

機関番号：15101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20790614

研究課題名 (和文) 筋萎縮性側索硬化症の病態解明および骨髄間質細胞移植による治療効果の検討

研究課題名 (英文) Pathological study and transplantation of Bone marrow stromal cell in a model of amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

北山 通朗 (KITAYAMA MICHIO)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：70379650

研究成果の概要 (和文)：

トランスジェニックマウス組織の組織学的検討については、脊髄前角について一般染色、免疫組織化学的に、病理学的経時的变化、細胞内小器官の変化について検索した。結果は、神経細胞脱落は発症後に著明となるものの、変異SOD1は各日齢の神経細胞に発現し、細胞内小器官の変性および細胞内封入体は早期から出現していた。骨髄間質細胞の移植の治療効果について、症前マウスにおける骨髄間質細胞移植を行ない、臨床的、病理組織化学的に検討を行った。結果としては、移植群において延命効果があり、組織学的にも脊髄前角細胞は残存していたが、臨床的な効果としては十分とは言えない結果であった。

研究成果の概要 (英文)：

Histological examination of the transgenic mice tissue at ventral horn using General stain and immunohistochemistry. Although the result is a nerve cell shedding onset after severe would mutant SOD1 are each in nerve cells, aging degenerative in organelle and inclusion bodies in cells had emerged from early. Therapeutic effect of Bone marrow stromal cell transplantation for anterior mice in quality between cell bone marrow, after consideration of clinical and pathological tissue chemically. However, as a result, port group in the life-prolonging effects, and histologically also remained a spinal cord ventral horn cells, but as a clinical effect was not enough.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：老年医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科医学

キーワード：モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、原因不明の神経変性疾患であり未だ有効な治療法は存在しない。家族性 ALS (FALS) において、SOD1 遺伝子の異常が明らかとなり、その原因の主要因と考えられており、ALS モデルマ

ウスが作製され、臨床的、神経病理学的にヒト ALS とほぼ同様な経過をたどることが明らかになっている¹。その検討により、今後 ALS の病態解明のみならず、新たな治療法の開発に発展していくものと考えられる。一方、ALS が神経変性疾患の一種であることから、

ALS の神経変性の過程には他の神経変性疾患にも共通した機序が存在していることが予測され、そのような研究も盛んに行われている。しかし、現在様々な ALS モデルマウスについての検討がなされてはいるものの、未だ共通した病態解明にまではいたっていない。その要因の一つとして、現在 G93 トランスジェニックマウスが広く研究に使われているが、その他のモデルマウスについては、分子生物学的、病理学的にも検討はなされているものの不十分であることがあげられる。したがって、様々なタイプのモデルマウスを検討することは非常に意義のあることである。変異型 SOD1 遺伝子が皮質脊髄路、脊髄前角の変性過程においてどのように関与しているかを明らかにしなければならないが、各モデルマウス共通して未だ十分とはいえないのが現状である。

我々は以前より他の FALS にみられる SOD1 遺伝子の 1 塩基置換型の変異とは異なり、SOD1 遺伝子の exon 5 に 2 塩基の欠失を確認し、この変異型 SOD1 遺伝子を強制発現させたトランスジェニックマウスの作成に成功した²。このモデルマウスの特徴は、ヒト FALS と同様に変異 SOD1 蛋白の発現レベルが低いにもかかわらず発症し、病理学的には他の ALS モデルマウスと同様に、神経細胞内には FALS に特徴的である、SOD1 を主成分とする Lewy body like hyaline inclusion (LBHI) を認めており、極めてヒト ALS に類似したものであることが挙げられる。このモデルマウス作製後から、我々はこのモデルマウスについての生化学的・病理学的な検討を現在進めているところであり、平成 19 年には今までは確認されていない分子の発現について分子生物学的、病理学的に明らかにし、海外学術雑誌に掲載された³。病態解明、早期診断、治療法開発について今後も引き続き検討していく必要のあるものと考えられる。

近年神経変性疾患に対し、治療として細胞移植の効果が注目されている。これまでに、細胞移植は胎児の (embryonic) 脊髄、神経幹細胞、嗅神経鞘細胞等が使用されている。胎児の (embryonic) 神経幹細胞が精力的に研究されているが、今直ちに使用することは困難である。そこで、近年骨髄由来の成体多能性前駆細胞が特定の実験条件の下で、神経細胞に分化し得る多能性幹細胞であるとの報告がされている。骨髄由来の細胞が *in vivo* および *in vitro* の双方で神経系へ分化する能力を有するという報告がなされており、骨髄間質細胞 (Bone marrow stromal cell 以下 BMSCs) が神経栄養因子を放出し、組織修復を促進することを示唆する報告もある⁴。今回、これらを学術的背景として、ALS 病態解明のみならず、新しい ALS 治療に骨髄由

