

200833040A

厚生労働科学研究費補助金

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 出沢 真理

平成21(2009)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 出沢 真理

平成21(2009)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 出沢 真理	----- 1
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～ 林 拓也	----- 8
2. 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 田畑 泰彦	----- 11
3. 筋再生時に出現する脂肪細胞の由来 今村 道博	----- 14
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 16
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 19

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 東北大学大学院医学系研究科・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	京都大学再生医科学研究所 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 神経研究所 遺伝子疾患治療研究部・室長

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以下の点に中心を置いて、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た。

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

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にとま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 緩衝能をもつスベルミンを選び、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ミダゾール(CDI)で活性化した後、スベルミンを加え、水酸基とスベ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、両者のポリオンコンプレックスを形成させた。このポリ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 ( $^{11}\text{C}$ -CFT)、ポストシナプスの評価に D1 受容体 ( $^{11}\text{C}$ -SCH23390) および D2 受容体 ( $^{11}\text{C}$ -raclopride) を用いた。このうち特に  $^{11}\text{C}$ -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:** ヒト骨髄間葉系細胞 (米国 SanBio, Inc. からの提供、および Cambrex 社より購入; 東北大学倫理委員会承認済み)、ラット骨髄間葉系細胞、ビーグル犬骨髄間葉系細胞を用いる。高等哺乳類の筋ジストロフィーのモデルにはヒト Duchenne 型筋ジストロフィーと同一症状を呈するビーグル犬があるために、イヌ骨髄間葉系細胞を用いた。いずれも、継代 4 代目にて誘導を開始する。細胞を  $1,700\sim 1,900$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で継代し、24 時間後に bFGF (10ng/ml)、forskolin (FSK) (5  $\mu$  M)、neuregulin (200ng/ml) および PDGF (5ng/ml) を含む 15% fetus bovine serum (FBS)、alpha-MEM の培地で培養する。3-5 日後、PCI-neo vector に mouse Notch1 の細胞質ドメイン (Notch intracellular domain, NICD) を組み込んだ plasmid をリポフェクションによって遺伝子導入し、G418 を用いて選択する。細胞数の回復を待ち、ほぼ 100% confluent になった段階で多核の骨格筋細胞を誘導するために、2% ウマ血清培地、ITS serum-free medium、あるいは無処理の骨髄間葉系細胞の培養上清のいずれかを投与し成熟骨格筋への誘導を開始する。ただし、上記の培養においては、ヒト骨髄間葉系細胞での誘導においてはヒト血清を用いた。

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 ヶ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。

犬の骨格筋損傷・変性モデルとして声帯筋の損傷モデルの作成方法を検討した。声帯を動かす筋肉は複雑であるが、外転筋は後輪状披裂筋という喉頭の裏面にある筋肉のみである。これを切断すると声帯は外転しなくなるが、両側の声帯が外転しないと窒息してしまうので、一側のみを切断して、この部位に細胞移植して外転機能が再生するかどうかをファイバーで確認するという実験をおこなう。

#### (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。国の示す指針を遵守し、上記の実験を遂行する。

こ東北大学の組み換え 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、機関承認を得た後に実験を実施しており、今後も承認を得た計画のみを実行する。

ヒト骨髄間質細胞は SanBio Inc. (米国企業) から提供を受けた細胞を用いるが、実験におけるヒト細胞使用に関しては「東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会」より「ヒト骨髄および臍帯組織由来間葉系細胞の解析研究 (2008-82 号)」で承認をすでに受けている。Notch の遺伝子導入実験は「東北大学 遺伝子組み換え実験計画承認」を得ている (研研 76-20-35 号)。また動物実験委員会の承認に関しては神経誘導、骨格筋誘導、サルの実験、犬の実験に関して (20 医動-89、20 医動-90、20 医動-91) の承認を得ている。

