

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790319
 研究課題名（和文）：骨髄内骨髄移植を用いたミクログリア再生による神経変性疾患の実験的予防と治療
 研究課題名（英文）：Renewal of microglia by intra-bone marrow bone marrow transplantation as a preventive and therapeutic strategy for neurodegeneration
 研究代表者：石井 さなえ（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・研究員
 研究者番号：40435863

研究成果の概要（和文）：

骨髄の単球系に由来するミクログリアは神経保護機能を有することから、その異常は神経変性を誘導するといわれている。我々は神経変性病態において異常なミクログリアを正常なそれ置き換えることによって、変性病態を改善できないかと考えた。そこで、骨髄内骨髄移植を行い、まずミクログリアが置換される時間経過などの基礎的知見を得た後、そうした処置が神経変性を改善する可能性を検討した。その結果ドナー由来細胞は時間依存的に脳の限局された領域に入りミクログリアに分化したが、今回の条件では神経変性の治療にまでは至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

Microglia exert neuroprotective function, and impairments in their function may cause neurodegeneration. As microglia are derived from monocyte born in the bone marrow, bone marrow transplantation may be an effective way to replace resident impaired microglia with donor-derived functional one to treat neurodegeneration. Intra-bone marrow bone marrow transplantation (IBM-BMT) revealed that donor-derived cells entered the restricted areas of the brain in a time-dependent manner and that donor cells differentiated into microglia. However, IBM-BMT treatment did not improve neurodegeneration dramatically.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、神経変性疾患、老化促進モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

(1) ミクログリアは骨髄由来の単球系を起源

とし脳内では免疫担当細胞として知られる細胞で、近年は特にその神経保護機能が注目

されている。このことは、ミクログリアの神経保護機能不全が神経変性の一因になる可能性を示唆している。

(2) 我々の飼育する老化促進モデルマウス、SAMP10 マウスは全身の促進老化を背景に7ヶ月齢頃から大脳前頭部皮質や嗅脳系、辺縁系に萎縮が自然発症し、萎縮部位において神経細胞の脱落、樹状突起退縮、ユビキチン化封入体の形成、シナプスの減少が見られる。私はこの SAMP10 マウスにおいて、神経変性発症以前(3ヶ月齢)からミクログリアに突起が細い、分岐が少ない、先端部に房状の異常な膨らみが出現するなどの退行的な形態異常が起こることを見出した。また、カイン酸誘導の興奮毒性による海馬損傷時に、SAMP10 マウスのミクログリアは SAMR1 マウスのそれほど細胞体を肥大化できず、活性化マーカーである CD11b などの分子を十分に発現できないこと、カイン酸投与1ヶ月後に海馬 CA1 の錐体細胞層に萎縮が見られることを明らかにした。したがって、SAMP10 マウスでは、神経変性に先立ってミクログリアに退行変性が起こり、損傷時にミクログリアが十分に活性化できず、その結果神経細胞保護機能が減弱されると考えられた。

(3) ミクログリアは他の脳細胞とは異なり、成体脳においても分裂や血球系細胞の脳への浸潤により常時新規細胞に置き換わる。したがって、骨髄移植によって幹細胞を置換したとき、脳内ではミクログリアが最もドナー由来の細胞に置換されやすいと考えられる。静脈注射による従来の骨髄移植でも、ドナー由来の細胞がミクログリアに分化することが報告されているが、その置換率は非常に低程度であった。

(4) 2001年に関西医科大学の池原進教授らは、長管骨の片側から生理食塩水で骨髄内を灌流する「灌流法」により骨髄を採取し、骨髄内に直接注入する「骨髄内骨髄移植法」を確立した。この方法を用いると、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る結果、ドナー細胞が骨髄内に定着・増殖し、造血機能の早期回復が認められ生着不全も起こりにくい。この方法を用いることで、加齢に伴って発症する骨粗鬆症や肺気腫などの難病が、実験的に予防及び治療可能であることが実証されているが、脳疾患における骨髄内骨髄移植の効果はまだ調べられていない。

私は、骨髄内骨髄移植法を用いた場合、脳においてはミクログリアの置換が従来の方法より効率よく行われると予想した。したがっ

て退行変性したSAMP10マウスのミクログリアを骨髄内骨髄移植により正常なミクログリアに置換し再生することで、本来SAMP10マウスに自然発症する大脳萎縮や神経変性、損傷後の萎縮が予防できるのではないかと、また神経変性発症後にミクログリアを置換・再生することで既に進行した神経変性を治療できるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

