

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461315

研究課題名(和文)複数神経栄養因子による生存シグナル増強 - 間葉系幹細胞と人工染色体の利用 -

研究課題名(英文)Use of a human artificial chromosome for delivering trophic factors

研究代表者

渡辺 保裕 (Watanabe, Yasuhiro)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：20335540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)は進行性に全身の筋力が低下する難病で、有効な治療はない。有望視されている細胞移植治療と神経栄養因子を組み合わせ、ALSの動物モデルへの治療を検討した。人工染色体(HAC)を用いてグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)、インスリン様成長因子(IGF-1)、肝細胞増殖因子(HGF)を同時発現する骨髄間葉系幹細胞株を樹立した。種々の日齢(60, 80, 100, 120日)のALSマウスに、経静脈的もしくは脳室内投与で移植を実施した。移植を脳室内へ100日齢に行くと対照と比較して生存期間は有意に延長した。すなわちHACを用いて治療効果を強化することに成功した。

研究成果の概要(英文)：A human artificial chromosome (HAC) can transfer multiple and/or large transgenes along with their regulatory elements thereby resembling native chromosomes. Using this HAC system, we established mesenchymal stem cells (MSCs) that simultaneously expressed hepatocyte growth factor, glial cell line-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor 1, termed HAC-MSCs. We then introduced the cells for the treatment of a neurodegenerative disorder, amyotrophic lateral sclerosis (ALS). The HAC-MSCs were transplanted via the fourth cerebral ventricle (CV) or intravenous (IV) infusion at various ages of recipient mice. We confirmed a statistically significant increase in lifespan via CV transplantation at 100 days compared to the controls. This effect was not seen in mice transplanted with MSCs lacking the HAC. We successfully enhanced the trophic potential of the MSCs using the HAC. This strategy could be a promising direction for the treatment of neurodegenerative disorders.

研究分野：臨床神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 人工染色体 神経栄養因子 細胞移植

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) において神経栄養因子による治療への期待は大きい。しかし運動神経での栄養因子受容体の発現は ALS の進行に伴い減少し、栄養因子が十分な効果を得られない要因となっている。本研究では神経栄養因子を多種類併用して運動神経の生存シグナルを強力に活性化することで、ALS における神経細胞死の抑制効果を検証する。ALS の治療応用へと展開するための研究基盤を確立する。

## 2. 研究の目的

ALS 治療に最も有望な栄養因子としてグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、インスリン様成長因子 (IGF-1) が挙げられる。人工染色体 (HAC) 技術を利用して、GDNF、HGF、IGF-1 を恒常的に高発現する骨髄間葉系幹細胞 (MSC) を樹立する。この細胞を ALS モデルマウスに移植し、治療効果の検討を行う。

## 3. 研究の方法

ALS における神経栄養因子と細胞移植治療の組み合わせを実際の臨床応用へと展開するための基礎実験として、以下の研究を行う。

(1) P1 由来人工染色体 (PAC) に GDNF、IGF-1、HGF に加え標識蛋白 (GFP、ルシフェラーゼ) の cDNA を導入する。

(2) 微小核細胞融合 (MMCT) 法により HAC ベクターを搭載した Chinese hamster ovary (CHO) 細胞にインサートを含む PAC を導入する。

(3) *Cre-loxP* 部位特異的組換えにより目的のインサートを含む CHO 細胞クローンを得る。

(4) MMCT 法により CHO クローンからヒト不死化 MSC に HAC を転移させる。

(5) 得られた HAC 導入 MSC 細胞株を解析する。

(6) 最も適した細胞株を用いて SOD1<sup>G93A</sup> モデルマウスの髄腔内に 60 日、80 日、100 日齢で移植し臨床効果検討をおこなう。

(7) (6) と同様に細胞移植を計上撒く敵に行う。

(8) ALS モデル動物への移植効果の臨床判定と移植細胞の *in vivo* 生体イメージでの追跡を行う。

(9) 移植細胞の病理的变化および生化学的解析を行う。

## 4. 研究成果

解析した 41 の CHO クローン中 13 クローンで PAC 由来インサートの全長が保持されていた。うち 2 クローンで全てのインサート領域は CHO 染色体上ではなく HAC 上に存在した。CHO 細胞クローンから MSC への MMCT にて、46 クローン中 30 クローンで PAC 由来のインサート領域が保持されていた。RT-PCR 解析にて、うち 2 クローンですべての導入した cDNA に由来する mRNA が高発現していた。GDNF、IGF-1、HGF の ELISA、ルシフェラーゼ活性、GFP の信号

の解析などにより、移植治療に最適と考えられる細胞株 MSC3-31 を得た。

本細胞株を使い SOD1<sup>G93A</sup> モデルマウスの髄腔内へ 60 日, 80 日, 100 日齢で移植を行った。60 日齢移植では雌のグループ間の比較においてのみ、罹病期間で統計的な有意差を認められた。80 日齢では何れの項目でも有意差を認めなかった。100 日齢では発症時期に移植群と対照間で差を認めなかったが、生存と罹病期間で MSC3-31 移植群が有意に延長する傾向を認めた。

経静脈的投与では治療群で 100 日齢における移植で、発症時期（治療群：対照群=134.4±1.6：132.9±1.9）、死亡時期（治療群：対照群=145.7±2.3：148.4±2.0）、有病期間（治療群：対照群=11.4±1.3：15.6±1.4）に有効な治療効果を確認しえなかった。60 日齢移植群では移植による発症時期（治療群：対照群=134.9±2.3：130.5±2.3）の遅延傾向がみられたが、有意な差は見られず、死亡時期（治療群：対照群=149.9±2.9：147.0±3.5）も有意差には至らなかった。

## 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 1 件)

- 1) Watanabe Y, Kazuki Y, Kazuki K, Ebiki M, Nakanishi M, Nakamura K, Yoshida Yamakawa M, Hosokawa H, Ohbayashi T, Oshimura M, and Nakashima K:  
Use of a Human Artificial Chromosome for Delivering Trophic Factors in a Rodent Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis.  
Mol Ther Nucleic Acids 4: e253, 2015.

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1) 中西真実, 渡辺保裕, 中島健二: 神経栄養因子高発現間葉系幹細胞を用いた細胞シート移植による ALS 治療の試み。  
第 33 回日本神経治療学会総会, 名古屋国際会議場。2015 年 11 月 26 日(木) - 28 日(土)。
- 2) Ebiki M, Nakamura K, Hosokawa Y, Nakanishi M, Yamakawa M, Watanabe Y, Nakashima K: Optimal conditions for transplantation of mesenchymal stem cells in the ALS mouse model.  
25th International Symposium on ASL/MND, Brussels, Belgium, Dec 5-7, 2014.
- 3) 恵比木満喬, 中村和臣, 細川洋行, 中西真実, 山川三穂, 渡辺保裕, 中島健二: 神経栄養因子高発現型間葉系幹細胞の ALS モデルマウスへの適正な移植条件の検討。  
第 32 回日本神経治療学会総会, 東京ドームホテル。2014 年 11 月 20 日(木) - 22 日(土)。
- 4) Watanabe Y, Yamakawa M, Ebiki M, Hosokawa H, Yasui K, Nakano, Nakashima K:  
Chromosomally-modified mesenchymal stem cells secreting GDNF, IGF-1, and HGF attenuate disease progression in an ALS animal model.  
24th International Symposium on ASL/MND, Milan, Italy, Dec 6-8, 2013.

5) 渡辺保裕, 香月康宏, 河瀬真也, 安井建一, 北山通朗, 中野俊也, 押村光雄, 中島健二: 人工染色体技術を利用した GDNF, IGF-1, HGF 分泌ヒト骨髄間葉系幹細胞の樹立.

第 31 回日本神経治療学会総会, 東京ドームホテル. 2013 年 11 月 21 日(木) - 23 日(土).

6) 渡辺保裕, 山川三穂, 恵比木満喬, 香月康宏, 香月加奈子, 河瀬真也, 安井建一, 北山通朗, 中野俊也, 押村光雄, 中島健二: ヒト人工染色体を利用した GDNF, IGF-1, HGF 分泌間葉系幹細胞の樹立と ALS マウスへの治療応用.

第 12 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜. 2013 年 3 月 21 日(木) - 23 日(土).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 保裕 ( Watanabe Yasuhiro )

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号: 20335540

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: