

機関番号：24402
研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2008～2010
課題番号：20591229
研究課題名 (和文) 遺伝性神経疾患における細胞治療の長期効果に対する免疫関与に関する研究
研究課題名 (英文) Experimental study of immune responses in cell transplantation therapy for genetic neurodegenerative disorders
研究代表者
田中 あけみ (TANAKA AKEMI)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：30145776

研究成果の概要 (和文)：ライソゾーム酵素欠損による中枢神経障害の治療法として、正常細胞を疾患モデルマウスの脳に移植することによる治療実験を行った。長期生着のためには、宿主の免疫応答を抑制することが重要である。同系の骨髄間葉系幹細胞を用いて、脳内移植と骨髄移植を行うことにより、宿主免疫反応を免れて長期生着を果たすことが可能かを検討した。脳内移植のみのコントロール群との有意差を示すことはできなかった。実験個体数が少ないことと手技のばらつきが検討課題である。

研究成果の概要 (英文)：We performed cell transplantation therapy to treat the brain involvement of lysosomal storage diseases. The grafted cells were gradually depleted because of immunological rejection by the host animals. To avoid deleterious immune attack and to achieve sufficient long-term efficacy in brain, development of methods to steer the immune response away from cytotoxic responses or to induce tolerance to the products of therapeutic genes is needed. To overcome this immunological rejection, we carried out brain injection and intravenous administration of mesenchymal stem cells simultaneously to a model mouse of β -galactosidase deficiency. However, we could not show a significant difference in the duration of engrafting between the brain injection only and the simultaneous injection of brain and vein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：神経遺伝性疾患、細胞移植、免疫応答、移植免疫、再生医療

1. 研究開始当初の背景

遺伝性の脳代謝性疾患、神経変性疾患による脳障害は、外傷や腫瘍などと異なり遺伝子の異常から来ることから自己組織の再生は望めず、また直接効果を示すような薬物はほ

とんどない。申請者は、平成 15 年より細胞治療という視点から研究を進めてきた。遺伝性の脳代謝性疾患の治療のためには、物質を補填する「自己以外の細胞で腫瘍細胞以外の細胞」を脳内で長期生存させることが必要で

ある。さらに、治療効果を示すには、一定量以上の外来性細胞が一生涯脳内に生存しなければいけない。分裂して補給ができる幹細胞として存在し続ける、あるいは、寿命が長い神経細胞として存在し続けるという可能性が考えられる。

研究代表者は、まず、 β -ガラクトシダーゼを高発現する β -ガラクトシダーゼ・トランスジェニックマウスの骨髄間葉系幹細胞を同種同系統の β -ガラクトシダーゼ・ノックアウトマウスの脳室内に移植する実験を行った。この実験では、移植した細胞は約60日しか生着することができなかった。機序は、宿主の免疫的排除によることが推測された⁵⁾。

ここまでの実験結果から、移植細胞の長期生着には、宿主免疫反応のコントロールが重要な課題であると結論した。この結論を基に、宿主の免疫反応性を変化させることによる長期の生着の可能性を検討した。

2. 研究の目的

ライソゾーム病の治療法の1つとして、1980年代から骨髄移植が行われてきており、一部のライソゾーム病では脳への治療効果もある。効果のメカニズムとして、骨髄由来のマイクログリア細胞が脳へ移行することによって考えられ、この細胞は排除されることなく長期に効果を表わすことができる。しかしながら脳へ浸潤する細胞量は限られていることから、効果も限られたものである。

骨髄細胞はすなわち免疫担当細胞であることから、研究代表者は脳への細胞移植と同時に同系の細胞を用いて骨髄移植を行うことにより、脳に移植された細胞が免疫的排除を受けることを回避できないかと考えた。さらに、脳への移植細胞に加えて骨髄移植細胞も脳へ浸潤したならば、効果はさらに高まると想像される。この推測を実験的に証明するため、研究を行った。

3. 研究の方法

宿主の免疫反応を抑制あるいは寛容状態にすることにより、脳内の移植細胞の長期生着を実現させる方法を検討する。

免疫反応を緩和させる(免疫寛容状態にする)手段として、脳に移植した細胞と同じ骨髄間葉系幹細胞を同一マウスに静脈内投与(骨髄移植)する方法を検討する。脳に移植した細胞と免疫に関与する骨髄細胞とは由来が同じ細胞であることから、脳の移植細胞が免疫的排除を免れることを期待するものである。

(1) β -ガラクトシダーゼ・トランスジェニック成マウス(2-6ヶ月)の大腿骨および脛骨より骨髄細胞を採取し、Gey solutionで赤血球を融解して有核細胞を集めドナー細胞

とした。また、浮遊細胞を除いて培養面に付着増殖するものについて培養を継代し続け、安定して分裂増殖をする細胞を脳室内移植用細胞とした。

(2) 生後2日齢の β -ガラクトシダーゼ・ノックアウトマウスの脳室内に 1.0×10^5 個の骨髄間葉系幹細胞を移植した。

(3) 脳内移植を施した β -ガラクトシダーゼ・ノックアウトマウスの3週齢時に、放射線照射(850 cGy)を行い、24時間後に(1)で得た $2-6 \times 10^6$ 個の有核骨髄細胞を尾静脈より注入した。

(4) (3)のマウスを1か月後、2か月後に屠殺し、X-Gal染色を行って、脳内移植のみの同週齢 β -ガラクトシダーゼ・ノックアウトマウスとX-Gal染色陽性細胞数を比較した。

4. 研究成果

脳内移植のみのマウス(A群:n=3)と脳内移植と骨髄移植を併用したマウス(B群:n=3)について、移植後1か月後(n=2)、2か月後(n=1)に屠殺して脳組織のX-Gal染色を行った。

A群、B群ともに、X-Gal染色陽性細胞数は、1か月後(n=2)のマウスに比べて2か月後(n=1)では減少していた。また、B群のマウスのほうがA群マウスよりも1か月後、2か月後ともにX-Gal染色陽性細胞数がやや多かった。しかしながら、実験個体数がわずかであることから、手技的なバラつきやマウスの個体差を考慮すると、結論を導くことはできないと思われた。

脳内移植のマウスに免疫抑制剤を投与する実験も計画していたが、至らなかった。

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)

- 1) Tanaka A, Takeda T, Hoshina T, Fukai K, Yamano T. Enzyme replacement therapy in a patient with Fabry disease and the development of IgE antibodies against agalsidase beta but not agalsidase alpha. J Inherit Metab Dis. 査読有. 2010 Jun 22. [Epub ahead of print]
- 2) Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, Ida H, Tanaka T, Cox JF, Eto Y, Orii T. Japan Elaprased Treatment (JET) Study: Idursulfase Enzyme Replacement Therapy in Adult Patients with Attenuated Hunter Syndrome. Mol Genet Metab 査読有. 2010, 99: 18-25.

- 3) Maeda M, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Kiyama H. Nerve injury-activated microglia engulf myelinated axons in a P2Y12 signaling-dependent manner in the dorsal horn. *Glia*. 査読有. 2010 Jul 21. [Epub ahead of print]
 - 4) Nagata K, Kiryu-Seo S, Maeda M, Yoshida K, Morita T, Kiyama H. Damage-induced neuronal endopeptidase is critical for presynaptic formation of neuromuscular junctions. *J Neurosci* 査読有. 2010, 30: 6954-6962.
 - 5) Sawada T, Tanaka A, Higaki K, Takamura A, Nanba E, Seto T, Maeda M, Yamaguchi E, Matsuda J, Yamano T. Intracerebral cell transplantation therapy for murine GM1 gangliosidosis. *Brain & Development* 査読有. 2009, 31: 717-724.
 - 6) Otomo T, Muramatsu T, Yorifuji T, Okuyama T, Nakabayashi H, Fukao T, Ohura T, Yoshino M, Tanaka A, Okamoto N, Ozono K, Sakai N. Mucopolidosis II and III alpha/beta: mutation analysis of 40 Japanese patients showed genotype-phenotype correlation. *J Hum Genet* 査読有. 2009, 54: 145-151.
 - 7) Hosomi N, Fukai K, Tanaka A, Fujita H, Ishii M. Fluorescence *in situ* hybridization analysis is useful for the diagnosis of the carrier state of X-linked ichthyosis. *Internat J Dermatol* 査読有. 2008, 47: 529-530.
 - 8) Kitagawa T, Suzuki K, Ishige N, Ohashi T, Kobayashi M, Eto Y, Tanaka A, Odaka H, Owada M. Non-invasive high-risk screening for Fabry disease hemizygotes and heterozygotes. *Pediatr Nephrol* 査読有. 2008, 23: 1461-1471.
 - 9) Umekoji A, Fukai K, Hosomi M, Ishii M, Tanaka A, Murakami K, Kamoi H, Mizoguchi M, Utani A. Vascular type of Ehlers-Danlos syndrome associated with haemophilia A. *Clin Exper Dermatol* 査読有. 2008, 34: 101.
 - 10) Takahara Y, Suzuki A, Maeda M, Kawashima H, Nakatani T, Kiyama H. Expression of pancreatitis associated proteins in urothelium and urinary afferent neurons following cyclophosphamide induced cystitis. *J Urol*. 査読有. 2008, 179: 1603-1609.
- 1) Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, Sakai N, Sawada T, Tanaka T, Takakura H, Ohashi T, Wada M, Yabe H, Ohura T, Suzuki N, Kato K, Adachi S, Mugishima H and Kato S. Efficacy of hematopoietic cell transplantation on the patients with mucopolysaccharidosis type II: Multicenter survey in Japan. 11th International Symposium on Mucopolysaccharide and Related Diseases June 22-27, 2010, (Adelaide, Australia)
 - 2) Tanaka A, Japanese perspectives of optimal treatment with ERT and HSCT for mucopolysaccharidoses Symposium The 1st Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases March 7-10, 2010, (Fukuoka)
 - 3) 田中あけみ、酒井規夫、奥山虎之、鈴木康之、澤田智、大橋十也、大浦敏博、麦島秀雄、田中藤樹、大友孝信。ムコ多糖症 II 型における造血幹細胞移植の中樞神経系への効果について（多施設共同研究）第 52 回日本小児神経学会 2010 年 5 月 20-22 日（福岡）
 - 4) 澤田智、田中あけみ、奥山虎之、田中藤樹、鈴木康之、酒井規夫、大橋十也、高倉広充、矢部晋正、加藤俊一。ムコ多糖症 II 型に対する造血幹細胞移植の効果に関する多施設共同調査研究（第 1 報）。第 51 回日本先天代謝異常学会 2009 年 11 月 5-7 日（東京）
 - 5) 田中あけみ、澤田智、麻生和良、鶴原昭史、森田ころ、多田明央、山野恒一。ハンター病兄弟例にみる臨床像に影響を及ぼす因子と酵素補充療法および造血幹細胞移植の効果について。第 13 回日本ライソゾーム病研究会 2008 年 11 月 28-29 日（東京）
 - 6) 岡崎伸、田中あけみ、原純一、西垣五月、東浦壮志、木村志保子、澤田智、山野恒一。ムコ多糖症骨髄移植症例の骨髄抑制下における酵素製剤の薬物動態について。第 50 回日本先天代謝異常学会 2008 年 11 月 6-8 日（米子）
- [図書] (計 1 件)
- 1) Tomatsu S, Montañó AM, Molano ACS, Roman D, Hintze J, Carvalho CG, Federhen A, Vieira TA, Giugliani R, Węgrzyn G, Tanaka A, Suzuki Y, Orii T. Nova Science Publishers, Inc. Neurochemistry of Metabolic Disease, Chaptor 8: Enzyme Replacement Therapy for Lysosomal Storage Dseases. Editors: Sanker Surendran,

[学会発表] (計 6 件)

(2011) in press

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 あけみ (TANAKA AKEMI)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：30145776

(2) 研究分担者

前田 光代 (MAEDA MITSUYO)
大阪歯科大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：40122080

瀬戸 俊之 (SETO TOSHIYUKI)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：60423878

(3) 連携研究者

なし