(1) 骨髄内骨髄移植によるアロ骨髄移植を行い、ドナー由来の多能性造血幹細胞及び間葉系幹細胞が脳内でミクログリアを始めとする各種脳細胞へ分化する割合や時間経過などの基礎的データを取得する。

(2) 加齢に伴うミクログリアの退行変性に続き神経変性を自然発症する SAMP10 マウスに対し、正常マウスの骨髄を骨髄内骨髄移植することにより、本来 SAMP10 マウスに自然発症する大脳の神経変性病態や海馬損傷後に起こる海馬萎縮を予防かつ治療できるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) ドナー由来細胞の脳への進入と分化

①GFP マウスから灌流法により骨髄を採取し、C57BL/6 マウスに骨髄内骨髄移植を行った

②1,4,8ヶ月後にマウスを固定し脳切片を作製した

③各マーカー抗体を用いて免疫染色を行った

(2) 加齢性神経変性の治療実験

①老化促進モデルの SAMP10 マウス 7-10ヶ月齢)に正常対照である SAMR1 マウス、もしくは GFP マウスの骨髄を骨髄内骨髄移植した

②14ヶ月齢時の移植SAMP10マウスの脾臓細胞を用いて、免疫系を調べた

③14ヶ月齢時の移植SAMP10マウスの老化度、記憶学習テスト(水迷路)を行った

④移植SAMP10マウスを固定し、脳切片を作製した

⑤脳の各部位の大きさをはかり脳萎縮の有無を調べた

⑥ユビキチンで免疫染色を行い、ユビキチン化封入体含有ニューロンの割合を調べた

4. 研究成果

(1) ドナー由来細胞の脳への進入と分化

レシピエントを初老期の SAMP10 マウス、正常な若齢 C57BL/6 マウスの両方の場合において、ドナー由来細胞の脳への進入を経時的に調べた。その結果、レシピエントがどちらの

場合でも、ドナー由来細胞は時間依存的に脳へ入ること、入る場所は限定されていること、入ったらミクログリアに分化することが明らかになった。

①GFP マウスの骨髄を初老期の SAMP10 に骨髄内骨髄移植し、1 ヶ月後、4 ヶ月後におけるドナー由来細胞の分布を調べた。その結果、まずドナー由来細胞が脳へ入る個体が移植 1 ヶ月後では 5 匹中 1 匹だったのに対し、移植 4 ヶ月後では 5 匹中 5 匹に増えた。入ったドナー由来細胞の数も移植 4 ヶ月後の方が増加した。しかしながら、入る部位は血管周囲、脳室周囲、脳幹、脊髄に限られており(図 1、入ったドナー由来細胞はすべてミクログリアに分化した(図 2)。海馬や大脳皮質には入らなかった。

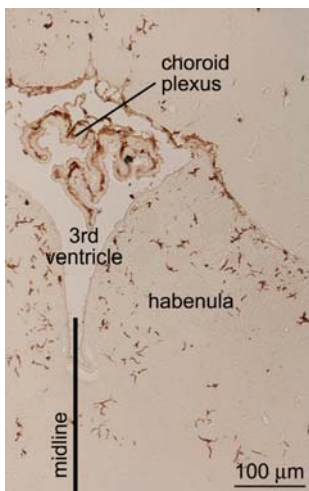


図 1 第 3 脳室周囲に入ったドナー由来細胞

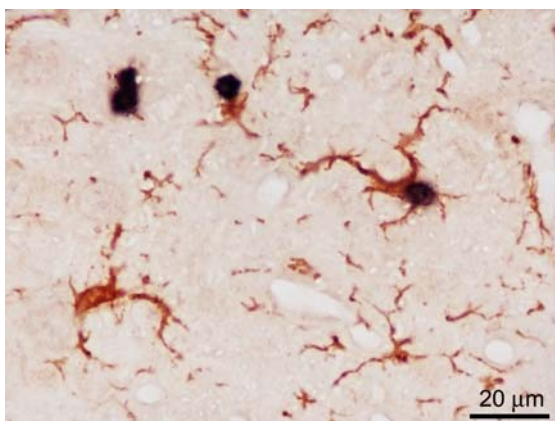


図 2 ドナー由来細胞のミクログリアへの分化

②GFP マウスの骨髄を若齢 C57BL/6 に骨髄内骨髄移植し、4 ヶ月後におけるドナー由来細胞の分布を調べた。4 匹中 4 匹においてドナー由来細胞が脳内に入り、ミクログリアに分化した。初老期の SAMP10 をレシピエントとしたときと同様に、血管周囲や脳室周囲には

