

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

神経・筋変性疾患における細胞移植システムの構築と
自己細胞移植治療法の開発

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 出沢 真理

平成20(2008)年 3月

目 次

I. 総括研究報告書	
神経・筋変性疾患における細胞移植システムの構築と 自己細胞移植治療法の開発	----- 1
出沢 真理	
II. 分担研究報告書	
1. 神経・筋変性疾患における細胞移植システムの構築と 自己細胞移植治療法の開発	
～霊長類パーキンソンモデル作成、移植、解析～	----- 10
林 拓也	
2. 神経・筋変性疾患における細胞移植システムの構築と 自己細胞移植治療法の開発	
～生体材料開発・DDS～	----- 14
田畑 泰彦	
3. 神経・筋変性疾患における細胞移植システムの構築と 自己細胞移植治療法の開発	
～幹細胞としての筋衛星細胞の単離と遺伝子発現解析～	----- 17
今村 道博	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 19
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 24

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総括研究報告書

神経・筋変性疾患における細胞移植システムの構築と自己細胞移植治療法の開発

研究代表者 出沢真理 京都大学医学研究科・准教授

研究要旨 ヒト骨髄間質細胞からドーパミン産生細胞と骨格筋が高い効率で選択的に誘導されるシステムを確立した。本研究では患者本人の細胞を用いる自己細胞移植治療を目指して、これらの誘導細胞の安全性を評価する。また、生体内での細胞の生着、分化促進、機能発揮、組織の機能修復を図るために、誘導細胞と同時に生体材料、液性因子、血管前駆細胞などの要素を盛り込んだ移植システムの築を検討し、神経・筋変性疾患への実用性の高い自己細胞移植方法の確立を目指す。

分担研究者

林拓也	国立循環器病センター研究所 先進医工学センター放射線 医学部・室長
田畑泰彦	京都大学再生医学研究所 生体組織工学研究部門・教授
今村道博	国立精神神経センター 遺伝子疾患治療研究部・室長

A. 研究目的

骨髄間質細胞は成人骨髄液から培養可能であり、接着性細胞として短期間に大量に得られる。また倫理問題のハードルが低いこと、骨髄バンクの利用が可能であるなど現実的利点を持つ。患者本人の細胞を利用することで、倫理問題や免疫拒絶などの問題から解放される「自己細胞移植治療」が可能となる。

細胞移植治療における最大の懸案は如何に分化誘導を制御し、目的とする細胞を効率よく誘導するかという点にある。研究代表者出沢はこの懸案を解決し、ヒトへの実用化に極めて近い成果を挙げた。即ち発生分化に関わるNotch 遺伝子導入やサイトカイン刺激を組み合わせ、極めて高い効率（90～96%）で神経およびドーパミン産生細胞（Dezawa et al, J Clin Invest, 2004; Mimura et al, J Neuropath Exp Neurol, 2005）や筋衛星細胞を含む骨格筋細胞（Dezawa et al, Science, 2005）を誘導する極めて優れた方法を開発した。

細胞移植治療においては、機能性細胞を有効に得る事がもちろん大前提ではあるが、これらの細胞を如何にして生体に効率よく生着させ、分化を促進し、生体で機能を発揮させ、組織全体の機能修復を図るかというのが最終的な目標である。特に神経・筋変性疾患においては、足場となるべき組織自体がすでに荒廃し、如何に機能性細胞を移植しても、有効な移植にはつながらないというのが現実的に直面する問題であり、例え実用性の高い骨髄間質細胞を用いた自己細胞移植治療であって

も、これらの懸案の解決無しには、真の実用化には向かうことが出来ない。

本プロジェクトでは誘導細胞と同時に生着・分化・機能発揮に必要とされる要素を盛り込んだ移植システム（システムアプローチ）を構築し、有効な細胞移植方法の確立を目指し研究を進める。

本年度は以下の点に焦点を当てて研究を推進した。

1. 細胞移植治療を実現するための生体材料の検討として、骨髄間質細胞への導入技術について検討する。分化遺伝子（神経・筋誘導ではNotch遺伝子を導入する）の導入効率を上げ、なおかつ細胞障害性を低くするために、非ウイルス性キャリアをデザインし、遺伝子導入高率とそれともなう神経細胞への分化を調べる。
2. 骨髄間質細胞から誘導する神経細胞の分化度と宿主脳における生着・機能回復に関する検討を脳梗塞モデルで行なう。
3. 移植細胞の足場となるマトリックス、血管新生促進の検討を脊髄損傷モデル、脳梗塞モデルで行なう。
4. パーキンソンモデルへの移植応用をめざし、霊長類動物において再現性の高いパーキンソン病モデルサルを作成し（細胞移植による）ドーパミン補充療法の有効性判定のためのエンドポイントを策定する。
5. 骨髄間質細胞から誘導する骨格筋細胞の安全性をヒトとイヌ（ビーグル犬）に関して検討を行なう。
6. 筋ジストロフィーに対する自家筋衛星細胞移植の確立を目標に、筋衛星細胞のalpha-dystroglycanの糖鎖修飾が筋衛星細胞の維持、活性化、増殖、分化に与える影響を検討する。

B. 研究方法

(1) 細胞移植治療を実現するための生体材料の検討：細胞の表面レセプターには糖を認識するものがあり、このレセプターを利用することを考えた。糖認識レセプターに認識される糖の重合体である多糖を出発材料として、アニオン性の遺伝子と複合化（コンプレックス）するために多糖のカチオン化修飾を行った。通常、細胞内に取り込まれた物質は、まずエンドソームに運ばれ、そこで、分解される運命にある。この過程を回避するためにはエンドソームのpHを低下させない緩衝作用をもつ性質が必要である。このような要求から、生体アミンであり、かつpH緩衝能をもつスペルミンを選び、多糖への化学導入を行った。多糖であるプルランの水酸基をカルボジイシダゾール (CDI) で活性化した後、スペルミンを加え、水酸基とスペルミンの末端アミノ基とを化学結合させた。得られたカチオン化デキストランと遺伝子プラスミドDNAを水溶液中で混合、両者のポリイオンコンプレックスを形成させた。このポリイオンコンプレックスを骨髄間質細胞と共に培養しNotch遺伝子導入を行った。その際、プラスミドDNA—カチオン化デキストランコンプレックスを培養液中に投入する従来法、とコンプレックスをコーティングした基材上で細胞を培養し、遺伝子を導入する方法（リバーストランスフェクション法）の両方を比較した。次に、遺伝子導入されたMSCの神経細胞への分化誘導を、免疫染色とドーパミン産生測定によって評価した。遺伝子導入培養の前後における細胞の生存率の変化を調べ、遺伝子導入による細胞毒性を評価した。

(2) 骨髄間質細胞からの神経誘導と脳梗塞モデルでの分化度と有効性の相関：ラットの骨髄間質細胞にNotch intracellular domain (NICD)を含むpCI-neoベクターをlipofectionにて導入しG418で選択をする。これらの細胞を神経幹細胞用の浮遊培養系 (free floating system; (Neurobasal medium supplemented with B27, bFGF and EGF for 8 days)) で培養すると、神経幹細胞と同様にsphereを形成する。この段階を神経前駆細胞様細胞とする。これらの細胞をさらに低血清とEGFの除去、あるいはbFGF, FSK, CNTFのサイトカイン刺激によってpost-mitotic neuronへ分化させることが可能である。この段階の細胞を誘導神経細胞 (post-mitotic neuron) とする。これらの細胞をラット中大脳動脈塞栓によって作成する脳梗塞モデルに移植し、生着 (免疫染色など)、機能回復 (limb placing test, morris water maze test, など) を検討した。

(3) 脊髄損傷モデルを用いた細胞の足場の検討：脊髄損傷はWistar ratにNew York impactorで圧迫モデルを作った。

実験系としては(1) FGF gelatin 徐放剤のみ投与、(2) FGF gelatin 徐放剤+Schwann cell、(3) FGF gelatin 徐放剤+Schwann cell+ Neural Progenitorを計画したが、今年度は1, 2を実施した。BBBscore (下肢運動機能評価)、体重の推移、Inclined plain test、Dynamic Plantar Aesthesiometer、7370PlantarTestなどを実施した。

(4) パーキンソン病モデルサルでsのドーパミン補充療法の有効性判定：8頭のカニクイザルを用いて片側パーキンソン病モデルを作成し、運動課題による運動機能障害度の測定や、ポジトロンエミッショントモグラフィ (PET) によるドーパミン機能障害度の測定を行い本研究最終目標 (骨髄間質細胞由来神経細胞移植) のプライマリーエンドポイントの策定を行った。

パーキンソン病モデルザルの作成はBankiewiczら (*Life Sci*, 1986) の方法に基づき脳血管撮影下において右内頸動脈より0.4-0.8mg/kgの1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) を投与し作成した。

