

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

幹細胞を用いた筋ジストロフィーに対する治療に関する基礎研究
(幹細胞の単離)

分担研究者 加茂 功
国立精神・神経センター神経研究所
微細構造研究部 室長

研究要旨

我々はラット胸腺、骨髄細胞の研究を通して、筋へ分化する能力を有する幹細胞が存在することを報告してきた。これまで、ラットばかりでなく、マウスの胸腺からも、筋に分化する細胞の樹立に成功した。特に、このマウス胸腺幹細胞は筋肉、B細胞、脂肪細胞へと分化する多能性幹細胞であることが判明した。これらの未分化な幹細胞の特異抗原の解析や増殖機構を解明することは医療への応用を考慮する上で重要である。前年に引き続き、骨髄から筋へ分化する幹細胞に対する、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作成し 筋-骨髄血球系細胞との相異、種差を超えた骨髄由来筋幹細胞共通分化抗原等の解析を目標に、モノクローナル抗体の特異性の解析を行った。さらに胸腺の筋様細胞前駆細胞が産生する新規のサイトカインの一つがバイグリカンであることを同定し、過剰発現が自己免疫疾患重症筋無力症を発症する事を見出した。

A. 研究目的

近年、臍帯、胎盤、骨髄各器官には幹細胞が存在し、これを治療の観点から、利用する試みがなされている。従来血球系の造血器官としてのみ注目されてきた骨髄や、胸腺に近年我々は、血球系以外にも筋細胞分化能を有する幹細胞が存在することを見出し報告してきた。筋分化、筋疾患治療の観点からその重要性が指摘されている。前年度に引き続き本年度もヒトへの応用を考慮し、この幹細胞の有効な検索子となる特異分化抗原認識モノクローナル抗体の解析を行う、一方これまで、この様な幹細胞が如何にして自己複製と分化能力を有するのかその機構は不明な点が多い、胸腺から樹立した筋様細胞前駆幹細胞は多種サイトカインを産生していた。これらのサイトカインが、オートクライン的に産生されそれ自身の分化増殖因子として、またはパラクライン的に周辺細胞の分化増殖に影響する事が考えられる。本年度は胸腺筋様細胞の分化増殖因子の詳細な作用について検討する。

B. 研究方法

モノクローナル抗体の作成：ラット骨髄由来筋幹細胞株を Balb/c マウス尾静脈、腹腔に頻回免疫し、

脾臓細胞とマウスミエローマ細胞を定法通り融合し、ハイブリドーマを樹立。R613BM 標的細胞を 96 well plate に培養し標的抗原として、クローン化を行った。陽性クローンをさらに、ラット由来筋分化能を有する細胞 4 種と、アストロサイト、胸腺上皮細胞をそれぞれ一種用い、特異モノクローナル抗体の同定につとめた。胸腺筋様細胞の分化増殖因子のアッセイ：造血性因子の精製は骨髄系継代細胞 NFS-60 を用い、トリチュームチミジンの取り込みによる増殖アッセイで行った。造血因子の免疫機能に対する作用は T 細胞の欠落しているヌードマウスの脾臓細胞による *in vitro* の抗体産生法を利用し、調べた。

C. 研究成果

- (1) 血球系細胞の分化増殖器官である骨髄からクローン化した細胞を抗原とし 18 種のモノクローナル抗体産生細胞株を樹立。
- (2) 6 種の細胞を用いて特異性の幹細胞特異抗体をスクリーニング。
- (3) 重症筋無力症胸腺に於ける B 細胞増殖と筋幹細胞増殖との関連を胸腺由来の筋幹細胞を用い、新規造血因子 80-kDa、100-kDa の造血性バイグリカンを含め、多種のサイトカインを産生すること

を見出した。さらに重症筋無力症ではこの筋に分化する能力を有する前駆細胞が多数増加していることから、これらの細胞からは正常閾値を超えて、多くのサイトカインが産生され、胸腺内での AChR に対する自己免疫反応を引き起こすサイトカインフィールドを形成し、B細胞を活発に増殖させると考えられる結果を得た。

(4) そこで、この胸腺内に産生されるサイトカインを同定したところ、T細胞のサイトカインは IL-2 のみが単独で産生され、他には筋様細胞のサイトカイン特に、造血性バイグリカンの産生が見られた。

(5) ヌードマウス脾臓細胞による *in vitro* 抗体産生系を用いて、これら二因子の作用を調べたところ、それぞれ単独では微弱な抗体産生誘導能しか発揮しないが、両者の組み合わせで、数百倍にもものぼる著しい相乗効果があることをはじめて見出した。胸腺摘出が極めて高い治療効果を示すのはこの様な異所性の筋幹細胞の異常増加が抗原である AChR と造血性バイグリカンのようなサイトカインを胸腺局所に産生することにより胸腺を抗体産生B細胞増殖の主要機関に変化させているためと考えられることを実験的にも証明できた。