#### C. 研究結果

**(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前駆細胞誘導と脳梗塞モデルでの分化度と有効性の相関:** 骨髄間質細胞から Notch 遺伝子を導入し free-floating 培養に持つていくことによって神経前駆細胞が多数誘導できることを確認した。骨髄間質細胞に Notch 細胞質ドメインを組み込んだ pCI-neo vector を lipofection で導入し選択すると、神経前駆細胞様に分化する。かかる細胞は Sox2, nestin, NeuroD などの神経幹細胞・前駆細胞のマーカーを発現し、神経幹細胞と同様の浮遊培養を行なうと sphere を形成することが確認された。この細胞をさらに single cell にしてサイトカイン処理を行なうと、post-mitotic neuron に分化する。この分化した神経細胞と神経前駆細胞様細胞の宿主脳内における生着、機能回復に関してラット脳梗塞モデルを用いて検証した。その結果、両者とも細胞が生着するが、神経前駆細胞様細胞のほうが、皮質全体と線条体を含めて非常に幅広く細胞が integrate していたこと、移植された細胞はほとんどの細胞が NeuN 陽性の神経細胞に分化したこと、グリア細胞に分化した細胞は見られなかったこと、宿主内で突起を伸ばし、線条体に移植したものは中脳まで神経突起を伸ばしていたこと、さらに宿主脳に生着した後でドーパミン神経、GABA 作動性神経など、多様な細胞に分化していることが分かった。一方、post-mitotic neuron にまで分化させたものでは、

海馬を中心として生着していたこと、これに伴い運動学習能力の改善が見られたことなどを確認した。このことから、神経系細胞においては、より未分化な神経前駆細胞のほうが多くの意味で利点があることが示唆された。さらに、ヌードマウス、ヌードラット線条体への移植によってがん化試験をクリアしており、米国 FDA からの承認得次第、Pittsburgh 大学脳神経外科 Kondziwoldka 教授 (アメリカ脳神経外科学会・前会長) と共同で誘導神経細胞を脳梗塞患者に移植を行う見通しとなっている。

### **(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 を混合して緩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 匹で行動評価を行なっており、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。

### **(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:**

血管造影方法を用いた MPTP の投与によってカンクイザルの片側性パーキンソンモデルを作成し、同一個体の MSC から誘導したドーパミン神経を1200万前後移植した。その結果、移植1週間後でドーパミントランスポーターの発現が復活することを CFT-PET によって確認した。機能的なドーパミン神経の存在を強く裏付ける結果である。今後1年まで全身のガン細胞スキャンも試行し、安全性と有効性における成果につなげる。

**(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。

健康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 real-time PCR にて検討した。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。

ビーグル犬の声帯筋損傷モデルの作成を行った。反回神経や他の組織を傷つけずに選択的に後輪状披裂筋のみを切除できるのか、また、切除したのち外転麻痺がファイバーで確認できるのか、を検証したところ、見事にコントロール実験は成功したことを確認した。

#### 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、それらの細胞の生存、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. 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 :メディカルドゥ社, pp.46-49, 2008.
- 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 :メディカルドゥ社, pp.54-56, 2008.

(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*: 79-92, 2008.
- Dezawa M: Systematic neuronal and muscle induction systems in bone marrow stromal cells: the potential for tissue reconstruction in neurodegenerative and muscle degenerative diseases. *Medical Molecular Morphology* 41(1): 14-19, 2008.
- Kidata M & Dezawa M: Induction system of neural and muscle lineage cells from bone marrow stromal cells; a new strategy for tissue reconstruction in degenerative diseases. *Histology and Histopathology* 24(5): 631-42, 2009.

(和文総説)

- 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)
- 出澤真理: 筋ジストロフィーと細胞移植治療, *医学のあゆみ* 226(5): 393-396, 2008.
- 出澤真理: 骨髄間葉系細胞を用いた神経筋疾患治療の可能性, *最新医学* 63(12): 55-63, 2008.