1) 運動機能障害度を、片側前肢毎の餌取り課題を行いその遂行速度や餌取り個数を測定、2) ドーパミン機能を、PETを使いドーパミン細胞のプレおよびポストシナプスのマーカーを用いて評価した。餌取り運動課題は、MPTP投与前、投与1週間、1ヶ月後、2ヶ月後、3ヶ月後に繰り返し測定し各タイムポイントにて3日間連続測定 (一日につき片側前肢25回試行、3日間で75回の試行) することで測定精度を向上させた。餌取り運動テストの解析には、前肢餌取り運動時の餌取り速度を、PETの結果を知らない第3者によるビデオ観察により6段階 (0点：非常に遅いか無動、～5点：非常に速い動き) で評価した。

またPETのドーパミン機能測定にはプレシナプスの機能評価にドーパミントランスポータのマーカー (^{11}C -CFT)、ポストシナプスの評価にD1受容体 (^{11}C -SCH23390) およびD2受容体 (^{11}C -raclopride) を用いた。このうち特に ^{11}C -CFTはプレシナプスに存在することから残存するドーパミン細胞数を反映すると考えられる。PET撮像データを参照領域法により定量解析することで各線条体の結合能を計算した。PETによる測定再現性と個体間変動を評価するために正常時 (MPTP投与前) のPET測定も行った。

(5) 骨髄間質細胞からの骨格筋誘導：骨髄間葉系細胞を特定の密度で経代培養した後、サイトカイン投与 (bFGF 10ng/ml),

forskloin (FSK 5 μ M), neuregulin (200ng/ml) および PDGF (5ng/ml) を含んだ培地 (10% FBS, alpha-MEM) を行い、その後 NICD plasmid 導入を lipofection 用いて行い、G418 にて選択する。その後、100% confluent に達したところで分化培地を投与することによって多核の骨格筋を誘導することが可能となる。

誘導細胞の性質を調べるために FACS において CD34, CD45, c-Kit 陰性の細胞を採取し同様に筋誘導を行い解析した。

さらに誘導した細胞における骨格筋マーカーの発現を real-time PCR, 免疫染色等で検証を行なった。また誘導骨格筋の安全性を確認するために、核型解析によって染色体の変異、欠損等の有無を調べ、さらに、ヌードマウスの大腿筋にヒトからの誘導細胞を注入し、6ヵ月後に全身状態と病理検査を行い、腫瘍形成などの有無を確認した。

骨格筋が誘導されるメカニズムの解析として、ラットおよびヒトでの骨髄間葉系細胞に bFGF, FSK, PDGF, Neuregulin を投与し NICD-GFP plasmid を導入して 24 時間後に細胞を採取し、GFP の免疫沈降を行い、Notch に特異的に結合する蛋白の解析を行なった。

(6) 筋ジストロフィーに対する自家筋衛星細胞移植の確立：SM/C-2.6 抗体で単離した筋衛星細胞を 20% FCS, bFGF 2.5ng/ml を含む DMEM (増殖培地) で培養し、増殖能を MTT アッセイで検討した。また、筋衛星細胞の移動能を transwell migration assay および wound healing assay で検討した。さらに野生型及び POMGnT1 ノックアウトマウスの骨格筋からセルソーターで単離した筋衛星細胞にレトロウイルスを用いて POMGnT1 cDNA を導入し、糖鎖修飾と増殖能の回復を検討した。さらに GFP-Tg 及び GFP-Tg/POMGnT1 ノックアウトマウスの骨格筋から筋衛星細胞を調整し、NOD/Scid マウス骨格筋 (前脛骨筋) へ移植し、2週間後、移植効率 (GFP 陽性筋線維の形成率) を検討した。

(倫理面への配慮) 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の基本指針 (平成 18 年度厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知) 及び『研究機関等に於ける動物実験等の実施に関する基本指針』に基づく実験計画書を提出し、動物実験倫理問題検討委員会の承認を得ている。また、本プロジェクト全般において組み換え DNA 実験とモデル作成・移植における動物実験は各所属機関の組み換え DNA 実験委員会と動物実験委員会の指針に従って研究計画書を提出し、医学部長、研究所

長、委員会長等の機関承認を得た後に実施した。

骨髄間質細胞の分化誘導並びに分子生物学的解析は京都大学を中心に行ったが、すでに京都大学大学院医学研究科・医学部動物実験委員会の承認を得ている (「骨髄間質細胞の骨格筋細胞への分化誘導と移植応用」承認番号：MedKyo04245)。ヒト骨髄間質細胞は BioWhittaker 社の細胞を用いるので倫理上問題はない。Notch の遺伝子導入実験は京大の組み替え DNA 実験委員会の了承を得て行なっている (「体細胞の神経系および骨格筋細胞への分化転換の遺伝子機構について」(承認番号：研研 2 第 2 2 4-2 号))。

C. 研究成果

(1) 細胞移植治療を実現するための生体材料の検討： プルランのカチオン化反応において、CDI やスベルミン濃度、および反応時間を変えることによって、プルランへのスベルミン導入率は変化した。プラスミド DNA とカチオン化プルランを水溶液中で混合したところ、両者のコンプレックスが形成された。コンプレックスの分子サイズは 150-200nm であり、その表面電位は十数 mV であった。プラスミド DNA は 600nm のサイズをもち、その表面電位は -30mV 程度であることから、カチオン化ゼラチンとの混合によってコンプレックスが形成されていることがわかった。次に、このコンプレックスによる骨髄間質細胞に対する遺伝子導入と遺伝子発現を調べた。その結果リバーストランスフェクション法の方がはるかに細胞毒性が低く、遺伝子発現レベルを高めることが可能であることが分かった。マウス、ラット、サルから採取した骨髄間質細胞に対してこの方法で神経誘導を行なったところ、細胞死もほとんど見られず、細胞の神経への分化が認められた。神経細胞特異マーカーを用いた免疫染色と細胞のドーパミン産生能、加えて細胞の形態から神経細胞への分化を確認した。

(2) 骨髄間質細胞からの神経誘導と脳梗塞モデルでの分化度と有効性の相関： 中大脳動脈虚血再還流モデルをラットで作製し、ラット骨髄間質細胞から誘導した神経前駆細胞様細胞を虚血領域に合計 4-5 万細胞を移植した。その結果、Beam balance test, Limb placing test などの体勢知覚の改善と共に記憶学習能力を示す Morris water maze test でも大きな回復を認めた。移植した細胞は皮質と海馬に幅広く生着し神経細胞のマーカーを発現していた。またこれらの神経細胞は以下の transmitter related-marker を発現していた (1.6 \pm 0.7% (Glutamate), 7.9 \pm 2.2% (TH), 3.2 \pm 2.3% (ChAT), 4.7 \pm 2.3% (serotonin),

0.7 ± 0.4% (GABA) in rats (Figure 1, J-M). Human MSCs showed 8.2 ± 5.7% (Glutamate), 8.9 ± 4.1% (TH), 4.7 ± 2.4% (ChAT), 3.8 ± 2.9% (serotonin), 3.8 ± 3.7% (GABA)). さらに、線条体に移植した細胞は黒質まで突起を伸ばしていることが Fluorogold のトレースによって分かった (Hayase et al., submit 中)。

これに対して、サイトカイン刺激によって post-mitotic neuron にまで分化させたものは、生着率は誘導神経前駆細胞に比べて4分の一から5分の一と低くなり、皮質よりもむしろ海馬に入っていた。また宿主脳内での分化も多様性は低かったため、脳への移植においては神経前駆細胞様細胞のほうが有利であることを示唆している。

(3) 脊髄損傷モデルを用いた細胞の足場の検討: 脊髄損傷は Wistar rat に New York impactor で圧迫モデルを作った。実験系としては(1) FGF gelatin 徐放剤のみ投与、(2) FGF gelatin 徐放剤+Schwann cell、(3) FGF gelatin 徐放剤+Schwann cell+ Neural Progenitor で行なうことを計画した。Scaffold は現実的に脊髄損傷の小さい空洞に投与することは無理であり、どうしても脊髄に scaffold を作るとうると、コラーゲンの液体を入れることになるが、ただ空洞の壁に張り付いて終わりになることが予備実験でわかった。そこで、ゼラチン 30 micrometer の粒に FGF を混合して徐放剤を作成する方針を取った。このゼラチンの粒は2週で吸収される。粒の形状であれば足場としても作用はする。FGF は 10-50microgram/1 site で入れ、これを薄めてゼラチン粒子と混ぜることとした。現在、Gelatin+bFGF 群 8 匹、Gelatin 群 10 匹、生食群 6 匹で行動評価を行っており、Dynamic Plantar Aesthesiometer (痛覚テスト) で Gelatin+bFGF 群に優位な機能回復を認めている。来年度は細胞移植を組み合わせて実験を計画している。

(4) パーキンソン病モデルサルでのドーパミン補充療法の有効性判定: 餌取り運動テストの解析では、現在までに得た5頭のデータの解析により、MPTP 投与前においては全前肢において 4.3±0.7 点(n=10, mean±SD)であったものが MPTP 注入後3ヶ月には注入側線条体機能に相当する左側前肢で 1.8±1.6 点(n=5)、対側の右前肢 3.6±0.9 点(n=5)で、注入反対側の前肢に強い運動速度低下が生じることが確認された。

