

## 科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成25年5月24日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658233

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞の神経変性疾患病変部への走化に関わる分子群の同定

研究課題名(英文) Identification of factors that involved in migration of mesenchymal stem cells to lesions of neurodegenerative diseases

研究代表者

堀内 基広 (HORIUCHI MOTOHIRO)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：30219216

研究成果の概要(和文)：

プリオン感染動物の神経病変部へ MSCs が走化する際に関与するケモカインおよびそれらのレセプターを同定するために、*in vitro* 走化試験により走化に関与する因子を解析した。また、プリオン感染マウス脳に移植した MSC 上でのレセプターの発現を解析した。その結果、MSCs 上に発現する CCR3、CCR5、CXCR3、CXCR4、およびそのリガンドとの相互作用が、MSCs のプリオン病神経病変部への走化に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

*In vitro* migration assay was carried out to investigate chemoattractive factors for MSCs in the brain lesions of prion-infected mice. In addition, expression of chemokine receptor on MSCs that had been transplanted in the brain of prion-infected mice was analyzed. The combined *in vitro* and *in vivo* analyses suggest that CCR3, CCR5, CXCR3 and CXCR4 and their corresponding ligands are involved in the migration of hMSCs to the brain lesions caused by prion propagation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：骨髄由来間葉系幹細胞、プリオン、神経変性疾患、走化性、ケモカイン

## 1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞(MSCs)の自己移植は、心筋梗塞での臨床研究が始まっており、一部で機能回復が認められている。

MSCs を脳虚血や脳腫瘍モデルラットの末梢から投与しても、MSCs は神経病変部位に移行して機能回復をもたらす。MSCs が神経変性疾患で機能回復をもたらす機構として、血管新生作用、神経栄養因子の産生による神経保護作用、グリア細胞や神経細胞への分化による神経組織修復、などが考えられるが、詳細は不明であった。

## 2. 研究の目的

多能性幹細胞を用いる再生・細胞医療は、アルツハイマー病、プリオン病などの難治性神経変性疾患の治療法として期待されている。脳梗塞の臨床研究では、患者の骨髄から採取した MSCs を末梢から移植することで、機能回復が認められた症例もある。MSCs は末梢から移植しても神経病変部に走化するという特徴を有するが、その機構は殆ど判っていない。そこで本研究では、MSCs の神経変性疾患病変部への走化に関わる分子群を同定

して、走化機構を理解することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 中枢神経系組織実質内の走化機構を解析するための走化試験。

- ①走化に関わる宿主側の分子を解析するため、トランスウエルの外側に抗体で前処理した脳乳剤を、内側に hMSCs を加えて、低酸素下 (5% O<sub>2</sub>) で 24 時間培養した。走化に関与する hMSCs 側の分子を調べる場合は、hMSCs の表面に発現するサイトカイン、ケモカイン、あるいは増殖因子の受容体に対する抗体で hMSCs を前処理した。
- ②トランスウエルの外側に移動した hMSCs を NIH Image J を用いて定量解析した。
- ③走化を阻害した抗体が認識する hMSCs 側受容体の発現は、RT-PCR、およびフローサイトメーターにより解析した。

(2) 血管内皮を通過する機構を解析するための走化試験。

- ①ヒト臍帯血管内皮細胞 (Huvec) をトランスウエル内で培養した。タイトジャンクションの形成は、ウエル内外の電気抵抗値を測定して確認した。
- ②トランスウエルの外側に、抗体で前処理したプリオン感染マウス脳乳剤を加した。
- ③Huvec の単層培養が完成したトランスウエルの内側に hMSC を加え、37°C、12 時間培養し、トランスウエル外側に移行した hMSCs を NIH Image J を用いて定量解析した。
- ④MSCs 上に発現する受容体に加え、血管内皮細胞に発現しマクロファージの接着に関わる VCAM, P-selection などに対する抗体でも阻害試験を行なった。

(3) in vitro 走化試験で絞り込まれた hMSCs 側分子の発現解析。

- ①左側視床に移植した hMSCs は脳梁を通過して反対側海馬などの病変部に移動することが知られている。そこで、hMSCs を左側視床に移植後、脳梁に存在する hMSCs を走化中、反対側海馬に達した hMSCs を定着状態にあると見なした。当該分子と  $\beta$ -gal に対する抗体の蛍光二重染色により、脳梁に存在する hMSCs で発現する分子と (走化に関わる分子)、反対側海馬に存在する hMSCs で発現する分子 (定着に関わる分子) を解析した。