(原著論文)

- 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*. 83(1): 33-40, 2007
- K Nagane, M Kitada, S Wakao, M Dezawa, Y Tabata, (5人中4番目: Dezawa=correspondence): Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells by spermine-pullulan-mediated reverse transfection method. *Tissue Eng*: (in press)
- Someya Y, Koda M, Dezawa M, Kadota T, Hashimoto M, Kamada T, Nishio Y, Kadota R, Mannoji C, Miyashita T, Okawa A, Yoshinaga K, Yamazaki M: Reduction of cystic cavity, promotion of axonal regeneration and sparing, and functional recovery with transplanted bone marrow stromal cell-derived Schwann cells after contusion injury to the adult rat spinal cord. *J Neurosurg Spine*, 9(6): 600-10, 2008.
- Ishikawa N, Suzuki Y, Dezawa M, Kataoka K, Ohta M, Cho H, Ide C: Peripheral nerve regeneration by transplantation of BMSC-derived Schwann cells as chitosan gel sponge scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2009 : (in press)

## 2. 学会発表

(シンポジウム・特別講演)

- 出澤真理: 骨髄間葉系細胞における胚葉を越えた多分化能と自己細胞移植治療への挑戦, 第113回日本解剖学会, 大分, 3月, 2008.
- Dezawa M: Insights into autotransplantation: the discovery of specific induction systems in bone marrow stromal cells. Chicago Neural Repair Club, Children's Memorial Research Center, Northwestern Univ., Chicago, USA, April, 2008.
- 出澤真理: 骨髄間葉系細胞の神経系細胞・筋細胞への誘導システムと変性・損傷疾患への応用の可能性, 第31回日本神経科学会, 東京, 7月, 2008.
- 出澤真理: 思わぬ発見のもたらした骨髄間葉系細胞の分化転換システムと自己細胞移植治療の可能性, 女性研究者の現状とこれから, Educational Cardiology in Chiba, 千葉, 9月, 2008.
- Dezawa M: A challenge to auto-transplantation in neuro- and muscle-degenerative diseases. The 21<sup>st</sup> Chinese SCI Academic Annual Meeting & The 3<sup>rd</sup> International SCI Treatments & Trials Symposium, Beijing, China, October, 2008
- Dezawa M: A challenge to auto-transplantation in neuro- and muscle-degenerative diseases: the discovery of specific induction systems in bone marrow stromal cells. Adult Stem Cells-Biology and Clinical Applications Conference, Brisbane, Australia, November, 2008.
- 出澤真理: 自己細胞移植による神経・筋肉変性疾患の根本的治療法の開発, 医薬基盤研究所基礎研究推進事業研究成果発表会, 大阪, 12月, 2008.
- 出澤真理: 骨髄間葉系細胞を用いた自己細胞移植による神経・筋変性疾患の根本治療法の開発, シンポジウム「再生医療のブレークスルーを目指して」, 東京工業大学, 1月, 2009.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

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、骨髄間質細胞よりドーパミン細胞に分化誘導した細胞移植を行った。前年度エンドポイントとして策定した運動機能評価の改善度、非侵襲画像法によるドーパミントランスポータの改善度、について評価を開始した。何れの個体においても細胞移植法は目的とする部位にドーパミントランスポータはドーパミン細胞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。移植直後にトランスポータの発現が上昇し移植細胞の生着が確認された。今後行動評価と共に長期的観察を続ける予定である。

#### A. 研究目的

霊長類動物でパーキンソン病モデルサルを作成し骨髄間質細胞より誘導した細胞移植を行う。

#### C. 研究結果

10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、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った。各個体の腰椎より採取した骨髄液から骨髄間質細胞を分離しドーパミン細胞に分化誘導した細胞を病側の線条体運動野領域に移植した。

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。

運動機能障害度は、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、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ドーパミン機能を評価した。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、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。すでに前年度本法によりMPTP投与前 $4.3 \pm 0.7$ 点(mean $\pm$ SD)、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 $1.8 \pm 1.6$ 点、対側の右前肢 $3.6 \pm 0.9$ 点で、注入反対側の前肢により強い運動速度低下が生じることを確認している。



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（ $^{11}\text{C}$ -CFT）、ポストシナプスの評価にD1受容体（ $^{11}\text{C}$ -SCH23390）およびD2受容体（ $^{11}\text{C}$ -raclopride）を用いた。このうち特に $^{11}\text{C}$ -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。解析には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 $^{11}\text{C}$ -CFT測定の個体間・測定間変動の少なくでき（9%）、線条体全体に関心領域を設定すると $^{11}\text{C}$ -CFTの線条体結合能は $0.58 \pm 0.05$ であった（図2A）。

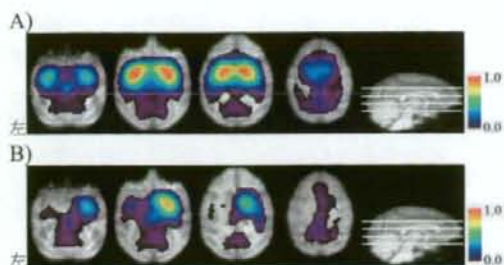


図2. 5頭のサル正常時の平均 $^{11}\text{C}$ -CFT結合能画像 (A) とパーキンソン病モデル作成後(MPTP右内頸動脈内注入3ヶ月後)の平均 $^{11}\text{C}$ -CFT結合能画像。正常時と比べパーキンソン病モデル作成後に右側線条体(MPTP注入側)全体の結合能が著明に低下している。また反対側の非注入側も低下している傾向にある。解剖学的に標準化した平均MRI画像上に平均CFT結合能画像を重ねて表示した。

さらにMPTP投与3ヶ月後にPETを行ったところ、 $^{11}\text{C}$ -CFT結合能はMPTP注入側線条体で $0.10 \pm 0.09$  (変動係数89%)、MPTP非注入側線条体で $0.47 \pm 0.15$  (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 $^{11}\text{C}$ -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。

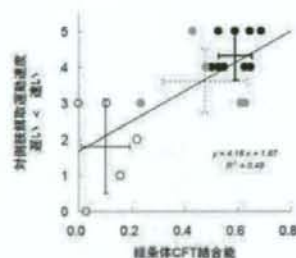


図3. PETにおける $^{11}\text{C}$ -CFT線条体結合能と対側前肢餌取り運動速度との関係。対側肢の運動速度は、PET解析結果を知らない観察者により6段階で評価した (5:最も速い、0:無動か非常に遅い動き)。結合能が低い場合ほど運動速度が低下し両者に相関が見られた。●: 正常時線条体の結合能とその対側運動速度(n=10)、○: MPTP投与対側の線条体(n=5)、○: MPTP投与前 (右側) の線条体(n=5)、各群の平均値と標準偏差を十字で示す。

骨髄間質細胞は予め各個体の腰椎から採取した骨髄液から分離し、Dezawaら(Dezawa et al. 2004)の手法によりNotch核内ドメインの導入およびGDNFの添加によってチロシンヒドロキシラーゼ (TH)陽性細胞すなわちドーパミン産生神経細胞を作成した。またこれら細胞がPETマーカーで用いるドーパミントランスポータの発現をしていることも免疫染色にて確認した。これら細胞を個体内に移植しトランスポータのPETイメージングを行ったところ移植部位に一致して右線条体後背側部に発現を認めた。

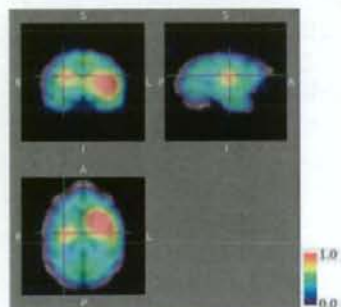


図3. パーキンソン病モデルサルの細胞移植後(1週)の平均 $^{11}\text{C}$ -CFT結合能画像。移植後に右側線条体背側部のトランスポータ結合が上昇している。解剖学的に標準化した平均MRI画像上に平均CFT結合能画像を重ねて表示した。

#### D. 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 $^{11}\text{C}$ -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 (Hag

ell 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。

移植後のPETでドーパミントランスポータ発現の上昇を認めた。細胞自体にもドーパミントランスポータが発現したことから移植細胞による発現と考えられる。今後移植後の行動評価の改善、および長期的効果の有無が重要となる。

## E. 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評価を行い骨髄間質細胞由来神経細胞の移植を行った。移植1週間後のPET評価においてドーパミン機能の改善を認めた。今後データの収集と長期観察を続けることで有効性と安全性を評価する予定である。

## G. 研究発表

### 1. 論文、総説

Iida H, Eberl S, Kim KM, Tamura Y, Ono Y, Nakazawa M, Sohlberg A, Zeniya T, Hayashi T, Watabe H. Absolute quantitation of myocardial blood flow with (201)Tl and dynamic SPECT in canine: optimisation and validation of kinetic modelling. Eur J Nucl Med Mol Imaging 35:896-905, 2008

Kudomi N, Hayashi T, Watabe H, Teramoto N, Piao R, Ose T, Koshino K, Ohta Y, Iida H. A physiologic model for recirculation water correction in CMRO(2) assessment with (15)O(2) inhalation PET. J Cereb Blood Flow Metab, 2008

Sato H, Enmi J, Teramoto N, Hayashi T, Yamamoto A, Tsuji T, Naito H, Iida H. Comparison of Gd-DTPA-induced signal enhancements in rat brain C6 glioma among different pulse sequences in 3-Tesla magnetic resonance imaging. Acta Radiol 49:172-179, 2008

林 拓也, 出澤真理. 骨髄間葉系細胞を用いたパーキンソン病への自己細胞移植の可能性. 日本臨床, 2009 (出版中)

林 拓也. 神経画像法を用いた虚血性脳疾患の前臨床・臨床試験と病態把握. 循環器病研究の進歩 48:79-86, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

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

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・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、昨年度の結果を踏まえて、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引き続き検討した。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、マウス、ラット、サル、サルの骨髄より採取した MSC に対する遺伝子導入とそれにとり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、サル MSC においても細胞の生存率を下げることなく、細胞の神経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歩前に踏み出し、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

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ソシアヌレート（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。本年度は、マウス、ラット、サルから

MSC を採取、動物種が遺伝子導入と細胞分化に与える影響について検討した。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. 研究結果

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。MSC はマウス、ラット、サル の骨髄より単離した。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。これらの成果は、これまで遺伝子導入が難しかったサル MSC に対しても認められた。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と比較して、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使い、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。この方法により、サル MSC の神経分化も可能となった。現在、神経分化細胞を用いたサル病態モデル動物への移植実験を行っている。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. T. Okasora, JI. Jo, and Y. Tabata. Augmented anti-tumor therapy through natural targetability of macrophages genetically engineered by NK4 plasmid DNA. *Gene Therapy*, 15, 524-30, (2008)
2. M. Nakamura, JI. Jo, Y. Tabata, and O. Ishikawa. Controlled delivery of T-box 21 siRNA ameliorates autoimmune alopecia (alopecia areata) in C3H/HeJ mouse model. *Am J Pathol.*, 172(3):650-8, (2008)
3. N. Nishishita, JI. Jo, M. Yamamoto, Y. Tabata, and Y. Hirano. The gene transfection using cell attachment peptides for gene therapy. *Peptide Science*, 2007, 443-46, (2008)
4. K. Nagane, M. Kitada, S. Wakao, M. Dezawa, Y. Tabata. Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells by spermine-pullulan-mediated reverse transfection method. *Tissue Engineering Part A*, 15, (2008)

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



筋再生時に出現する脂肪細胞の由来

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**

筋ジストロフィーの骨格筋では、症状の進行に伴って筋線維が徐々に脂肪細胞に置き換わる現象がみられる。しかしこの脂肪細胞の由来や出現機序については良くわかっていない。我々はこの問題に対処するため、手始めに脂肪源を特定することを目指し研究を行った。即ち筋再生に寄与すると思われる細胞の中から筋固有 SP 細胞、筋芽細胞、骨髄細胞を選び、これらを GFP-tag マウスから採取して移植した野性型のマウスに筋再生を誘導して出現する脂肪細胞に GFP が発現するかどうかを調べた。SP 細胞移植筋の再生では、GFP 陽性の移植細胞群が観察した前脛骨筋すべてにおいて脂肪細胞と共存する様子が認められた。共存領域には GFP 陽性の細胞質を持ち、ペリリピン陽性の油滴を含む細胞が見出された。一方筋芽細胞移植筋や骨髄キメラマウス筋の再生で出現する脂肪細胞に GFP が発現する様子は見られなかった。以上の結果から、グリセリン誘導による筋再生で出現する脂肪細胞のうち、その少なくとも一部は筋固有の SP 細胞に由来すると結論した。SP 細胞は本質的に脂肪化能を持っているが、正常な筋再生ではそれが抑制されており、その抑制の取り除かれることが脂肪化に繋がるのかもしれない。