また PET のドーパミン機能測定では5頭のデータを解析したところ(左右あわせて線条体 n=10) ^{11}C -CFT の線条体結合能は 0.58±0.05 (変動係数 9%) であった。今回の検討に合わせ PET 画像を MRI 画像による解剖

情報と併せて解析するプログラムを整備し標準化・最適化することで ^{11}C -CFT 測定値が従来法の場合(変動係数 15%, n=8)よりも個体間・測定間変動が減少した(同 9%)。正常時サルの測定変動が 9%と比較的小さいことから測定間変動も少ない良好な測定システムであることがわかった。

さらに MPTP 投与3ヶ月後に PET を行ったところ(現在まで5頭のデータ収集を終了)、 ^{11}C -CFT 結合能は MPTP 注入側線条体で 0.10±0.09 (変動係数 89%)、MPTP 非注入側線条体で 0.47±0.15 (変動係数 33%) であった。注入側で顕著な結合能の著明な低下が見られ非注入側もモデル作成前に比すると軽度の低下が見られた。

運動課題より得た餌取り個数と餌取り運動速度、PET ドーパミン機能測定より得たマーカーの結合能との関連性を調査したところ、MPTP 投与前・後(投与後3ヶ月)の餌取り運動速度と同時点での前シナプス神経機能(線条体 ^{11}C -CFT 結合能)との間に良好な相関関係を認めた。

(5) 骨髄間質細胞からの骨格筋誘導: ヒトおよびラット骨髄間葉系細胞に bFGF, フォルスコリン, neuregulin および PDGF を含んだ培地で培養すると、この段階で筋肉発生の初期に認められる Pax7 が発現しており、筋前駆細胞様に分化したと考えられた。この細胞に NICD を導入すると骨格筋細胞へと分化転換し、MyoD, myogenin などの骨格筋特有のマーカーの発現が認められる。さらに分化培地(2%ウマ血清を含む DMEM 培地、あるいは ITS medium (Insulin-Transferrin-Selenate)) に切り替えることにより、一部の細胞が融合を開始し、成熟した多核の筋管細胞に分化し、Myosin-heavy chain, skeletal myosin, troponin などの細胞骨格蛋白と共に成熟マーカーとして知られている MRF4/Myf6 も発現するようになる。これらのことから、本誘導は筋肉発生と類似した機構によって骨髄間葉系細胞から骨格筋が誘導されているものと思われた。

この分化した最終産物には増殖可能な①単核の筋芽細胞(MyoD 陽性)、②骨格筋の幹細胞である筋衛生細胞(Pax7 陽性)、そして③成熟した多核の骨格筋細胞の3種類の骨格筋系譜の細胞が含まれていた。

骨髄には造血系幹細胞の中には一部、筋系の幹細胞の存在が示唆されている。我々は本誘導がこれらの極く少数の幹細胞から分化したのか、あるいは接着性の大量に増殖している骨髄間葉系細胞から分化したのかを調べるために CD34, CD45, c-kit 陰性の細胞を FACS によって分離し、同様の誘導操作をおこなったところ、同様の時間経過で多核の成熟した骨格筋を誘導することが出来た。従っ

て、本誘導は骨髄間葉系細胞に含まれる極一部の筋系幹細胞が分化したのではなく、大多数を占める接着性の骨髄間葉系細胞から誘導されるものと考えられた。

健常犬のビーグル犬骨髄液から骨髄間葉系細胞を誘導したところ、ヒトおよびラットと同様に Pax7, MyoD, Myogenin 陽性の骨格筋系細胞群を得ることが出来た。骨格筋マーカーの発現を定量的に調べるためにヒトおよびビーグル犬から誘導した細胞における MyoD, Pax7, Myogenin, MEF2A の発現を検討した。その結果、誘導前の無処理の細胞では、ヒト、イヌいずれにおいても MyoD, Pax7, Myogenin の発現は見られず（ただし MEF2A は発現が認められる）、誘導に伴って顕著な定量的上昇が確認された。免疫染色においてもほぼ同様の傾向が見られた。

安全性の確認としてヒトおよびイヌから誘導した細胞の核型検査を行なった。その結果、いずれのサンプルにおいても染色体の欠損、転座などの変異は認められないことが確認された。

また腫瘍形成の有無をみるために、ヒトから誘導した細胞 (donar #1 (n=10), #2 (n=7) いずれも 10~50 万細胞)、positive control としてヒト腫瘍性細胞である rhabdomyosarcoma (10~50 万細胞, n=10)、negative control として PBS (n=10) を注入し、6ヶ月間体重推移、全身状態の観察および移植6ヵ月後の全身および移植した大腿筋の病理検査を行なった。その結果、rhabdomyosarcoma では2匹で死亡、2匹で腫瘍形成が認められたが PBS では全匹異常がなかった。さらに donar #1, #2 から誘導したヒトの細胞でも全く異常がみられず、病理変化でも腫瘍形成は認められなかった。

(6) 筋ジストロフィーに対する自家筋衛星細胞移植の確立：POMGnT1 を欠損したマウスの筋衛星細胞では同腹の野生型マウスの筋衛星細胞に比べて著しく増殖能と移動能が低下していた。Fusion index (融合能の指標)には差がなかった。

POMGnT1^{-/-}筋衛星細胞にレトロウイルスで POMGnT1 cDNA を導入したところ、alpha-dystroglycan (α-DG) の糖鎖修飾が完全に回復していた。しかし、細胞増殖活性は部分的にしか回復していなかった。

野生型及び POMGnT1^{-/-}の筋衛星細胞を NOD/Scid マウスに移植し、その効率を解析したが、GFP 陽性線維数に差はなかった。形成される GFP 陽性筋線維の直径は野生型筋衛星細胞移植群で大きい傾向があった。

D. 考察

骨髄間葉系細胞は再生医療に用いる候補として多くの利点があるため、神経・筋変性疾患への治療方法につながる可能性が期待される。我々の方法ではヒト、ラットのみならず、イヌなどの高等哺乳類の骨髄間葉系細胞からも誘導されていることから、本誘導法は汎用性の高い方法であると同時に「自己細胞移植治療」への発展が期待される。しかし、有効な細胞移植治療は、変性疾患によって脱落した細胞の供給だけではなく、供給される細胞の安全性が担保されていること、さらに、これらの細胞の生存、ホスト細胞での分化、ホスト組織における組織構築がサポートされるシステムを構築することが真の意味の機能再建において必要である。

本年度の研究から、スペルミン化学導入したカチオン化プルランを遺伝子導入キャリアとして用いることによって、細胞毒性を抑えた骨髄間質細胞での有効な分化誘導を実現させることが可能となった。また細胞の生着にとって必須の足場に関しては、血管新生の促進を促すことで知られている FGF を含む gelatin 徐放剤に効果のあることが脊髄損傷モデルで分かった。さらに移植細胞の分化度に関する実験からは、少なくとも神経細胞においては post-mitotic なものよりも、むしろ前駆細胞の性質を有する分化度の低いものの方が効果的であることが示唆された。

安全性はヒトへの応用において重要な要点であるが、誘導細胞の核型検査やヌードマウスでの腫瘍化試験の結果、際立った危険性は無いと推察される。さらに犬での有効性・安全性の確認はヒトへの応用に向けて非常に大きな意義があると考えられ、今後の推進すべき課題として認識している。

E. 結論 実用性の高い骨髄間質細胞から、神経・骨格筋を効率よく誘導する方法を見出した。かかる方法を有効な細胞移植治療系に発展させるために、細胞毒性の少ない誘導方法、血管新生を促進し移植細胞の足場を与えるマトリックスなどが有効であることが示唆された。次年度は得られた知見を元にさらに研究を推進していきたいと考えている。

F. 健康危険情報 無し

G. 研究発表

【出澤真理】

1. 論文発表

(著書)

- 出澤真理、骨髄間葉系細胞からの骨格筋細胞の誘導 田畑泰彦編、遺伝子医学MOOK (in press)
- 出澤真理、骨髄間葉系細胞からの神経細胞の誘導 田畑泰彦編、遺伝子医学MOOK (in press)
(英文総説)
- Dezawa M, Nabeshima Y-I. Transdifferentiation systems in bone marrow stromal cells and its application to muscle dystrophy: Insights into cell-based therapy. "Recent Advances of Skeletal Muscle Differentiation" in Research Signpost (in press).
- Dezawa M Induction system of neuronal and muscle cells from bone marrow stromal cells and applications for degenerative diseases. Inflammation and Regeneration, 27(2), 96-101, 2007.
- Dezawa M. The unexpected discovery of neuronal and muscle induction systems in bone marrow stromal cells; insights into auto-transplantation therapy. Medical Molecular Morphology (in press)
- Kidata M & Dezawa M. Differentiation system of neural and muscle lineage cells from bone marrow stromal cells; a new strategy for tissue reconstruction in degenerative diseases Histology and Histopathology (in press)
(和文総説)
- 国府田正雄、出澤真理 骨髄間葉系細胞を用いた脊髄損傷修復の試み 脳 21 10(2); 144-147, 2007
- 石川裕人、出澤真理 視神経移植とは「視覚と眼球運動のすべて」メディカルビュー社p. 216-221, 2007
- 出澤真理 骨髄間葉系細胞を用いた筋ジストロフィーへの再生医療の可能性 BRAIN and NERVE-神経研究の進歩 59; 503-508, 2007
- 出澤真理 胚葉をこえた多分化能と自己細胞移植治療への可能性 蛋白質核酸酵素 シリーズ「幹細胞技術の現状と展望」52(2): 158-165, 2007.
- 出澤真理 骨髄間葉系細胞からの神経・骨格筋系細胞の誘導 再生医療 16: 19-25 2007

- 北田容章 出澤真理 神経・筋変性疾患における細胞移植治療；骨髄間葉系細胞を用いた自己細胞移植への可能性 Clin Neurosci, (in press)

(原著論文)

- Shimizu S, Kitada M, Ishikawa H, Itokazu Y, Wakao S, Dezawa M. Peripheral nerve regeneration by the in vitro differentiated-human bone marrow stromal cells with Schwann cell property. Biochem Biophys Res Commun. 359: 915-920, 2007.
- Yoshihara T, Ohta M, Itokazu Y, Matsumoto N, Dezawa M, Suzuki Y, Taguchi A, Watanabe Y, Adachi Y, Ikehara S, Sugimoto H, Ide C. Administration of Bone Marrow-Driven Mononuclear Cells After Spinal Cord Injury Suppresses Cavity Formation and is Followed by Functional Recovery. J Neurotrauma 24: 1026-1036, 2007.
- Ishikawa N, Suzuki Y, Ohta M, Cho H, Suzuki S, Dezawa M, Ide C. Peripheral nerve regeneration through the space formed by a chitosan gel sponge. J Biomed Mater Res A. (in press) 2007

2. 学会発表

シンポジウム・特別講演

- 出澤真理 骨髄間葉系細胞の分化誘導システムを用いた自己細胞移植治療への挑戦 第28回日本炎症・再生学会 東京、2007.
- 出澤真理 胚葉を越えた多分化能と自己細胞移植治療への挑戦 Translational Medicine Seminar, 箱根、2007.
- 出澤真理 骨髄間葉系細胞を用いた神経・筋疾患への自己細胞移植治療の可能性 第23回日本DDS学会 熊本、2007.
- Dezawa M. Insights into auto-cell transplantation: the unexpected discovery of specific induction systems in bone marrow stromal cells. The 5th Annual Congress of IDDST, Shanghai, China, 2007.
- 出澤真理 骨髄間葉系細胞を用いた脊髄再生治療の可能性 日本脊髄基金講演会 東京、2007.
- 出澤真理 思わぬ発見のもたらした分化誘導システム：骨髄間葉系細胞の分化誘導システムの確立と神経・筋疾患への応用の可能性。発生工学・疾患モデル研究会 東京、2007.

- 出澤真理 胚葉を越えた多分化能と自己細胞移植治療への可能性 第96回日本病理学会総会 大阪、2007.
- 出澤真理 自己細胞移植治療法の開発：思わぬ発見をもたらした分化誘導システム。第13回阪神小児神経筋疾患研究会、大阪、2007.
- Dezawa M. The discovery of specific induction system in bone marrow stromal cells: Insights into auto-transplantation in neuro- and muscle-degenerative diseases. 17th Lake Shirakaba Conference, Aurora in Regeneration, Vedbaek, Denmark, October, 2007
- Dezawa M. The unexpected discovery of specific induction systems in bone marrow stromal cells and application for degenerative diseases. The International Stem Cells Conference, Agrigento, Italy, October, 2007
- Dezawa M. Bone marrow stromal cells from auto-cell transplantation therapy: applications for neuro- and muscle-degenerative diseases. The 9th US-Japan symposium on Drug Delivery Systems. Hawaii, 2007 December

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし

【田畑泰彦】

1. 論文発表
 - A. Okazaki, JI. Jo, Y. Tabata. A Reverse Transfection Technology to Genetically Engineer Adult Stem Cells. *Tissue Engineering*, 13(2), 245-251 (2007)
 - JI. Jo, N. Nagaya, Y. Miyahara, M. Kataoka, M. Harada-shiba, K. Kangawa, and Y. Tabata. Transplantation of genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in Rats with Myocardial Infarction: Benefit of a Novel Nonviral Vector, Cationized Dextran. *Tissue Engineering*, 13(2), 313-322 (2007)
 - JI Jo, T Ikai, A Okazaki, M Yamamoto, Y Hirano, Y Tabata. Expression profile of plasmid DNA by spermine derivatives of pullulan with different extents of spermine introduced. *J Control Release*, 118(3), 389-398(2007)
 - JI. Jo, T. Ikai, A. Okazaki, K. Nagane,

M. Yamamoto, Y. Hirano and Y. Tabata. Expression profile of plasmid DNA obtained using spermine derivatives of pullulan with different molecular weights. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, 18(7), 883-899(2007)

2. 学会発表 該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

【林拓也】

1. 論文、総説

- Kudomi N, Watabe H, Hayashi T, Iida H. Separation of input function for rapid measurement of quantitative CMRO2 and CBF in a single PET scan with a dual tracer administration method. *Phys Med Biol* 52(7):1893-1908, 2007
- Shimamura M, Sato N, Sata M, Kurinami H, Takeuchi D, Wakayama K, Hayashi T, Iida H, Morishita R. Delayed Postischemic Treatment With Fluvastatin Improved Cognitive Impairment After Stroke in Rats. *Stroke* 38(12):3251-3258, 2007
- 佐藤 博司, 稲垣 正司, 林 拓也, 飯田 秀博. 目でみるページ・検査-diffusion MRI-. *CARDIAC PRACTICE*:201-204, 2007
- 飯田 秀博, 渡部 浩司, 赤松 哲哉, 中澤 真弓, 松原 圭亮, 竹内 朝子, 岩田 倫明, 林 拓也, 横田 千晶, 福島 和人, 福本 真司. SPECTを使った脳機能画像の定量化と標準化. *脳神経外科ジャーナル* 16 (10):742-752, 2007
- 林 拓也. ヒトの大脳皮質基底核連絡線維. *Clinical Neuroscience* 25 (1):28-33, 2007
- 林 拓也 大脳基底核と皮質の神経線維結合—拡散強調画像による検討 *臨床神経学* 47(11), 838-840
- Iida Hidehiro, Eberl Stefan, Kim Kyeong-Min, Tamura Yoshikazu, Ono Yukihiro, Nakazawa Mayumi, Sohlberg Antti, Zeniya Tsutomu, Hayashi Takuya, Watabe Hiroshi. Absolute quantitation of myocardial blood flow with 201Tl

and dynamic SPECT in canine: optimisation and validation of kinetic modelling. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.*, 2008

2. 書籍
なし

3. 学会発表

- 林 拓也. 大脳皮質・基底核間の線維連絡拡散テンソル・拡散神経束追跡法 (DT法) による解明. *日本神経学会*, 名古屋, 2007 16-May
- Iida H, Kudomi N, Hayashi T, Inomata T, Miyake Y, Ohota Y, Teramoto N, Koshino K, Piao R. Adequacy of dual administration of 1502 and H2150 for rapid and accurate assessment of CBF and CMRO2. *Brain07/BrainPET07*, Osaka, Japan, 2007 20-24 May
- Koshino K, Watabe H, Yamamoto A, Sato H, Ose T, Hikake M, Teramoto N, Hayashi T, Iida H. APPLICATION OF HARDWARE-BASED MULTIMODAL REGISTRATION SYSTEM TO FUSION OF PET AND MRI IMAGES. *Brain07/BrainPET07*, Osaka, Japan., 2007 20-24 May
- Watabe H, Hayashi T, Ohta Y, Teramoto N, Miyake Y, Kurokawa M, Yamamoto A, Ose Y, Ikoma Y, Iida H. DEVELOPMENT OF REFERENCE TISSUE METHOD FOR MULTIPLE INJECTIONS OF [C-11]RACLOPRIDE. *Brain and BrainPET'07*, Osaka., 2007
- Zeniya T, Watabe H, Ose T, Hayashi T, Teramoto N, Myojin K, Taguchi A, Sato H, Yamamoto A, Sohlberg A, Inomata T, Iida H. Absolute quantitation of regional cerebral blood flow in mouse using 123I-iodoamphetamine and pinhole SPECT. *Brain'07 & BrainPET'07*, Osaka., 2007 20-24 May
- 林 拓也. 線条体と大脳皮質の線維連絡—サルとヒトの対応. *第31回関東臨床神経生理研究会*, 東京, 2007 26 May
- Hayashi T, Ko Ji Hyum, Strafella A, Pike B, Dagher A. A role of dorsolateral prefrontal cortex in durg-cue induced neural response - Acombined fMRI/rTMS study. *13th Annual Meeting of Human Brain Mapping*, Chicago, USA, 2007 10-14 Jun
- Yamauchi M, Hayashi T, Yamamoto A, Sato H, Iida H. Neural mechanism of melody perception: An fMRI study. *13th Annual Meeting of Human Brain Mapping*, Chicago, USA, 2007 10-14 Jun
- 銭谷 勉, 渡部 浩司, 猪股 亨, 青井 利行, キム キョンミン, 寺本 昇, 合瀬 恭幸, Sohlberg Antti, 久保 敦子, 林 拓也, 工藤 博幸, 増野 博幸, 山本 誠一, 中澤 真弓, 山道 芳彦, 飯田 秀博. ピンホールSPECTを用いた小動物イメージング. *ジョイントセミナー, 国立循環器病センター研究所新館講堂*, 2007 10 July
- 飯田 秀博, 林 拓也, 渡部 浩司, 三宅 義徳, 寺本 昇, 永沼 雅基, 横田 千晶, 上原 敏志, 森脇 博, 武信 洋平, 成富 博章, 峰松 一夫. 150ガスをを用いた迅速PET定量法. *第23回BFIC*, 神戸ポートピアホテル, 2007 22 Sep
- 佐藤 博司, 林 拓也, 川畑 義彦, 中島 巖, 圓見 純一郎, 山本 明秀, 飯田 秀博. 小型高信号雑音化8ch Phased Array Coilの開発. *第35回日本磁気共鳴医学大会*, 神戸ポートピアホテル, 2007 27-29 Sep 2007
- 越野 一博, 渡部 浩司, 寺本 昇, 合瀬 恭幸, 山本 明秀, 樋掛 正明, 福田 肇, 大田 洋一郎, 佐藤 博司, 林 拓也, 飯田 秀博. 光学式マルチモダリティ画像位置合わせシステムの動物実験における有効性. *第47回日本核医学会学術総会*, 仙台国際センター, 2007 4-6 Nov
- 岩西 雄大, 渡部 浩司, 林 拓也, 湊 小太郎, 飯田 秀博. DARG法における残存150-CO放射能の影響評価と検査時間短縮に関する研究. *第47回日本核医学会学術総会*, 仙台国際センター, 2007 4-6 Nov
- 銭谷 勉, 渡部 浩司, 林 拓也, 合瀬 恭幸, 明神 和紀, 田口 明彦, 寺本 昇, 猪股 亨, 山道 芳弘, 飯田 秀博. ピンホールSPECTと123I-IMPを用いたマウス局所脳血流定量測定. *第47回日本核医学会学術総会*, 仙台国際センター, 2007 4-6 Nov
- 林 拓也. PET研究の実際-神経科学・病態把握から治療開発まで. *理研分子イメー*

ジングセミナー，神戸，2007 19-Dec

A. 知的財産権の出願・登録状況
なし

【今村道博】

II. 学会発表

〈国内〉

1. 今村道博、武田伸一：

ポリ A トラップ法により分子種特異的な C 末端構造を欠失させた ϵ -サルコグリカンの発現

第 40 回日本発生生物学会、第 59 回日本細胞生物学会合同大会，福岡，5.29，2007

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

神経・筋変性疾患における細胞移植のシステムの構築と自己細胞移植治療法の開発
～霊長類パーキンソンモデル作成、移植、解析～

分担研究者 林 拓也 国立循環器病センター研究所
先進医工学センター放射線医学部・室長

研究要旨：霊長類動物において再現性の高いパーキンソン病モデルサルを作成し（細胞移植による）ドーパミン補充療法の有効性判定のためのエンドポイントを策定した。パーキンソン病は1) ドーパミン神経細胞死に基づくドーパミン欠乏、2) それに伴う可塑的反応、の結果として脳機能障害が発現するが、どのように両者が機能障害に関与するか明確な関係性は知られていない。動物実験においても定量的な運動機能評価法については確立しておらず脳内ドーパミン機能との関連性の調査は不十分である。今年度我々は、右内頸動脈より神経毒MPTPを投与して片側性パーキンソン病モデルを作成しPETによる脳内ドーパミン機能（プレシナプス、ポストシナプス）と餌取り課題による運動機能評価を行うことで、脳内ドーパミン機能と前肢運動機能障害の関係性をしらべた。その結果ドーパミンプレシナプスのトランスポータ結合能が前肢運動速度と最も良く相関すること、再現性高くドーパミン欠乏障害を評価できることを確認した。トランスポータはドーパミン神経細胞に豊富に存在すると考えられ細胞補充による機能改善をみるためにこれらトランスポータ結合能と運動速度をプライマリーエンドポイントと設定した。またポストシナプス（受容体側）の機能測定は細胞移植により発現する可能性がある合併症（Graft-induced dyskinesia）やドーパミン補充以外の可塑性の機序に基づく治療効果を調べるためサブエンドポイントとした。

A. 研究目的

霊長類動物で再現性の高いパーキンソン病モデルサルを作成し（細胞移植による）ドーパミン細胞補充療法の有効性判定のためのエンドポイントを策定する。

B. 研究成果

本年度は8頭のカニクイザルを用いて片側パーキンソン病モデルを作成し、運動課題による運動機能障害度の測定や、ポジトロンエミッショントモグラフィー（PET）によるドーパミン機能障害度の測定を行い本研究最終目標（骨髄間質細胞由来神経細胞移植）のプライマリーエンドポイントの策定を行った。

パーキンソン病モデルサルの作成はBankiewiczら（*Life Sci*, 1986）の方法に基づき脳血管撮影下において右内頸動脈より0.4-0.8mg/kg の1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)を投与し作成した。本病態モデルは古典的ではあるがMPTPにより発現する症状（主に無動や寡動などの運動機能障害）と脳ドーパミン機能障害度や神経細胞の変性の程度との関連性は十分調査されていない。

我々は、1) 運動機能障害度を、片側前肢毎の餌取り課題を行いその遂行速度や餌取り個数を測定、2) ドーパミン機能を、PETを使いドーパミン細胞のプレおよびポストシナプスのマーカーを用いて評価した。餌取り運動課題は、MPTP投与前、投与1週間、1ヶ月後、2ヶ月後、3ヶ月後に繰り返し測定し各タイムポイントにて3日間連続測定（一日につき片側前肢25回試行、3日間で75回の試行）することで測定精度を向上させた（図1）。餌取り運動テストの解析には、前肢餌取り運動時の餌取り速度

を、PETの結果を知らない第三者によるビデオ観察により6段階（0点：非常に遅いか無動、～5点：非常に速い動き）で評価した。現在までに得た5頭のデータの解析により、MPTP投与前においては全前肢において 4.3 ± 0.7 点($n=10$, $\text{mean} \pm \text{SD}$)であったものがMPTP注入後3ヶ月には注入側線条体機能に相当する左側前肢で 1.8 ± 1.6 点($n=5$)、対側の右前肢 3.6 ± 0.9 点($n=5$)で、注入反対側の前肢に強い運動速度低下が生じることが確認された。

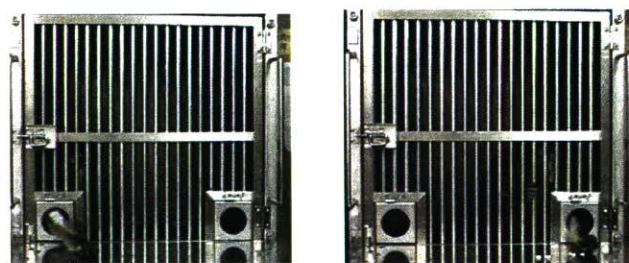


図1. 前肢餌取り課題。左：右前肢の餌取り運動、右：左前肢の餌取り運動を行っているところ。一回の課題につき5個の餌（リンゴ）を並べておき、餌を取らせ（5試行）これを5回繰り返し（計25試行）、3日間連続で課題を行った（計75試行）。右・左前肢毎に全餌取り個数と餌取り運動速度の平均値を評価した。

またPETのドーパミン機能測定にはプレシナプスの機能評価にドーパミントランスポータのマーカー（ ^{11}C -CFT）、ポストシナプスの評価にD1受容体（ ^{11}C -SCH23390）およびD2受容体（ ^{11}C -raclopride）を用いた。このうち特に ^{11}C -CFTはプレシナプスに存在することから残存するドーパミン細胞数を反映すると考えられる。PET撮像データを参照領域法により定量解析することで各線条体の結合能を計算した。PETによる測定再現性と個体間変動を評価するために正常時（MPTP投与前）のPET測定も行った。5頭のデータを解析したところ（左右あわせて線条体 $n=10$ ） ^{11}C -CFTの線条体結合能は 0.58 ± 0.05 （変動係数9

%)であった。今回の検討に合わせPET画像をMRI画像による解剖情報と併せて解析するプログラムを整備し標準化・最適化することで ^{11}C -CFT測定値が従来法の場合(変動係数15%, $n=8$)よりも個体間・測定間変動が減少した(同9%)。正常時サルの測定変動が9%と比較的小さいことから測定間変動も少ない良好な測定システムであることがわかった(図2A)。