来の成体多能性前駆細胞移植が有効ではないかと考え研究を開始したいと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、まず我々の ALS モデルマウスについて変異 SOD1 の発現だけではなく各種細胞内シグナル蛋白、各種ストレス蛋白、神経栄養因子、膜受容体等の発現について、免疫組織化学的手法、免疫電顕法を行い、大脳皮質運動野、皮質脊髄路、脊髄前角から末梢運動神経に至る、全運動神経ネットワークの生化学的、組織学的な経時変化について明らかにする。続いて、ALS モデルマウスに BMSCs を第 4 脳室より脳脊髄液中に注入し、その効果を臨床的に判定するのみではなく、注入したことによる組織変化について、免疫組織化学的手法、免疫電顕法を行い経時的に明らかにしていき、治療法開発という側面と、病態解明という 2 つの側面について明らかにしていく。

3. 研究の方法

a) マウス組織の組織学的検討

検索するマウスは、30 日、50 日、70 日、90 日、110 日、120 日、140 日、end stage (約 160 日) の各日齢を使用する。検索例数は最低 5 匹以上とする。また、正常マウスについても同様の日齢について検討する。検索部位は、神経系 (脳、脊髄、末梢神経)、筋、その他の内部臓器とする。標本作製は以下の要領で行う。① 4% パラホルムアルデヒドにて灌流固定 ② 各部位を取り出し 4% パラホルムアルデヒドにて後固定。③-1 凍結連続切片の場合: 10%, 15%, 20% スクロース PBS 溶液にて 8 時間ごと浸漬した後、液体窒素にて凍結。③-2 パラフィン連続切片の場合: アルコール置換後パラフィン包埋 ④ 切片作製: 一般染色、免疫組織化学: 6 μ m 厚連続切片。組織計測用: 20 μ m 厚連続切片。

神経細胞数の計測: KB 染色で運動神経細胞について計測する。組織計測用の 50 枚連続標本から、5 枚おきで計 10 枚につき計測し、合計の細胞数を標本枚数で割った平均を神経細胞数とする。

電子顕微鏡に対する標本は、2.5% グルタルアルデヒド固定後、エポン包埋し超薄切片作製。

免疫組織化学は ABC 法で行い、使用する抗体は、GFP, GFAP, Iba1-1, SMI32, SOD-1, SOD-2, Prx-1, Prx-2, TNF- α , IL-6, p38, Bcl-2, BDNF, NTF, HSP23, HSP70, HO-1, Trk A, Trk B である。

免疫電顕法は、pre 及び post embedding 法にて行う。

組織学的検索: HE 染色で経時的な組織変化や LBHI 等の封入体の存在を確認する。上記④に

挙げた蛋白についての免疫組織化学を行い検討する。細胞内小器官の変化については、電子顕微鏡による観察によりその形態変化を追うことと同時に、前述の物質の変化については、その細胞内局在を免疫電顕法にて明らかにする。

上位運動ニューロンの変化を明らかにするため、順行性（逆行性）軸索トレーサーである、コムギ胚凝集素（WGA）結合西洋ワサビ過酸化酵素（WGA-HRP）や Dextran Amine をマウス大脳運動野や皮質脊髄路に注入（注入量、濃度については条件により変化させる）し、皮質脊髄路、運動野大型運動神経細胞を標識する。標識された皮質脊髄路を免疫組織化学的手法にて可視化した後、運動野大型運動神経細胞数、脊髄皮質脊髄路の軸索数、軸索径について経時的に明らかにする。また、脊髄前角運動細胞についてはその数について検討する。末梢神経については大腿神経を用い、グルタルアルデヒド固定、トリインブルー染色を行った後、皮質脊髄路と同様、軸索数、軸索径について経時的に明らかにする。上記手法を用い、上位運動神経、皮質脊髄路、脊髄前角運動神経細胞、大腿神経を正常マウスと比較し、トランスジェニックマウスにおける発症過程の病理学的変化について明らかにしていく。

