement%20of%20light%20microscopic%20visualization%20of%20pancreatic%20zymogen%20granules%20on%20hematoxylin-eosin%20sections>

⑪ Furukawa, A., Oikawa, S., Harada, K., Sugiyama, H., Hiraku, Y., Murata, M., Shimada, A., and Kawanishi, S. Oxidatively generated DNA damage induced by 3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole, a metabolite of carcinogenic amitrole. *Mut. Res. Fund. Mol. Mech. Mutag.* 694:7-12, 2010. 査読有.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Oxidatively%20generated%20DNA%20damage%20induced%20by%203-amino-5-mercapto-1%2C>

2%2C4-triazole%2C%20a%20metabolite%20of%  
20carcinogenic%20amitrole

⑫ 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. 査読  
有.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Proteomic%20analysis%20of%20aging%20brain%20in%20SAMP10%20mouse%3A%20a%20model%20of%20age-related%20cerebral%20degenerat%20ion>.

⑬ Ohgami, N., Ida-Eto, M., Shimotake, T.,  
Sakashita, N., Sone, M., Nakashima, T.,  
Tabuchi, K., Hoshino, T., Shimada, A.,  
Tsuzuki, T., Yamamoto, M., Sobue, G.,  
Jijiwa, M., Asai, N., Hara, A., Takahashi,  
M., Kato, M. c-Ret-mediated hearing loss in  
mice with Hirschsprung disease. Proc. Natl.  
Acad. Sci. U. S. A. 107:13051-13056, 2010.  
査読有.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20616061>

(\*は自らがcorresponding author)

[学会発表] (計 23 件)

①島田厚良. 「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」. 日本基礎  
老化学会シンポジウム “日本の基礎老化研究  
の現状と展望”. 日本基礎老化学会. 2011 年  
10 月 8 日. 野田市.

② Takei 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<sub>2α</sub> production  
following kainic acid-induced seizures in  
rat hippocampus. Bio Active Lipid Meeting.  
2011年9月19日. Seattle, USA.

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. 岐阜市.

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

⑤ 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<sub>2α</sub>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. 京都市.

⑥ 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. 京都市.

⑦ Shimada, A., Yoshikawa, K., Takei, S.,  
Hasegawa-Ishii, S., Chiba, Y., Furukawa,  
A., Kawamura, N., Woodward, D.F., Watanabe,  
K. 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. 神戸市.

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

⑨ 島田厚良. 脳組織防御機構の破綻と加齢  
性神経変性. 日本基礎老化学会第33回大会.  
シンポジウム：老化と疾患. 2010年6月18日  
. 名古屋市. (招待講演)

⑩ 石井さなえ、稲葉宗夫、武井史郎、古川  
絢子、河村則子、千葉陽一、細川昌則、池原  
進、島田厚良. 加齢性神経変性におけるミク  
ログリアの関与と骨髄内骨髄移植による実  
験的治療. 日本基礎老化学会第 33 回大会.  
2010 年 6 月 17 日. 名古屋市.

⑪ Watanabe, K. and Shimada, A. A novel  
type of PGF synthase belonging to the  
thioredoxin-like superfamily. Keystone  
Symposium “Bioactive Lipids:  
Biochemistry and Diseases”. 2010 年 6 月

7日. 京都市. (招待講演)

⑫ 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. 日本神経病理学会. 2010年4月23日. 東京.

⑬ 千葉陽一、島田厚良、武井史郎、河村則子、石井さなえ、古川絢子、佐々木健介、岩城徹、細川昌則. Glial cytoplasmic inclusionはaggresomeとしての性格を有する. 第32回日本神経科学大会. 2009年9月18日. 名古屋市.

⑭ 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32回日本神経科学大会. 2009年9月18日. 名古屋市.

⑮ 島田厚良、石井さなえ、武井史郎、河村則子、古川絢子、千葉陽一、細川昌則. 老化促進モデルマウスにみられるミクログリアの異常と神経変性. 第32回日本神経科学大会. 2009年9月16日. 名古屋市.

⑯ 島田厚良、石井さなえ、稲葉宗夫、河村則子、武井史郎、古川絢子、千葉陽一、細川昌則、池原進. SAMP10への骨髄内骨髄移植によるミクログリア再生を介した神経変性の制御. 第24回老化促進モデルマウス研究協議会. 2009年7月9日. 松本市.

⑰ 石井さなえ、島田厚良、千葉陽一、古川絢子、河村則子、武井史郎、細川昌則. SAMP10にみられるミクログリアの形態異常と興奮毒性に対する応答異常. 第24回老化促進モデルマウス研究協議会. 2009年7月9日. 松本市.

⑱ 千葉陽一、島田厚良、武井史郎、河村則子、石井さなえ、古川絢子、細川昌則. 加齢性神経変性疾患における封入体形成へのaggresomeの関与. 日本基礎老化学会大会. 2009年6月20日. 横浜市.

⑲ 島田厚良、吉川圭介、北芳博、清水孝雄、石井さなえ、古川絢子、河村則子、千葉陽一. プロスタグランジン抑制による興奮毒性誘発神経細胞死の制御. 第50回日本神経病理学会総会. 2009年6月6日. 高松市.

⑳ 千葉陽一、島田厚良、武井史郎、河村則子、石井さなえ、古川絢子、佐々木健介、岩城徹、細川昌則. Glial cytoplasmic inclusionsはaggresomeとしての側面を有す

る. 第50回日本神経病理学会総会. 2009年6月6日. 高松市.

㉑ 石井さなえ、島田厚良、千葉陽一、古川絢子、河村則子、武井史郎、細川昌則. 老化促進モデルマウスにみられるミクログリアの形態異常と興奮毒性に対する応答異常. 第50回日本神経病理学会総会. 2009年6月5日. 高松市.

㉒ 古川絢子、島田厚良、及川伸二、千葉陽一、石井さなえ、河村則子、武井史郎、細川昌則. SAMP10の加齢性神経変性に伴うタンパク質発現変化に関するプロテオミクス解析. 第50回日本神経病理学会総会. 2009年6月5日. 高松市.

㉓ Shimada, A. The distribution of prostamide/prostaglandin F synthase in mouse brain: Developmental changes and localization to the myelin sheath. 4th International Conference on Phospholipase A<sub>2</sub> and Lipid Mediators. Poster Workshop I. 2009年5月26日. 東京.

[図書] (計3件)

① A. Shimada, A., Hasegawa-Ishii, S., and Furukawa, A. SAMP10 strain as a model for the study of brain aging, in T. Takeda, ed. The senescence-accelerated mouse (SAM): Achievements and Future Directions, Elsevier, Amsterdam (in press)

② 林雅晴、小森拓、島田厚良. Clinical Pathological Conference (C.P.C.) 学業の遅れと歩行の異常で発症し、多彩な神経症状が進行した男子症例. 「小児神経学の進歩-第39集」(日本小児神経学会教育委員会編), pp 129-144, 診断と治療社, 2010.

③ Chiba, Y., Shimada, A., and Hosokawa, M. The SAM strain of mice, a higher oxidative stress, age-dependent degenerative disease, and senescence acceleration model. In: Aging and Age-related Disorders, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice 3 (Bondy, S.C. and Maiese, K. eds.), pp359-380, Humana Press, New York, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 厚良 (SHIMADA ATSUYOSHI)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所

病理学部・室長

研究者番号：50311444