D. 考察

これまで、ラット骨髄由来骨芽細胞の継代可能なクローンを樹立した。さらに、この細胞に対する18株のモノクローナル抗体を樹立し、筋の幹細胞固有の新規分化抗原の解析を行い、特異性の高いクローンに対する抗原の生化学的特徴を解析中であり当初の目的の一部は達成できた。今後の有効利用が期待できる段階にある。一方胸腺の筋様細胞前駆細胞は種々のサイトカイン特に造血性バイグリカンを多量産生し、その閾値を超えた産生が特有のサイトカインフィールドを形成し、T、B細胞を活性化し、自己免疫発症を誘導すると考えられる。この一連の研究により、重症筋無力症発症機構と、胸腺摘出の有効性が論理的にはじめて説明できた。

また、胸腺筋様幹細胞がバイグリカンを多量産生して重症筋無力症発症維持に重要な作用をする一方、バイグリカンの欠損がディストロフィー症状を起こすことが米国から発表され、当因子の過不足が筋病理類型決定に大きく関わることが明らかになりつつある。医療の点で胸腺摘出の有効性が論理的に説明できた。

かになりつつある。医療の点で胸腺摘出の有効性が論理的に説明できた。

我々が骨髄、胸腺から見出した筋に分化する幹細胞はリンパ球、脂肪細胞へも分化する多分化能を有する細胞であることが判明した。特定の分化抗原の研究と、自己複製、分化に至る機構の解明が今後の課題である。

E. 結論

骨髄幹細胞由来細胞に対するモノクローナル抗体産生細胞を樹立、さらに胸腺筋幹細胞からは造血性バイグリカンが産生されており、胸腺内B細胞の増殖に重要であることが判明した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

<英文>

1. Kamo, I., Tomoyasu, H. and Kikuchi, A.:
Cytokine field of hyperplastic thymus associated with myasthenia gravis,
J. Neurological Sci. 199: s95, 2002.
2. Kikuchi, A., Kikuchi, T., Tomoyasu, H., Iwakami, N., Fukushima, T. and Kamo, I.:
Potential roles of two new haemopoietic factor in brain physiology,
J. Neurological Sci. 199: s95, 2002.
3. Tomoyasu, H., Kikuchi, A. and Kamo, I.:
Analysis of B-cell proliferation mechanism in the myasthenic hypertrophic thymus,
Differentiation 70: 375-375, 2002
4. Kikuchi, A. and Kamo, I.:
Haemopoietic biglycan and IL-2 synergistically induce antigen-specific B-cell proliferation - A potential mechanism of anti-AChR antibody production in the myasthenic thymus.
Tohoku J. Exp. Med. In press. 2003
5. Kikuchi, A. and Kamo, I.:
Haemopoietic biglycan in Recent Research Developments in Immunology
In press 2003, ed: S.G. Pandali, Research Signpost, India

II. 学会発表

1. Kamo, I., Tomoyasu, H., and Kikuchi, A.:
Cytokine field of hyperplastic thymus associated with myasthenia gravis
10th International Congress of Neuromuscular Diseases, July 11, 2002, Vancouver Canada
2. Kikuchi, A., Kikuchi, T., Tomoyasu, H., Iwakami, N., Fukushima, T. and Kamo, I.:
Potential roles of two new haemopoietic factors in brain Physiology
10th International Congress of Neuromuscular Diseases, July 11, 2002, Vancouver Canada
3. Tomoyasu, H., Kikuchi, and Kamo, I.:
Analysis of B-cell proliferation mechanism in the myasthenic hyperplastic thymus
12th International Conference of the International Society of Differentiation Sep. 11, 2002, Lyon, France
4. 加茂功、友安浩、菊池愛子
重症筋無力症における胸腺内抗体産生機構
第61回日本癌学会総会、東京、2002、10. 1
5. 菊池愛子、加茂功
新規 80-kDa と 100-kDa 造血因子の脳内に於ける生理作用
第74回日本生化学会大会、京都、2002、10. 16
6. 友安浩、山本弘、菊池愛子、加茂功
重症筋無力症過形成胸腺における抗体産生B細胞増殖機構について
第55回日本胸部外科学会総会、福岡、2002、10. 10

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

骨格筋における再生機構の解明に関する研究

分担研究者 林 由起子
国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部室長

研究要旨

筋の再生過程には筋細胞基底膜と筋細胞膜の相互連関がきわめて重要である。我々は細胞表面膜糖蛋白質 α -dystroglycan 糖鎖修飾の異常が先天性筋ジストロフィー群において、きわめて重要な役割を担っていることを報告した。また本邦における dysferlinopathy の頻度、臨床分子病理学的特徴をまとめ報告した。