**A. 研究目的**

筋ジストロフィーの骨格筋では筋線維の変性・再生が繰り返された後、一部は脂肪細胞に置き換わることが知られている。このことが患者の筋力低下を一段と進行させていると思われる。その抑制は患者延命のために必須であるが、こうした脂肪細胞の由来や出現機序については良くわかっていない。この研究で我々はこの問題を解明したいと考え、手始めに脂肪源の特定を検討することにした。即ち筋再生に寄与すると思われる細胞の中から骨髄細胞、筋固有 SP 細胞及び筋芽細胞の3つを選び、これらを GFP-tag マウスから採取して移植した野性型のマウスに、グリセリン投与による筋再生を誘導して出現する脂肪細胞に GFP が発現するかどうかを調べた。

**B. 研究方法**

B6 系の GFP-tag マウス骨格筋より単核細胞を採取し、FACS により SP 細胞と筋芽細胞を分離調製した。野性型マウス (B6) の前脛骨筋に 50%グリセリンを注入して筋再生を誘導し、翌日細胞を移植して 10 日

以上飼育したのち筋を採取して解析した。一方 GFP-tag マウスより骨髄を採取し、直前に X 線照射した B6 マウスに移植し、1 カ月以上飼育してキメラマウスを作製、その再生誘導筋を解析した。解析は凍結切片を免疫染色し、コンフォーカル顕微鏡で観察することにより行った。GFP はその特異抗体で、また脂肪は脂肪滴膜タンパク質ペリリピンの抗体で検出した。

(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. 研究結果

作製した骨髄キメラマウスの再生誘導筋では GFP 陽性の骨髄由来細胞が多数検出されたが、出現した脂肪細胞に GFP が発現する様子は認められなかった。再生誘導した筋芽細胞移植筋では GFP 陽性の筋線維が少ないけれども検出された。また十分に分化していないと思われる GFP 陽性の細胞も認められた。しかしこのマウスにおいても GFP 陽性の脂肪細胞は認められなかった。一方、SP 細胞移植筋の再生では、GFP 陽性の移植細胞群が観察した前脛骨筋 (6 本) すべてにおいて脂肪細胞と共存する様子が認められた。共存領域を詳細に観察すると GFP 陽性の細胞質を持ち、ペリリピン陽性の油滴を含む細胞が見出された。

## D. 考察

以上の結果から、B6 マウスのグリセリン誘導による筋再生で出現する脂肪細胞のうち、その少なくとも一部は筋固有の SP 細胞に由来すると考えられる。我々は以前、今回用いた SP 細胞が更に 3 つに分画されることを示しており、今後そのどれが脂肪源になるのか確認する必要がある。これに関して土田らは PDGF レセプターを発現する筋固有の間葉系前駆細胞が脂肪源であるとする報告をしている。SP 細胞 3 分画のうち [CD31-/CD45-] 細胞は土田らの主張する細胞に包含されるはずで、この細胞分画が今回観察された脂肪の由来である可能性が高い。我々のこれまでの研究でこの細胞は興味深い性質を持つことがわかっている。即ち筋再生下に採取されたこの細胞は非常に良く増殖し、間葉系の遺伝子を発現するようになる。培養すると脂肪や骨細胞に分化し、筋芽細胞と共培養すれば筋管細胞にも分化する。また別の研究で我々はこの細胞が筋再生において筋芽細胞の増殖と移動を促進することを示した。両細胞の相互作用は正常な筋再生にとって必須と言えるが、グリセリンによる筋再生で脂肪が出現したということは、こうした相互作用がこの条件下で阻害され、結果的に SP 細胞分画が本質的に備える脂肪化能が顕在化したからかもしれない。

## E. 結論

B6 マウスのグリセリン誘導による筋再生で出現する脂肪細胞のうち、その少なくとも一部は筋固有の SP 細胞に由来すると考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### I. 論文発表

( 英 文 )

1. Nishiyama A, Ampong BN, Ohshima S, Shin JH, Nakai H, Imamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Okada T, Takeda S. Recombinant adeno-associated virus type 8-mediated extensive therapeutic gene delivery into skeletal muscle of a-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Gene Ther*, 19, 719-730, 2008

2. Hijikata T, Nakamura A, Isokawa K, Imamura M, Yuasa K, Ishikawa R, Kohama K, Takeda S, Yorifuji H. Plectin 1 links intermediate filaments to costameric sarcolemma through beta-synemin,  $\alpha$ -dystrobrevin and actin. *J Cell Sci*. 121, 2062-2074, 2008

### II. 学会発表

( 国 外 )

1. Imamura M, Takeda S: Analysis of allele-specific Expression of the mouse *e-sarcoglycan* gene. American Society for Cell Biology 48<sup>th</sup> annual meeting, San Francisco, USA, Dec 15, 2008

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

(代表者：出澤真理)

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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	メディカルドゥ社	大阪	2008	pp.46-49
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	メディカルドゥ社	大阪	2008	pp.54-56

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Dezawa M	Systematic neuronal and muscle induction systems in bone marrow stromal cells: the potential for tissue reconstruction in neurodegenerative and muscle degenerative diseases	Medical Molecular Morphology	41(1)	14-19	2008
Someya Y, Koda M, Dezawa M, Kadota T, Hashimoto M, Kamada T, Nishio Y, Kadota R, Mannoji C, Miyashita T, Okawa A, Yoshinaga K, Yamazaki M	Reduction of cystic cavity, promotion of axonal regeneration and sparing, and functional recovery with transplanted bone marrow stromal cell-derived Schwann cells after contusion injury to the adult rat spinal cord	J Neurosurg Spine	9(6)	600-610	2008
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	-	79-92	2008
Kidata M, Dezawa M	Induction system of neural and muscle lineage cells from bone marrow stromal cells; a new strategy for tissue reconstruction in degenerative diseases	Histology and Histopathology	24(5)	631-642	2009
Kentaro Nagane, Masaaki Kitada, Shohei Wakao, Mari Dezawa, Yasuhiko Tabata, (5人中4番目: Dezawa = correspondence)	Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells by spermine-pullulan-mediated reverse transfection method	Tissue Engineering	15(00)	(in press)	2009
Ishikawa N, Suzuki Y, Dezawa M, Kataoka K, Ohta M, Cho H, Ide C	Peripheral nerve regeneration by transplantation of BMSC-derived Schwann cells as chitosan gel sponge scaffolds	J Biomed Mater Res A	-	(in press)	2009
出澤真理	筋ジストロフィーと細胞移植治療	医学のあゆみ	226(5)	393-396	2008

出澤真理	骨髄間葉系細胞を用いた神経筋疾患治療の可能性	最新医学	63(12)	55-63	2008
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)	2009

(分担者：林 拓也)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Iida H, Eberl S, Kim KM, Tamura Y, Ono Y, Nakazawa M, Sohlberg A, Zeniya T, Hayashi T, Watabe H.	Absolute quantitation of myocardial blood flow with (201)Tl and dynamic SPECT in canine: optimisation and validation of kinetic modelling.	Eur J Nucl Med Mol Imaging	35	896-905	2008
Kudomi N, Hayashi T, Watabe H, Teramoto N, Piao R, Ose T, Koshino K, Ohta Y, Iida H.	A physiologic model for recirculation water correction in CMRO(2) assessment with (15)O(2) inhalation PET.	J Cereb Blood Flow Metab	29	355-64	2009
Sato H, Enmi J, Teramoto N, Hayashi T, Yamamoto A, Tsuji T, Naito H, Iida H.	Comparison of Gd-DTPA-induced signal enhancements in rat brain C6 glioma among different pulse sequences in 3-Tesla magnetic resonance imaging.	Acta Radiol	49	172-179	2008
林 拓也	神経画像法を用いた虚血性脳疾患の前臨床・臨床試験と病態把握.	循環器病研究の進歩	48	79-86	2008
林 拓也, 出澤真理	骨髄間葉系細胞を用いたパーキンソン病への自己細胞移植の可能性	日本臨床	出版中	-	2009