### 4. 研究成果

(1) in vitro 走化試験

in vitro 走化試験では、CCR3 とそのリガ

ンド (CCL5, CCL7, CCL24)、CCR5 とそのリガンド (CCL3-5)、CXCR3 とそのリガンドである CXCL10、CXCR4 とリガンドである CXCL12 に対する抗体が、MSCs のプリオン感染マウス脳抽出物への走化を阻害した。

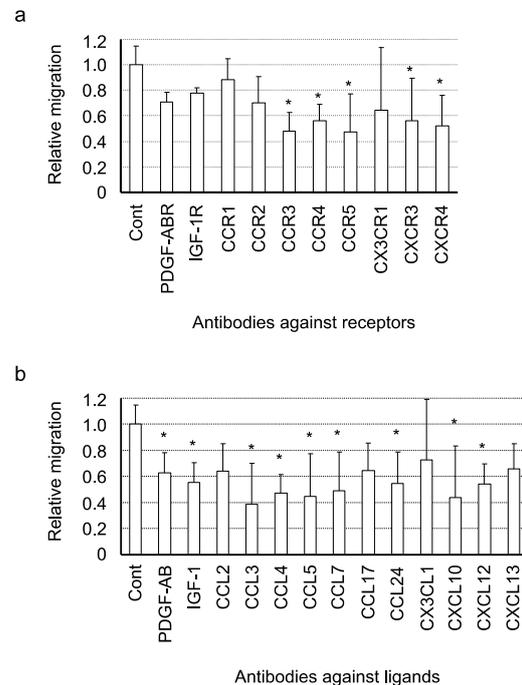


図 1. In vitro 走化試験による、走化に関わるケモカインおよびそのレセプターの探索。(a)レセプターに対する抗体、(b)ケモカイン、サイトカインに対する抗体を用いて走化阻害試験を行った。

(2) 走化に関与する因子の培養細胞系での発現。

フローサイトメーターおよび間接蛍光抗体法によりプリオン感染マウス脳抽出物で刺激した MSC で、CCR3、CCR5、CXCR3、CXCR4 が発現すること、遺伝子発現レベルも未刺激のものとは比べて上昇することから、これらのケモカインとそのレセプターの相互作用およびこれを介するシグナルは、MSC の神経病変部への走化に関与することが示唆された。

(3) 脳内に移植した MSC における走化に関与する因子の発現。

In vitro 走化試験の結果により絞り込まれた因子について、プリオン感染マウス脳に移植した MSCs 上でのレセプターの発現を解析した。左側視床に移植した hMSCs は脳梁を通過して反対側海馬に移動することが知られているので、hMSCs を左側視床に移植後、脳梁に存在する hMSCs を走化中と見なして、解析した。その結果、MSCs 上に発現する CCR3、

CCR5、CXCR3、および CXCR4 が、MSC の神経病変部への走化に関与することを明らかにした。

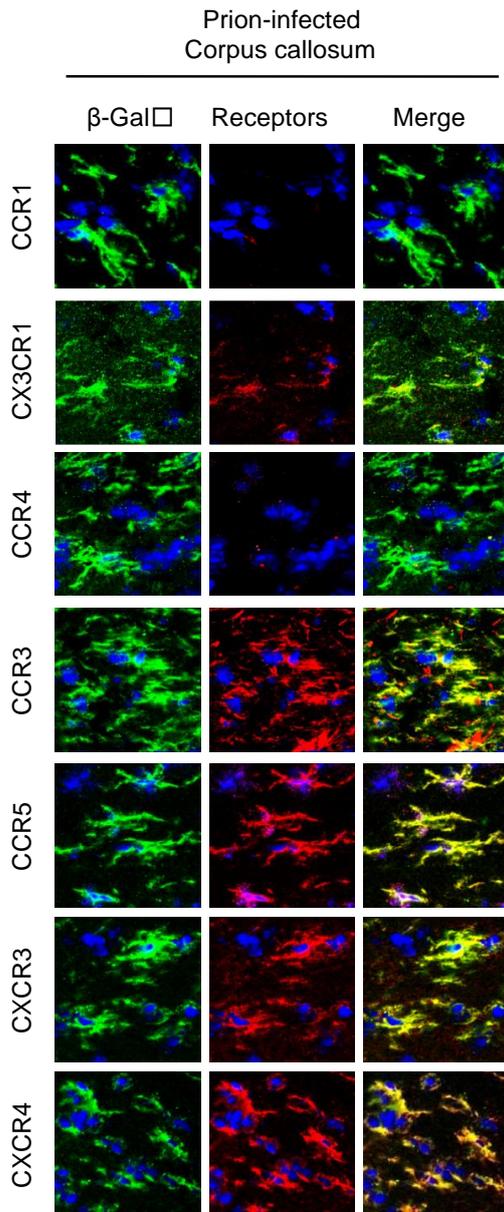


図 2. プリオン感染マウス脳内に移植した MSCs 上でのケモカインレセプターの発現。

#### (4) 血管内皮通過機構の解析

臍帯静脈上皮細胞を用いて、MSC が血管内皮細胞を通過して脳実質内に移行する機構を解析した。プリオン感染脳乳剤を抗 CCL5 抗体、抗 IL-1 $\beta$  抗体、あるいは抗 TNF- $\alpha$  抗体で処理すると、臍帯静脈上皮細胞を通過する MSCs が減少した。臍帯静脈上皮細胞をプリオン感染脳乳剤で刺激すると、ICAM-1、VCAM-1 の接着因子の発現が増加するが、抗

CCL5 抗体、抗 IL-1 $\beta$  抗体、あるいは抗 TNF- $\alpha$  抗体で処理したプリオン感染脳乳剤で臍帯静脈上皮細胞を刺激すると ICAM-1 の発現が認められなくなった。従って、CCL5、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  などのサイトカイン、ケモカインが血管内皮細胞を刺激して接着因子の発現を増加させることが、MSCs の血管内皮細胞の通過に関与することが示唆された。

#### 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 4 件)

1. Ohsawa, N., Song, C.-H., Suzuki, A., Furuoka, H., Hasebe, R., and Horiuchi, M. Therapeutic effect of peripheral administration of an anti-prion protein antibody on mice infected with prions. *Microbiol. Immunol.*, 57(4): 288-297, 2013. (査読有)
2. Yamasaki, T., Suzuki, A., Shimizu, T., Watarai, M., Hasebe, R. and Horiuchi, M. Characterization of intracellular localization of PrP<sup>Sc</sup> in prion-infected cells using monoclonal antibody that recognizes the region consisting of amino acids 119-127 of mouse PrP. *J. Gen. Virol.*, 93(Pt 3): 668-680, 2012 (査読有)
3. Hasebe, R., Raymond, G. J., Horiuchi, M., and Caughey, B. Reaction of complement factors varies with prion strains in vitro and in vivo. *Virology*, 423(2): 205-213, 2012. (査読有)
4. Song C.-H., Honmou, O., Furuoka, H. and Horiuchi, M. Identification of chemoattractive factors involved in the migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to brain lesions caused by prions. *J. Virol.*, 85(21): 11069-11078, 2011. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1. Suzuki, A., Yamasaki, T., Hasebe, R., and Horiuchi, M. Construction of mAb132-EGFP fusion proteins as a PrP<sup>Sc</sup>-specific probe. Asia Pacific Prion Symposium 2012 (July, 29-30, 2012, Yokoyama, Japan) Pacifico Yokohama
2. Horiuchi, M., Yamasaki, T., Hasebe, R. and Takahashi, Y. Analysis of PrP<sup>Sc</sup> accumulation and glial cell activation

in brains of prion-infected mice at the early stage of infection. Prion2012 (May 10-12, 2012, Amsterdam, The Netherlands) UV University Amsterdam

3. Takahashi, Y., Song, C.-H., Yamasaki, T., Hasebe, R., and Horiuchi, M. Immunohistochemical analysis of PrP<sup>Sc</sup> accumulation and activation of astrocytes and microglia in early stage of prion infection. APPS2011 (July, 10-11, 2011, Karuizawa, Japan) Hotel Marroad Karuizawa
4. Yamasaki, T., Garon, G. B., and Horiuchi, M. Detection of newly generated PrP<sup>Sc</sup> in Neuro2a cells inoculated with fluorescent-dye labeled purified PrP<sup>Sc</sup>. XV International Congress of Virology (Sept, 11-16, 2011, Sapporo, Japan) Sapporo Convention Center

〔図書〕 (計 2 件)

1. 山崎 剛士、堀内 基広 プリオンの感染と細胞内動態 Dementia Japan 27: 215-224, 2013
2. 堀内 基広 プリオン病 最新医学 66: 2713-2720, 2011

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀内 基広 (HORIUCHI MOTOHIRO)  
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授  
研究者番号：30219216