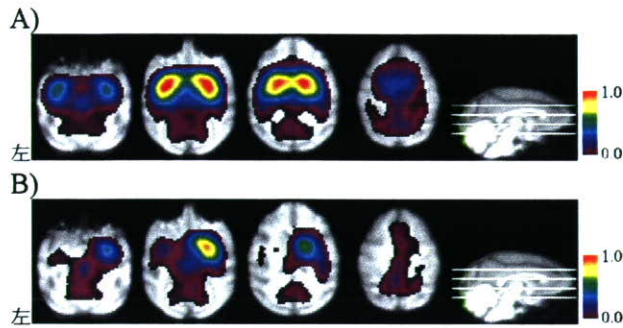


図2. 5頭のサル正常時の平均 ^{11}C -CFT結合能画像(A)とパーキンソン病モデル作成後(MPTP右内頸動脈内注入3ヶ月後)の平均 ^{11}C -CFT結合能画像。正常時に比べパーキンソン病モデル作成後に右側線条体(MPTP注入側)全体の結合能が著明に低下している。また反対側の非注入側も低下している傾向にある。解剖学的に標準化した平均MRI画像上に平均CFT結合能画像を重ねて表示した。

さらにMPTP投与3ヶ月後にPETを行ったところ(現在まで5頭のデータ収集を終了)、 ^{11}C -CFT結合能はMPTP注入側線条体で 0.10 ± 0.09 (変動係数89%)、MPTP非注入側線条体で 0.47 ± 0.15 (変動係数33%)であった。注入側で顕著な結合能の著明な低下が見られ非注入側もモデル作成前に比すると軽度の低下が見られた(図2B)。これは初回循環で取り込まれないMPTPが再循環したためか、サルの脳血管系がヒトと異なり前交通動脈が一本のみで左右のシャントが多いためMPTPが対側に流入したためと考えられる。

その上で運動課題より得た餌取り個数と餌取り運動速度、PETドーパミン機能測定より得たマーカーの結合能との関連性を調査したところ、MPTP投与前・後(投与後3ヶ月)の餌取り運動速度と同時点での前シナプス神経機能(線条体 ^{11}C -CFT結合能)との間に良好な相関関係を認めた(図3)。一方で餌取り個数とPET測定値との間に有意な関連性は見られなかった。

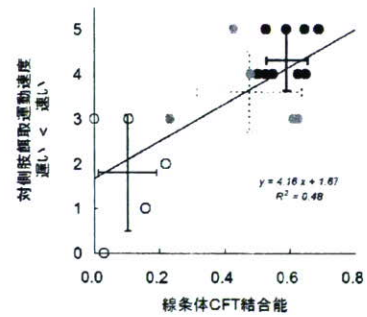


図3. PETにおける ^{11}C -CFT線条体結合能と対側前肢餌取り運動速度との関係。対側肢の運動速度は、PET解析結果を知らない観察者により6段階で評価した(5:最も速い, 0:無動か非常に遅い動き)。結合能が低い場合ほど運動速度が低下し両者に相関が見られた。●: 正常時線条体の結合能とその対側運動速度($n=10$), □: MPTP投与対側の線条体($n=5$), ○: MPTP投与側(右側)の線条体($n=5$)、各群の平均値と標準偏差を十字で示す。

C. 考察

以上の結果より、ドーパミン細胞死による機能障害発現度の指標として、餌取り課題での運動速度およびPETにおける ^{11}C -CFT結合能の両者が適すると考えられた。今後ドーパミン神経細胞補充療法を行う際にこれら両者をプライマリーエンドポイントとすることが望ましいと思われる。今後さらに上記データを詳細に解析し(ビデオ解析による運動速度定量化)、ポストシナプス機能(受容体機能)との関連性も合わせて多変量解析することでエンドポイントの最適項目を設定した上、骨髄間質細胞由来神経細胞の線条体への移植および移植後の運動機能、PETによる結合能を繰り返し評価することで細胞移植効果を判定する予定である。

細胞移植を行う際の最適な条件(細胞数や移植部位等)は確立していない(Hagell et al 2005, Brain Res Bull)。ヒトでの細胞移植治療では移植後に不随意運動(Graft-induced dyskinesia, GID)を発症する例が報告されているが機序は不明でドーパミン細胞移植数の過多(ドーパミン欠乏部位でない場所への細胞移植や、後腹側線条体への移植(Ma et al Ann Neurol 2002))、ドーパミン受容体機能亢進(Hagell et al 2005, Brain Res Bull)等が示唆されており動物実験での確証が必要とされている。本研究にて移植後にジスキネジアを発症した場合にはPET測定にてドーパミンプレシナプスおよびポストシナプス(受容体)の空間的分布・時間的変化を観察することでジスキネジアの機序、ドーパミン補充以外による治療機序(可塑性)、移植条件の最適化に関する知見が得られると考えている。またこのためこうした反応が見られた個体においてはセカンダリーエンドポイントとして受容体機能測定を行うこととした。

D. 結論

パーキンソン病モデルの行動評価（餌取り課題）、PETによる脳内ドーパミン機能の再現性高い機能評価が可能になった。次年度より骨髄間質細胞由来神経細胞の移植を行い有効性・安全性を評価する予定である。

E. 研究発表

1. 論文、総説

1. Kudomi N, Watabe H, Hayashi T, Iida H. Separation of input function for rapid measurement of quantitative CMRO2 and CBF in a single PET scan with a dual tracer administration method. *Phys Med Biol* 52(7):1893-1908, 2007
2. Shimamura M, Sato N, Sata M, Kurinami H, Takeuchi D, Wakayama K, Hayashi T, Iida H, Morishita R. Delayed Postischemic Treatment With Fluvastatin Improved Cognitive Impairment After Stroke in Rats. *Stroke* 38(12):3251-3258, 2007
3. 佐藤 博司, 稲垣 正司, 林 拓也, 飯田 秀博. 目でみるページ・検査-diffusion MRI-. *CARDIAC PRACTICE*:201-204, 2007
4. 飯田 秀博, 渡部 浩司, 赤松 哲哉, 中澤 真弓, 松原 圭亮, 竹内 朝子, 岩田 倫明, 林 拓也, 横田 千晶, 福島 和人, 福本 真司. SPECTを使った脳機能画像の定量化と標準化. *脳神経外科ジャーナル* 16 (10):742-752, 2007
5. 林 拓也. ヒトの大脳皮質基底核連絡線維. *Clinical Neuroscience* 25 (1):28-33, 2007
6. 林 拓也. 大脳基底核と皮質の神経線維結合—拡散強調画像による検討— *臨床神経学* 47(11), 838-840
7. Iida Hidehiro, Eberl Stefan, Kim Kyeong-Min, Tamura Yoshikazu, Ono Yukihiko, Nakazawa Mayumi, Sohlberg Antti, Zeniya Tsutomu, Hayashi Takuya, Watabe Hiroshi. Absolute quantitation of myocardial blood flow with 201Tl and dynamic SPECT in canine: optimisation and validation of kinetic modelling. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2008

2. 書籍

なし

3. 学会発表

1. 林 拓也. 大脳皮質・基底核間の線維連絡拡散テンソル・拡散神経束追跡法 (DT法) による解明. *日本神経学会*, 名古屋, 2007 16-May
2. Iida H, Kudomi N, Hayashi T, Inomata T, Miyake Y, Ohta Y, Teramoto N, Koshino K, Piao R. Adequacy of dual administration of 15O2 and H215O for rapid and accurate assessment of CBF and CMRO2. *Brain07/BrainPET07*, Osaka, Japan, 2007 20-24 May
3. Koshino K, Watabe H, Yamamoto A, Sato H, Ose T, Hikake M, Teramoto N, Hayashi T, Iida H. APPLICATION OF HARDWARE-BASED MULTIMODAL REGISTRATION SYSTEM TO FUSION OF PET AND MRI IMAGES. *Brain07/BrainPET07*, Osaka, Japan, 2007 20-24 May
4. Watabe H, Hayashi T, Ohta Y, Teramoto N, Miyake Y, Kurokawa M, Yamamoto A, Ose Y, Ikoma Y, Iida H. DEVELOPMENT OF REFERENCE TISSUE METHOD FOR MULTIPLE INJECTIONS OF [C-11]RACLOPRIDE. *Brain and BrainPET'07*, Osaka., 2007
5. Zeniya T, Watabe H, Ose T, Hayashi T, Teramoto N, Myojin K, Taguchi A, Sato H, Yamamoto A, Sohlberg A, Inomata T, Iida H. Absolute quantitation of regional cerebral blood flow in mouse using 123I-iodoamphetamine and pinhole SPECT. *Brain'07 & BrainPET'07*, Osaka., 2007 20-24 May
6. 林 拓也. 線条体と大脳皮質の線維連絡—サルとヒトの対応. 第31回関東臨床神経生理研究会, 東京, 2007 26 May
7. Hayashi T, Ko Ji Hyum, Strafella A, Pike B, Dagher A. A role of dorsolateral prefrontal cortex in drug-cue induced neural response - A combined fMRI/rTMS study. *13th Annual Meeting of Human Brain Mapping*, Chicago, USA, 2007 10-14 Jun
8. Yamauchi M, Hayashi T, Yamamoto A, Sato H, Iida H. Neural mechanism of melody perception: An fMRI study. *13th Annual Meeting of Human Brain Mapping*, Chicago, USA, 2007 10-14 Jun