c) 骨髄間質細胞 (Bone marrow stromal cell 以下 BMSCs) の培養、移植

骨髄は緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する 40 日齢のトランスジェニックマウスから無菌の状態で分離する。ドナーのマウスを過量のペントバルビタールを投与して屠殺し、その脛骨と大腿骨を摘出し骨の両端を切り離し、骨髄は 21G 針を使用して骨髄細胞を取り出し α -MEM で洗い出す。採取した懸濁液は 5 分間 800rpm で遠心分離し上清は捨てる。得られた骨髄は 10% ウシ胎仔血清、グルタミン、ペニシリンおよびストレプトマイシンを加えた α -MEM で培養。48 時間毎、非接着細胞は培地を取り替えて除去し、接着細胞が細胞集落を形成したら細胞集落をトリプシンおよび 1mMEDTA を含む懸濁液で 5 分間 37°C の条件下でインキュベートして取り出し 6000 cells/cm² の密度で継代培養する。骨髄間質細胞はこのようにして 4 回継代培養する。BMSCs のモデルマウスへの移植は各日齢（組織学的検索の結果を踏まえ、発症前から発症後まで 3-4 パターンを検討）のモデルマウスについて、それぞれペントバルビタールナトリウムを用いて麻酔下におき、培養第 4 脳室から BMSCs を注入する。頭蓋正中のラムダ縫合尾側 3.5mm の部位に直径 1mm の穴をドリルで開け、この穴から注射針を挿入し、GFP トランスジェニックラット由来の成育可能骨髄間質細胞 (MSCs) を含んだ PBS 溶液 50 μ L をインスリンシリンジを用いて定位目盛り

でゆっくりと第 4 脳室に注入する。骨髄間質細胞の移植のために免疫抑制剤を使用した。d) BMSCs 移植トランスジェニックマウスの評価

BMSCs 移植トランスジェニックマウスについても、上記 a) b) と同様に脊髄の組織標本を作製検索し評価する。このとき、移植後の組織変化について経時的に追う必要もあるため、移植後の日数に応じ検索する。その結果を元に正常マウス、未治療トランスジェニックマウスとの比較検討を行う。

4. 研究成果

トランスジェニックマウス組織の組織学的検討については、生後 15、35、56、77、86、100、120、130、160 日の各日齢のマウス (n=5) の脊髄前角（頸髄、腰髄）について検索した。一般染色に加え、免疫組織化学的には、抗 GFAP 抗体、抗 Iba1-1 抗体、抗 SOD-1 抗体を用い、病理学的経時変化を明らかにするとともに、電子顕微鏡にて細胞内小器官の変化についても検索した。主な結果としては、前回報告と同様に神経細胞脱落は発症後に著明となるものの、変異 SOD1 は各日齢の神経細胞に発現し、ミトコンドリアなどの細胞内小器官の変性および細胞内封入体は極めて早期から出現していた。再現性のあるこれらの結果は、運動症状の発症以前から組織学的には神経細胞に明らかな異常所見を呈しており、発症は神経細胞機能障害による可能性が高いことを示している。この結果をもとに、引き続き骨髄間質細胞移植についての検討を行った。

骨髄間質細胞の分離培養および移植の治療的効果の判定について、本年度は、移植に用いる骨髄間質細胞の分離培養に関しては、プロトコル通り行い、安定した技術を習得するに至った。その技術を用い、発症前マウスにおける骨髄間質細胞移植を行ない、その効果について、臨床的、病理組織化学的に検討を行った。結果としては、移植群において延命効果があり、組織学的にも脊髄前角細胞は残存していたが、効果としては十分とは言えない結果であった。これらは、十分ではないにせよ移植自体の有用性を示唆するものであり、今後引き続き研究を進めていく必要性を見出す重要な結果であった。

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 3 件）

1. Eri Morita, M. Kitayama, et al. A novel cell transplantation protocol and its application to an ALS mouse model. Experimental N

eurology. 2008. 213; 431-438. 査読あり
2. Yasuhiro Watanabe, M. Kitayama, et al
. Adherent Monomer-Misfolded SOD1. PLoS
ONE. 2008. 3; e3497. 査読あり
3. Koji Doi, M. Kitayama, et al. Mitochondri
al changes in motor neurons of homozygotes
of leucine 126 TT deletion SOD1 transgenic
mice. Neuropathology. 2008 28; 269-276. 査
読あり

〔学会発表〕（計 2 件）

1.

Michio Kitayama.

Association of visual hallucinations with
reduction of MIBG cardiac uptake in
Parkinson's disease.

The 9th International Conference AD/PD
2009.3.14

Prague

2.

Michio Kitayama.

CLINICAL EVALUATION OF PARKINSON'S
DISEASE DEMENTIA: ASSOCIATION WITH
AGING AND VISUAL HALLUCINATION.

The 6th International Congress on Mental
Dysfunctions & other Non-Motor Features in
Parkinson's disease and Related disorders
2008.10.17

Dresden

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北山 通朗 (KITAYAMA MICHIO)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：70379650