A. 研究目的

筋ジストロフィーの基本病態である壊死・再生の病態を探り、骨格筋における再生機構の解明を目的とする。

B. 研究方法

筋ジストロフィーの中でも特に強い筋障害を生後早期に呈する先天性筋ジストロフィー(CMD)と頻度の高い肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)を中心に、ヒト生検骨格筋を用い筋ジストロフィー関連タンパク質並びに筋壊死・再生にかかわる因子の発現および遺伝子変異の検索を行い、病態との関連を検討した。

（倫理面への配慮）

ヒト組織を用いるに当たり、十分にインフォームドコンセントの得られたものに限り、匿名化した上で使用した。

C. 研究結果

1) 福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)は我が国特異的な疾患で中枢神経障害を伴う重症のCMDである。我々はFCMD類縁疾患であるmuscle-eye-brain病(MEB)、Walker-Warburg症候群(WWS)、LGMD2I型の遺伝子変異を同定し、またその骨格筋においても細胞表面膜蛋白質 α -dystroglycan (α -DG)の糖鎖修飾異常が認められることを報告した。

2) LGMD2B および三好遠位型ミオパチー(MM)はともにdysferlin遺伝子の異常による疾患であるが、筋障害部位は同一家族内でも異なっている。我々は本邦dysferlinopathy患者についてdysferlin蛋白質の発現と遺伝子変異の検索をおこなった。その結果LGMD2Bが本邦のLGMDの中でも2番目に頻度の

高い疾患であることをみだし、また、本邦で頻度の高い遺伝子変異の同定、遺伝子変異と臨床像との関連について報告した。

D. 考察

骨格筋の壊死・再生には細胞外基底膜と細胞間の情報伝達が重要な役割を担っていると考えられる。特にmerosinと α -DGとの連関は筋細胞の生存・維持に不可欠である。我々の研究成果により、FCMDのみならずその類縁疾患においても α -DGの糖鎖修飾が病態に深く関わっていることを示した。一方、筋細胞内外の情報伝達と再生機構との詳細な関連、また糖鎖の具体的機能については今後検討していく必要がある。また、中枢神経系の発生においても同様の機構が重要であることが示唆され、今後神経系の発生・発達の分野へと研究の展開されることが期待される。

また、dysferlinopathyの研究では、本邦における頻度とその臨床病理学的特徴をまとめた。本疾患では、活発な筋細胞壊死・再生現象が生じているが、dysferlinの具体的機能や疾患病態に関しては今後検討していく必要がある。

E. 結論

先天性筋ジストロフィーの発症機序に細胞表面膜蛋白質 α -DGの糖鎖修飾が重要な役割を担っていることを示すとともに、本邦のdysferlinopathyの臨床分子病理学的特徴について報告した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

I. 論文発表 計 5 件

1. Driss A, et al. Fukutin-related protein gene mutated in the original kindred limb-girdle MD 2I. Neurology (in press).
2. Tagawa K, et al. Protein and gene analyses of dysferlinopathy in a large group of Japanese muscular dystrophy patients. J Neurol Sci (in press).
3. Taniguchi K, et al. Worldwide distribution and broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease. Hum Mol Genet, 12:527-534, 2003.

他

II. 学会発表 計 6 件

1. 林 由起子,他：福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD)における α -ジストログリカン (α -DG)の選択的欠損. 日本神経学会総会 2002.5 東京
2. YK Hayashi, K Tagawa, M Ogawa, Y Keira, K Goto, K Kawabe, and I Nishino. Dysferlinopathy in Japan. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases. Jul 7-12, 2002, Vancouver, Canada.

他

H. 知的所有権の出願・取得状況

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌, 巻, ページ, 年
Yuasa K, Sakamoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Tanouchi A, Yamamoto H, Li J and Chamberlain JS, Xiao X, and <u>Takeda S</u> :	Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product.	<i>Gene Ther</i> 9: 1576-88, 2002
Yamamoto K, Yoshida K, Miyagoe Y, Ishikawa A, Hanaoka K, Nomoto S, Kaneko K, Ikeda S, and <u>Takeda S</u> :	Quantitative evaluation of expression of iron-metabolism genes in ceruloplasmin-deficient mice.	<i>Biochim Biophys Acta</i> 1588:195, 2002
Hosaka Y, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y, Yuasa K, Matsuda R, Ikemoto T, Kameya S, and <u>Takeda S</u> :	α 1-Syntrophin-deficient skeletal muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of neuromuscular junctions during regeneration.	<i>J Cell Biol</i> 158: 1097-1107, 2002
Sakamoto M, Yuasa K, Yoshimura M, Yokota T, Ikemoto T, Suzuki M, Dickson G, Miyagoe-Suzuki Y and <u>Takeda S</u> :	Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into <i>mdx</i> mice as a transgene.	<i>Biochem Biophys Res Commu</i> 293(4): 1265-72, 2002

20020920

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.24の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。