9. 銭谷 勉, 渡部 浩司, 猪股 亨, 青井 利行, キム キョンミン, 寺本 昇, 合瀬 恭幸, Sohlberg Antti, 久保 敦子, 林 拓也, 工藤 博幸, 増野 博幸, 山本 誠一, 中澤 真弓, 山道 芳彦, 飯田 秀博. ピンホールSPECTを用いた小動物イメージング. ジョイントセミナー, 国立循環器病センター研究所新館講堂, 2007 10 July
10. 飯田 秀博, 林 拓也, 渡部 浩司, 三宅 義徳, 寺本 昇, 永沼 雅基, 横田 千晶, 上原 敏志, 森脇 博, 武信 洋平, 成富 博章, 峰松 一夫. 150ガスを用いた迅速PET定量法. 第23回BFIC, 神戸ポートピアホテル, 2007 22 Sep
11. 佐藤 博司, 林 拓也, 川畑 義彦, 中島 巖, 圓見 純一郎, 山本 明秀, 飯田 秀博. 小型高信号雑音化8ch Phased Array Coilの開発. 第35回日本磁気共鳴医学大会, 神戸ポートピアホテル, 2007 27-29 Sep 2007
12. 越野 一博, 渡部 浩司, 寺本 昇, 合瀬 恭幸, 山本 明秀, 樋掛 正明, 福田 肇, 大田 洋一郎, 佐藤 博司, 林 拓也, 飯田 秀博. 光学式マルチモダリティ画像位置合わせシステムの動物実験における有効性. 第47回日本核医学会学術総会, 仙台国際センター, 2007 4-6 Nov
13. 岩西 雄大, 渡部 浩司, 林 拓也, 湊 小太郎, 飯田 秀博. DARG法における残存15O-CO放射能の影響評価と検査時間短縮に関する研究. 第47回日本核医学会学術総会, 仙台国際センター, 2007 4-6 Nov
14. 銭谷 勉, 渡部 浩司, 林 拓也, 合瀬 恭幸, 明神 和紀, 田口 明彦, 寺本 昇, 猪股 亨, 山道 芳弘, 飯田 秀博. ピンホールSPECTと123I-IMPを用いたマウス局所脳血流定量測定. 第47回日本核医学会学術総会, 仙台国際センター, 2007 4-6 Nov
15. 林 拓也. PET研究の実際-神経科学・病態把握から治療開発まで. 理研分子イメージングセミナー, 神戸, 2007 19-Dec

F. 知的財産権の出願・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

神経・筋変性疾患における自己細胞移植のための生体材料の開発
～生体材料開発・DDS～

分担研究者 田畑泰彦
京都大学再生医科学研究所 生体組織工学研究部門 生体材料学分野 教授

研究要旨

細胞移植治療を実現するための生体材料の研究開発を行った。本年度は、骨髄間葉系幹細胞（MSC）の神経細胞への分化のための分化遺伝子の導入技術について検討した。分化遺伝子の導入を効率よく行うための非ウイルス性キャリアをデザインし、MSCに対する遺伝子導入とそれにとまなう神経細胞への分化を調べた。スペルミンを化学導入して作製したカチオン化多糖（プルラン）を用いることによって、細胞の生存率を下げることなく、細胞分化を実現することができた。

A. 研究目的

骨髄間質細胞（MSC）は患者本人から採取可能であり、細胞数確保が可能であるため、パーキンソン病や筋ジストロフィーなどの神経・筋変性疾患において、免疫拒絶や倫理問題のハードルの低い「自己細胞移植治療」への応用が可能である。しかしながら、変性疾患ではすでに組織が荒廃・萎縮していることが多く、たとえ自己由来の神経細胞や骨格筋細胞が移植されたとしても、効率的な細胞生着と機能回復には結びつかない。現在の再生医学では、如何に目的とする細胞を効率よく獲得するかということに焦点が置かれているが、細胞移植治療を現実的な視点から眺めれば、有効な細胞投与方法、移植細胞の周辺環境の整備などが次なる大きな課題となっている。すなわち、細胞だけを単に局所に入れるという発想から一步前に踏み出し、細胞の生着・分化・機能発揮に必要とされる要素を盛り込んだ移植システム（＝システムアプローチ）を構築することが、将来に向けた重要課題となる。本研究では、これまでの研究成果を進展させ、神経・筋変性移植システムの確立を目指す。具体的には、骨髄間質細胞から神経細胞と骨格筋細胞を誘導し、各種変性モデルにおいて生体材料と用いた移植細胞の周辺環境の整備も含めたシステムアプローチによる移植を行い、機能回復、組織再生を検討する。生体材料の中で、まず、MSCから神経細胞への分化を効率よく行うための非ウイルス性キャリアの作製と培養条件についての検討を行った。

B. 研究方法

遺伝子導入のための非ウイルス性キャリアの研究においては、遺伝子発現効率の向上が主な目的である。しかしながら、本研究の最終目的は治療であるため、キャリアデザイン、作製においては、臨床応用できる材料を用いることが不可欠である。そこで、臨床前例があり、細胞毒性が低く、

細胞内への取り込みに優れた材料が必要となる。細胞の表面には、物質を取り込むためのレセプターが存在している。このレセプターには、タンパク質を認識するものと糖を認識するものとの2つがある。私たちは後者のレセプターを利用することを考えた。糖認識レセプターに認識される糖の重合体である多糖を出発材料として、アニオン性の遺伝子と複合化（コンプレックス）するために多糖のカチオン化修飾を行った。通常、細胞内に取り込まれた物質は、まずエンドソームに運ばれ、そこで、分解される運命にある。この過程を回避するためにはエンドソームのpHを低下させない緩衝作用をもつ性質が必要である。このような要求から、生体アミンであり、かつpH緩衝能をもつスペルミンを選び、多糖への化学導入を行った。多糖であるプルランの水酸基をカルボジイシダゾール（CDI）で活性化した後、スペルミンを加え、水酸基とスペルミンの末端アミノ基とを化学結合させた。得られたカチオン化デキストランと遺伝子プラスミドDNAを水溶液中で混合、両者のポリイオンコンプレックスを形成させた。ポリイオンコンプレックス形成を電気泳動、動的あるいは表面電位光散乱装置によって解析した。ポリイオンコンプレックスをMSCとともに培養することで、遺伝子導入を行った。プラスミドDNA-カチオン化デキストランコンプレックスを培養液中に投入する遺伝子導入培養（従来法）とコンプレックスをコーティングした基材上で細胞を培養し、遺伝子を導入する方法（リバーストランスフェクション法）の両方を比較した。次に、遺伝子導入されたMSCの神経細胞への分化誘導を調べた。神経分化は神経細胞特異表面マーカーの免疫染色とドーパミン産生測定によって評価した。遺伝子導入培養の前後における細胞の生存率の変化を調べ、遺伝子導入による細胞毒性を評価した。

C. 研究成果

プルランのカチオン化反応において、CDI やスペルミン濃度、および反応時間を変えることによって、プルランへのスペルミン導入率は変化した。プラスミド DNA とカチオン化プルランを水溶液中で混合したところ、両者のコンプレックスが形成された。コンプレックスの分子サイズは150-200nm であり、その表面電位は十数 mV であった。プラスミド DNA は 600nm のサイズをもち、その表面電位は-30mV 程度であることから、カチオン化ゼラチンとの混合によってコンプレックスが形成されていることがわかった。次に、このコンプレックスによる MSC に対する遺伝子導入と遺伝子発現を調べた。培養液中にコンプレックスを加え、従来法の遺伝子導入培養を行ったところ、遺伝子発現は認められたが、そのレベルは低いものであった。そこで、遺伝子発現レベルを高めるとともに、細胞毒性を下げる目的で、リバーストランスフェクション法を考案した。まず、培養皿表面にアニオン化ゼラチンと細胞接着因子をコーティング、その後、コンプレックスをコーティングする。このコーティング表面上で細胞を培養する。細胞近傍に常に遺伝子が存在し、培養条件をよくすることで、細胞毒性が低く、遺伝子発現レベルを高めることが可能となった。マウス、ラット、サルから採取した MSC に対して、遺伝子とカチオン化プルランとのコンプレックスを利用したリバーストランスフェクション法を適用した。その結果、神経分化遺伝子導入による細胞死もほとんど見られず、細胞の神経への分化が認められた。神経細胞特異マーカーを用いた免疫染色と細胞のドーパミン産生能、加えて細胞の形態から MSC 神経細胞への分化を確認した。

D. 考察

カチオン化プルランのスペルミン導入率とプラスミド DNA との混合比、MSC への与える濃度比などを変えると、遺伝子発現レベルが変化した。カチオン化プルランのスペルミン導入率、プラスミド DNA とカチオン化多糖との混合比などによって、形成されたプラスミド DNA-カチオン化多糖コンプレックスの分子サイズとその表面電荷は大きく変化する。このコンプレックスの物性が MSC への取り込みとその結果として起こる遺伝子発現に影響を与えることが知られている。今回の結果においても、コンプレックスの取り込みと遺伝子発現レベルとの正の相関性が得られた。このことは、キャリアの設計が効率よく遺伝子を導入し、発現させる key 技術であることが示している。遺伝子導入キャリアだけでなく、遺伝子導入培養の条件を最適化することによって、遺伝子発現レベルの増加とその結果としての細胞機能の修飾、すなわち神経細胞への分化が促進される