入ったが、脳幹、脊髄にはほとんど入らなかった。この結果から、骨髄の脳への細胞供給は、生理的に行われる場合と、病態にตอบสนองして行われる場合があると考えられた。

③GFP マウスの骨髄を若齢 C57BL/6 に骨髄内骨髄移植し、1 ヶ月後(6 匹)、8 ヶ月後(5 匹)において固定するサンプルを作製した。②の結果と合わせて、ドナー由来細胞の脳への進入を経時的に調べる予定である。

(2) 加齢性神経変性の治療実験

初老期の SAMP10 マウス(7-10 ヶ月齢)に SAMR1 もしくは GFP マウスの骨髄を骨髄内骨髄移植し、14 ヶ月齢時における免疫系、老化度、記憶学習テスト(モリス水迷路)、脳萎縮、神経変性について調べた。以下の結果(①~⑤)から、今回の実験においては、骨髄内骨髄移植は成功したものの、それによる神経変性の治療は困難であると判断した。

①骨髄内骨髄移植を行った 1 ヶ月後に末梢血を、屠殺時に脾臓細胞を採取し、骨髄内骨髄移植により免疫系が再構築されたことを確認した。

1. 細胞表面マーカー解析

移植 1 ヶ月後の末梢血を用い、H2K の型を指標にフローサイトメトリーを行った。その結果、SAMR1 をドナーとして骨髄内骨髄移植を行った 7 匹中 4 匹が、また GFP マウスをドナーとして骨髄内骨髄移植を行った 6 匹中 5 匹がドナー型の H2K の型を示し、移植が成功した。

2. リンパ球増殖反応

移植が成功したマウスに関しては、ConA 刺激で T 細胞が、LPS 刺激で B 細胞が正常に増殖反応を示した。

3. 混合リンパ球反応

移植が成功したマウスに関しては、ドナー型、レシピエント型の両方を自己として寛容し、第三者に対しては非自己と認識する新しい免疫系が成立した。

②移植 SAMP10 マウスの 14 ヶ月齢時における老化度を測定した。移植の成否にかかわらず、老化度は無処置の 14 ヶ月齢 SAMP10 マウスと差が見られなかった(図 3)。

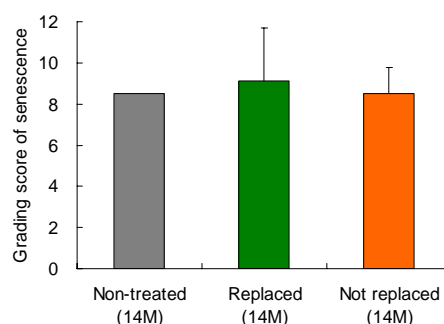


図 3 老化度

③移植 SAMP10 マウスの 14 ヶ月齢時における記憶学習能を、モリス水迷路テストを行い調べた。移植の成否に関わらず、無処置の 14 ヶ月齢 SAMP10 と同程度の成績で、若齢 SAMR1 の成績には全く及ばなかった(図 4, 5)。

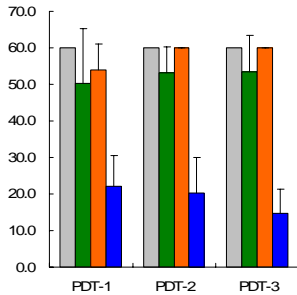


図 4 Latency (sec)

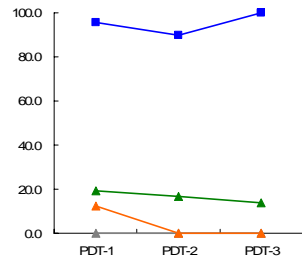


図 5 Success rate (%)

④脳の各部位の大きさを測定した。移植の成否に関わらず、無処置の 14 ヶ月齢 SAMP10 マウスと差が見られなかった(図 6)。

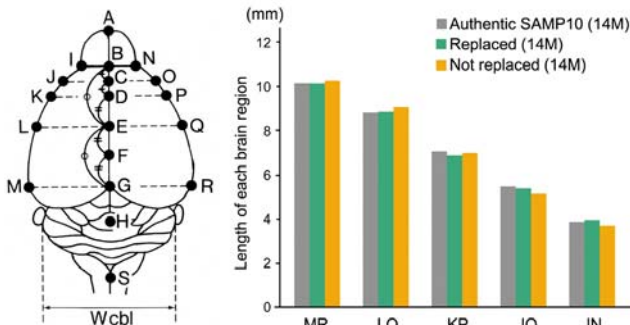


図 6 脳の各部位の大きさ

⑤神経変性の指標として、ユビキチン化封入体の有無を調べた。移植の成否に関わらず、無処置の 14 ヶ月齢 SAMP10 マウスと同程度にユビキチン化封入体含有ニューロンが現れた。

⑥SAMR1 マウスをドナーとしたときのドナー由来細胞を同定するため、H2K の免疫組織染色を試みた。固定法、包埋法、切片の厚さ、界面活性剤の濃度、抗体、抗体濃度、二次抗体の種類など様々な条件検討を行ったが、いずれも免疫染色では H2K は同定できなかった(図 7)。脳内の細胞は発現が低いこと、抗体が非特異的に反応することが原因と考えられた。このことから、レシピエントの脳内でドナー由来細胞を同定するためには、GFP マウスをドナーとすべきと判断した。

Fixation	Embedding	Sectioning	Permeabilization
10% formalin	paraffin	6- μ m section	0.25% Triton-X
	no embedding	30- μ m free floating	
PLP		frozen section	0.25% Triton-X no

Fresh freezing	Sectioning	Fixation	Permeabilization
no fixation	cryosection	100% EtOH (30 min)	0.25% Triton-X

Primary antibody	Secondary antibody	Visualization
anti-H2-K k (Abcam)	HRP anti-Mouse EnVision	DAB
biotinylated anti-H2-K k (BD Pharmingen)	HRP Streptavidin	DAB
FITC anti-H2-K s (BD Pharmingen)		FITC fluorescence
	anti-FITC	HRP anti-Mouse EnVision
		DAB

図 7 H2K 免疫染色の試み

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 5 件) 全て査読有

(1) Hasegawa-Ishii, S., Takei, S., Chiba, Y., Furukawa, A., Umegaki, H., Iguchi, A., Kawamura, N., Yoshikawa, K., Hosokawa, M., and Shimada, A. (2010) Morphological impairments in microglia precede age-related neuronal degeneration in senescence-accelerated mice. *Neuropathology*. In press

(2) Chiba, Y., Shimada, A., Kumagai, N., Yoshikawa, K., Ishii, S., Furukawa, A., Takei, S., Sakura M., Kawamura, N., and Hosokawa, M. (2009) The Senescence-accelerated Mouse (SAM): a higher oxidative stress and age-dependent degenerative diseases model. *Neurochem. Res.* 34:679-87.

(3) Satoh, M., Shimada, A., Kawamura, N., Chiba, Y., Yoshikawa, K., Ishii, S., Furukawa, A., Kumagai, N., and Hosokawa, M. (2008) Neuronal toxicity of expanded polyglutamine depends on intracellular distribution in addition to the expression level. *Neuropathology*. 28:485-496.

(4) Saitoh, Y., Matsui, F., Chiba, Y., Kawamura, N., Keino, H., Satoh, M., Kumagai, N., Ishii, S., Yoshikawa, K., Shimada, A., Maeda, N., Oohira, A., and Hosokawa, M. (2008) Reduced expression of MAb6B4 epitopes on chondroitin sulfate proteoglycan aggrecan in perineuronal nets from the cerebral cortices of SAMP10 mice: A model for age-dependent neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.* 86: 1316-1323.

(5) 石井さなえ、千葉陽一、梅垣宏行、井口昭久、河村則子、吉川圭介、古川絢子、武井史郎、細川昌則、島田厚良 (2008) 加齢性神経変性に対するミクログリアの機能解明にむけて. 基礎老化研究 32(4):21-24.

〔学会発表〕(計 23 件)

(1) 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

(2) 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 16 日. 名古屋市

(3) 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 16 日. 名古屋市

(4) 石井さなえ、島田厚良、武井史郎、千葉陽一、古川絢子、河村則子、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 (SAM) 研究協議会. 2009 年 7 月 9 日. 松本市

(5) 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 (SAM) 研究協議会. 2009 年 7 月 9 日. 松本市

(6) 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. 第 32 回日本基礎老化学会大会. 2009 年 6 月 20 日. 横浜市

(7) 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見られるミクログリアの形態以上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

(8) 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

(9) 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. 老化促進モデルマウスに見られるミクログリアの形態以上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 6 日. 高松市

(10) 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

(11) 石井さなえ、千葉陽一、吉川圭介、古川絢子、河村則子、武井史郎、細川昌則、島田厚良、梅垣宏行. ミクログリアの神経保護機能低下が加齢性神経変性を引き起こす. 第13回グリア研究会. 2008年11月8日. 東京都千代田区.

(12) 吉川圭介、河村則子、石井さなえ、古川絢子、千葉陽一、島田厚良. プロスタノイド産生抑制を機軸とした持続性神経細胞死の治療戦略. 第13回グリア研究会. 2008年11月8日. 東京都千代田区.

(13) 石井さなえ、島田厚良、千葉陽一、吉川圭介、古川絢子、河村則子、細川昌則. ミクログリアの神経保護機能低下が加齢性神経変性を引き起こす. 老化促進モデルマウス (SAM) 研究協議会. 2008年7月18日. 京都市.

(14) 千葉陽一、島田厚良、河村則子、吉川圭介、石井さなえ、古川絢子、武井史郎、細川昌則. SAMP10マウス由来培養神経細胞に誘導した aggresome 関連 ubiquitin 陽性封入体形成と神経突起退縮. 老化促進モデルマウス (SAM) 研究協議会. 2008年7月18日. 京都市.

(15) 古川絢子、島田厚良、及川伸二、千葉陽一、吉川圭介、石井さなえ、河村則子、細川昌則. SAMP10の加齢性神経変性に伴う α -internexin の早期リン酸化に関するプロテオミクス解析. 老化促進モデルマウス (SAM) 研究協議会. 2008年7月18日. 京都市.

(16) 石井さなえ、島田厚良、千葉陽一、吉川圭介、古川絢子、河村則子、細川昌

則. 老化促進モデルマウスの興奮毒性に対するミクログリアの応答異常と海馬の脆弱性. 第31回日本神経科学大会. 2008年7月9日. 東京都千代田区.

(17) 千葉陽一、島田厚良、河村則子、吉川圭介、石井さなえ、古川絢子、武井史郎、細川昌則. SAMP10マウス由来培養神経細胞におけるaggresome関連ubiquitin陽性封入体形成により誘導される神経突起退縮. 第31回日本神経科学大会. 2008年7月9日. 東京都千代田区.

(18) 千葉陽一、島田厚良、河村則子、吉川圭介、石井さなえ、古川絢子、武井史郎、細川昌則. SAMP10マウス由来培養神経細胞に誘導したユビキチン化封入体形成による神経突起退縮. 日本基礎老化学会. 2008年6月12-13日. 松本市.

(19) 石井さなえ、島田厚良、千葉陽一、吉川圭介、古川絢子、河村則子、細川昌則. 加齢性神経変性モデルSAMP10マウスに見られるミクログリアの神経保護機能の減弱. 日本基礎老化学会. 2008年6月12-13日. 松本市.

(20) 古川絢子、島田厚良、及川伸二、千葉陽一、吉川圭介、石井さなえ、河村則子、細川昌則. SAMP10の加齢性神経変性に伴うタンパク質発現変動のプロテオミクス解析. 日本基礎老化学会. 2008年6月12-13日. 松本市.

(21) 石井さなえ、島田厚良、千葉陽一、吉川圭介、古川絢子、河村則子、細川昌則. 老化促進モデルマウスの興奮毒性に対するミクログリアの応答異常と海馬の脆弱性. 第49回日本神経病理学会. 2008年5月20日. 東京都江戸川区.

(22) 千葉陽一、島田厚良、河村則子、吉川圭介、石井さなえ、古川絢子、細川昌則. SAMP10マウス由来培養神経細胞に誘導したaggresome関連ubiquitin陽性封入体形成による神経突起退縮. 第49回日本神経病理学会. 2008年5月20日. 東京都江戸川区.

(23) 石井さなえ、島田厚良、千葉陽一、吉川圭介、古川絢子、河村則子、細川昌則. SAMに関する実験的研究136. 老化促進モデルマウスの興奮毒性に対するミクログリアの応答異常と海馬の脆弱性. 第97回日本病理学会総会. 2008年5月17日. 金沢市.

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 さなえ (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・研究員

研究者番号: 40435863