ことがわかった。その理由として、遺伝子キャリアとして用いたプルランが細胞表面の糖認識レセプターによって認識され、細胞内に効率よく遺伝子を導入させることができたこと、次に、緩衝能をもつスペルミンにより、導入遺伝子のエンドソームからの細胞質への移動が効率よく行われたことなどが考えられる。遺伝子コンプレックスを細胞培養液中に添加する従来法と比較して、リバーストランスフェクション法では、導入すべき遺伝子が細胞近傍に存在するため、細胞内への遺伝子の取り込み確率が高まることが期待できる。また、リバース法では、細胞培養時に培養液中に血清を添加させることが可能となり、細胞の栄養状態がよくなり、遺伝子発現レベルの増大と細胞毒性の低減とが同時に得られたと考えられる。カチオン化プルランを用いて、MSC への遺伝子導入した細胞は、神経の分化マーカーを発現するとともに、ドーパミンを分泌していた。この結果は、細胞の形態、形質のみならず、機能的にも MSC の神経細胞への分化を実証している。加えて、これまでの遺伝子導入法に比較して、遺伝子導入、発現にともなう細胞死が大幅に抑制され、神経分化細胞の回収率と質の向上が実現された。このように、細胞の機能および回収率の観点から見て、今回の研究成果は、移植治療に用いる細胞の調製法に対して大きな進歩をもたらしたと考えられる。

E. 結論

スペルミン化学導入したカチオン化プルランを遺伝子導入キャリアとして用い、さらに、遺伝子導入培養法を工夫することによって、細胞毒性を抑えた MSC の神経分化を実現させることができたことがわかった。今後は、これらの分化細胞を用いた移動実験を行っていく予定である。この移植における細胞の生着率と機能発現のための細胞足場に対する生体材料の検討も加え、治療効果の高い細胞移植システムの確立を行う。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. A. Okazaki, JI. Jo, Y. Tabata. A Reverse Transfection Technology to Genetically Engineer Adult Stem Cells. *Tissue Engineering*, 13(2), 245-251 (2007)
2. JI. Jo, N. Nagaya, Y. Miyahara, M. Kataoka, M. Harada-shiba, K. Kangawa, and Y. Tabata. Transplantation of genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in Rats with Myocardial Infarction: Benefit of a Novel Nonviral Vector, Cationized

- Dextran. Tissue Engineering, 13(2), 313-322 (2007)
3. Ji Jo, T Ikai, A Okazaki, M Yamamoto, Y Hirano, Y Tabata. Expression profile of plasmid DNA by spermine derivatives of pullulan with different extents of spermine introduced. J Control Release, 118(3), 389-398(2007)
 4. Ji. Jo, T. Ikai, A. Okazaki, K. Nagane, M. Yamamoto, Y. Hirano and Y. Tabata. Expression profile of plasmid DNA obtained using spermine derivatives of pullulan with different molecular weights. J. Biomater. Sci. Polymer Edn, 18(7), 883-899(2007)

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

幹細胞としての筋衛星細胞の単離と遺伝子発現解析

分担研究者

今村 道博

国立精神・神経センター神経研究所

遺伝子疾患治療研究部 室長

研究要旨

筋衛星細胞は骨格筋の幹細胞で、再生医療に有用な細胞であると期待されている。筋細胞膜上の α -dystroglycan (α -DG) は O-マンノース型糖鎖修飾を受け、細胞外マトリックスのラミニン、アグリン、パールカン等と結合し、筋膜の安定性を保っていると考えられている。我々は骨格筋筋衛星細胞の α -DG の O-マンノース型糖鎖修飾の機能を調べる目的で、O-マンノース型糖転移酵素、POMGnT1 のノックアウトマウス (POMGnT1^{-/-}) の骨格筋から筋衛星細胞を調整し、その増殖能と移動能を検討した。POMGnT1^{-/-} 筋衛星細胞では同腹の野生型マウスの筋衛星細胞に比べて増殖能と移動能が低下していた。POMGnT1^{-/-}筋衛星細胞にレトロウイルスで POMGnT1 cDNA を導入し、 α -DG の糖鎖修飾を回復させると、細胞増殖活性が部分的に回復した。これらの結果から、筋衛星細胞膜上の α -DG の O-マンノース型糖鎖修飾は筋衛星細胞の増殖と組織内での移動に重要である事がわかった。糖鎖修飾レベルを上げる事で移植後の筋衛星細胞の増殖能や筋線維再生能を上げることが可能かもしれない。

A. 研究目的

骨格筋の筋衛星細胞は筋障害時、活性化し、増殖し、融合して多核の筋線維を形成し、筋線維を再生する。筋衛星細胞を用いた細胞移植治療は筋ジストロフィーの再生医療として期待されてきたが、その効率の低さが問題である。我々は、筋ジストロフィーに対する自家筋衛星細胞移植の確立を目標に、筋衛星細胞の α -dystroglycan の糖鎖修飾が筋衛星細胞の維持、活性化、増殖、分化に与える影響を検討した。

B. 研究方法

1. SM/C-2.6 抗体とセルソーターを用いて POMGnT1 ノックアウトマウスの骨格筋から直接単離した筋衛星細胞を 20% FCS, bFGF 2.5ng/ml を含む DMEM (増殖培地) で培養し、増殖能を MTT アッセイで検討した。また、筋衛星細胞の移動能を transwell migration assay および

wound healing assay で検討した。

2. 野生型及び POMGnT1 ノックアウトマウスの骨格筋からセルソーターで単離した筋衛星細胞にレトロウイルスを用いて POMGnT1 cDNA を導入し、 α -DG の糖鎖修飾と増殖能の回復を検討した。
3. GFP-Tg 及び GFP-Tg/POMGnT1 ノックアウトマウスの骨格筋から筋衛星細胞を調整し、NOD/Scid マウス骨格筋 (前脛骨筋) へ移植し、2 週間後、移植効率 (GFP 陽性筋線維の形成率) を検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いた研究に関しては『動物の愛護及び管理に関する法律』『実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準』、厚生労働省の所轄する実地機関における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成18年度厚生労働省大臣官房厚生科学

課長通知) 及び『研究機関等に於ける動物実験等の実施に関する基本指針』に基づく実験計画書を提出し、動物実験倫理問題検討委員会の承認を得ている。

C. 研究成果

1. O-マンノース型糖転移酵素、POMGnT1 を欠損したマウスの筋衛星細胞では同腹の野生型マウスの筋衛星細胞に比べて著しく増殖能と移動能が低下していた。Fusion index (融合能の指標)には差がなかった。

1. POMGnT1^{-/-}筋衛星細胞にレトロウイルスで POMGnT1 cDNA を導入したところ、alpha-dystroglycan (α -DG) の糖鎖修飾が完全に回復していた。しかし、細胞増殖活性は部分的にしか回復していなかった。
2. 野生型及び POMGnT1^{-/-}の筋衛星細胞を NOD/Scid マウスに移植し、その効率を解析したが、GFP 陽性線維数に差はなかった。形成される GFP 陽性筋線維の直径は野生型筋衛星細胞移植群で大きい傾向があった。

D. 考察

筋衛星細胞は骨格筋の幹細胞で細胞移植治療に有効な細胞であり、筋ジストロフィーの薬物療法や遺伝子治療に於いても標的となる細胞である。我々は筋衛星細胞の糖鎖修飾がその増殖や移動に重要であることを明らかにした。しかし POMGnT1 遺伝子を導入した後、POMGnT1 ノックアウト由来の筋衛星細胞の増殖能は完全に回復しなかった。 α -DG の糖鎖修飾は基底膜のラミニンとの結合に重要であることから、筋線維と筋基底膜の間に形成される筋衛星細胞の α -DG の糖鎖修飾は、ニッチェに於ける筋衛星細胞の幹細胞としての活性の維持にも関係する可能性が残された。

E. 結論

1. POMGnT1 は筋衛星細胞の α -DG の O-マンノース型糖鎖修飾に必須であり、POMGnT1 が欠損した筋衛星細胞では増殖能と移動能が低下する事が明らかになった。
2. POMGnT1 遺伝子を発現するレトロウイルスベクターは筋衛星細胞の α -DG の糖鎖修飾を完全に回復した。また、筋衛星細胞の増殖能を部分的に回復した。
 - 1, 2の結果から、 α -DG の糖鎖修飾が筋衛星細胞の増殖と移動に重要である事が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

なし

II. 学会発表

(国内)

1. 今村道博、武田伸一：

ポリ A トラップ法により分子種特異的な C 末端構造を欠失させた ϵ -サルコグリカンの発現

第 40 回日本発生物学会、第 59 回日本細胞生物学会合同大会、福岡、5. 29, 2007

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし