

200935015A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 出沢 真理

平成22(2010)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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 出沢 真理

平成22(2010)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	----- 7
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	----- 10
3. 筋ジストロフィー犬での治療効果と安全性の解析 －赤外線運動量モニタリングシステムを用いた 運動量の評価－ 今村 道博	----- 13

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
-----------------	----------

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 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構築を検討し、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 独立行政法人理化学研究所・  
分子イメージング科学研究セ  
ンター・分子プローブ機能評価  
研究チーム・副チームリーダー  
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

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、

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ホスト脳における生着・機能回復に関する検討を、移植細胞の足場となるマトリックス、血管新生促進作用をもたらす徐放剤などと合わせて移植し、最適条件を脳梗塞モデルで検証する。
3. 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。

4. 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。
5. 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 緩衝能をもつスぺルミンを選び、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、スぺルミンを加え、水酸基とスぺ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。今年度は特に、ヒト、マウス、サルなどの骨髄間葉系細胞を用いて、遺伝子導入の有効性・ドーパミン神経の誘導効率を検討した。

(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た。上記の誘導した神経前駆細胞のほかに、type 1 collagen を足場として、また血管新生や生体内細胞の分化を促進することを目的としてゼラチンゲルに bFGF を含ませた bFGF の徐放剤、などを組み合わせて移植し、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)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: 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。

(4)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 $^2$ の密度で継代し、24時間後にbFGF(10ng/ml), forskoin (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。

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: 従来の lipofection に比べると、リバーストランスフェクション法の方が有意に細胞毒性が低く、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、細胞死もほとんど確認されず、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。さらにこれらの誘導したドーパミン神経に高カリウム溶液を投与し、脱分極を誘発して培養上清に放出されるドーパミンをHPLCで計測したところ、ヒト、サルにおいて $2\sim 20\text{ pmol}/10^6\text{ cells}$ 、マウスにおいては $2\sim 50\text{ pmol}/10^6\text{ cells}$ のドーパミン放出が認められた。よってリバーストランスフェクション法は骨髄間質細胞からのドーパミン神経誘導に有効であることが分かった。

(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：前年度までに、骨髄間質細胞から Notch 遺伝子を導入し free-floating 培養に持っ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。本年度は、これら誘導した神経前駆細胞の有効な移植システムを構築する検証実験を行った。(1) FGF gelatin 徐放剤のみ投与、(2) collagen type 1 のみ、(3) FGF gelatin 徐放剤+collagen type 1、(4) 神経前駆細胞のみ、(5) FGF gelatin 徐放剤+collagen type 1+神経前駆細胞、を脳梗塞モデルラットに移植し、空洞化率の計測、limb placing test, Morris water maze test, 組織学的検討を行った。その結果、(5) FGF gelatin 徐放剤+collagen type 1+神経前駆細胞において、梗塞巣、空洞率が最も低く、limb placing test, Morris water maze test において顕著な脳機能改善が確認された。また移植細胞を GFP-lentivirus で標識すると、移植細胞は NeuN, MAP2, neurofilament などの神経マーカー陽性の細胞として宿主脳内で認められた。

(3) 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 の投与によってカニ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、移植半年経過した時点においても、ドーパミントランスポーターの発現が持続することを CFT-PET によって確認した。またドーパミンの前駆体である F-DOPA の PET スキャンも行ったが、同じく移植部位においてドーパミンの合成を示唆する結果を得た。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。同じく半年後においてMRIを試行したが、腫瘍形成は認められなかった。血液検査、全身状態においても同様である。

(4) 骨髄間質細胞からの骨格筋誘導：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し、切除したのち外転麻痺がファイバーで確認できることを確認した。さらに誘導しないそのままの骨髄間葉系細胞の自己細胞移植、同種移植、あるいは骨格筋に誘導した細胞の自己細胞移植と同種移植に着手した。現在、イヌすべての骨髄間葉系細胞からの骨格筋誘導に成功しており、移植実験を行っており今後も継続して観察をする予定である。

#### D. 考察

骨髄間葉系からの神経・筋分化誘導においては Notch の遺伝子導入が不可欠であるが、特に細胞が弱いサルの細胞などを用いる場合、導入方法の検討が必要であった。一連の研究から、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り、サルでの片側性パーキンソンモデル実験が実施可能になったことは大きな成果である。

細胞移植において重要な要件は、細胞の生着・生存・宿主組織内での分化・血管新生による栄養供給体制の維持、など総合的な要素が必要とされる。細胞の生着にとって必須の足場に関しては type 1 collagen が、また血管新生の促進には、FGF を含む gelatin 徐放剤に効果のあることが脳梗塞損傷モデルで分かった。特に脳梗塞など、組織の損傷・欠落が大きい疾患においては、細胞だけを移植しても有効な再建にはつながらない。その意味で、本研究によって得られた成果は細胞とともに、これらの因子を同時に投与することへの意義を明らかにしたと言える。

イヌの声帯を持ちいた移植実験は、今後も継続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。

F. 危険情報 無し

G. 研究発表

【出澤真理】

1. 論文発表

(著書)

- Dezawa M, So KF. Regeneration of optic nerve. *Encyclopedic Reference of Neuroscience*. Eds. MD Binder, N Hirokawa, U Windhorst, Springer (in press)
- M. Dezawa et al. Vision, in *Handbook of Physics in Medicine and Biology*, eds R. Splinter, Taylor and Francis Publishing. (March, 2010)
- 出澤真理, 脳神経 松島綱治・西脇徹編、炎症・再生医学事典 朝倉書店 (2009)

(和文総説)

- 出澤真理: 間葉系幹細胞の分化転換治療学 43(6): 615-8, 2009.
- 林拓也, 出澤真理: 骨髄間葉系細胞を用いた自己細胞移植の可能性 日本臨床「パーキンソン病—基礎・臨床研究のアップデート—」67(4): 429-34, 2009.
- 出澤真理: 筋ジストロフィーと細胞移植治療 ミオパチー—臨床と治療研究の最前線 莖中征哉編集 61-4, 2009.

(原著論文)

- Nagane K, Kitada M, Wakao S, et al: Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells by spermine-pullulan-mediated reverse transfection method. *Tissue Eng.* 15(7): 1655-65, 2009.
- Ishikawa N, Suzuki Y, Dezawa M, et al: Peripheral nerve regeneration by transplantation of BMSC-derived Schwann cells as chitosan gel sponge scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 89(4):1118-24, 2009.
- Hayase M, Kitada M, Wakao S, et al:

Committed neural progenitor cells derived from genetically modified bone marrow stromal cells ameliorate deficits in a rat model of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 29(8): 1409-20, 2009.

- Makinoshima H, Dezawa M: Pancreatic cancer cells activate CCL5 expression in mesenchymal stromal cells through the insulin-like growth factor-I pathway. *FEBS Lett.* 583(22):3697-703, 2009.
- Noguchi A, Matsumura S, Dezawa M, et al: Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high-mass amyloid beta-protein (Abeta) assembly from Alzheimer's disease brains. *J. Biol. Chem.* 284(47):32895-905, 2009.
- Matsumoto N, Taguchi A, Kitayama H, et al: Transplantation of cultured choroid plexus epithelial cells via cerebrospinal fluid shows prominent neuroprotective effects against acute ischemic brain injury in the rat. *Neurosci. Lett.* (in press)
- Shohei Wakao, Takuya Hayashi, Masaaki Kitada, Misaki Kohama, Dai Matsuse, Noboru Teramoto, Takayuki Ose, Yutaka Itokazu, Kazuhiro Koshino, Hiroshi Watabe, Hidehiro Iida, Tomoaki Takamoto, Yasuhiko Tabata, Mari Dezawa\* (\*Correspondence). Long-term observation of auto-cell transplantation in non-human primate reveals safety and efficiency of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Exp. Neurol.* (in press) 2010.

2. 学会発表

(シンポジウム・特別講演)

- 出澤真理 骨髄間葉系細胞の胚用を超えた分化転換システムと自己細胞移植治療への可能性 第14回阪大医療組織工学フォーラム, 大阪大学, 6月, 2009.
- 出澤真理 骨髄間葉系細胞の胚用を超えた分化転換システムと自己細胞移植治療への可能性 2009年九州大学脳神経内科同門会, 博多, 7月, 2009.



- 出澤真理 骨髄間葉系細胞の胚用を超えた分化転換システムと自己細胞移植治療への可能性 第14回眼創傷治療研究会, 仙台, 8月, 2009.
- M. Dezawa, “Bone Marrow Stromal Cells: A hope for auto-cell transplantation Therapy for neuro- and muscle-degenerative diseases” at Nelson Biology Labs, The State University of New Jersey, Rutgers. NJ, USA, Sep, 2009.
- 出澤真理 [特別講演]骨髄間葉系細胞の胚用を超えた分化誘導系と神経・筋変性疾患への応用の可能性 日本解剖学会第55回東北・北海道連合支部学術集会 東北大学, 9月, 2009.
- M. Dezawa : Efficient induction system of neural precursor cells and dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells. Academy for Multidisciplinary Neurotraumatology (AMN) The Hong Kong Neurosurgery Society (HKNS) Conjoint Congress, Hong Kong, Nov, 2009.
- 出澤真理 : [特別講義]骨髄間葉系細胞の胚用を超えた分化誘導系と神経・筋変性疾患への自己細胞移植治療の可能性 福島県立医科大学医学部, 福島, 1月, 2010.
- 出澤真理 骨髄間葉系細胞を用いた神経・筋変性モデルの組織再構築と機能回復 第115回日本解剖学会総会・全国学術集会 岩手県民会館, 3月, 2010.

#### 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～

研究分担者 林 拓也 独立行政法人理化学研究所分子イメージング科学研究センター

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。これまで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を評価し、また安全性についてFDG-PETやMRIによる腫瘍化の検索を行った。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細胞機能障害を評価できることを確認した。移植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、腫瘍化を疑う変化は画像上得られなかった。骨髄間質細胞による細胞治療法が霊長類動物においても安全性の高い細胞治療法として有用であることが示唆された。

### A. 研究目的

げっ歯類動物の骨髄間質細胞から誘導した細胞は機能分化度が高く細胞移植による再生医療への応用が期待されている。しかし臨床応用するには前臨床段階において有効性及安全性の十分かつ多角的な検討が望まれる。特に安全性については近年の多能性幹細胞（ES細胞やiPS細胞）等の知見から移植後腫瘍化の有無の検討が必須である。研究は、生物学的に人に近い種である霊長類動物（カニクイザル）のパーキンソン病モデルサルを用い、骨髄間質細胞より誘導したドーパミン細胞移植の有効性・安全性評価を行うことを目的とする。

### B. 研究方法

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度野領域に移植した。

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。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。

（倫理面への配慮）動物実験は、実験動物に対する動物愛護に配慮しその方法について国立循環器病センター研究所の実験動物委員会の承認を受けたうえで行った。

### C. 研究成果

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、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±0.7点（mean±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±1.6点、対側の右前肢3.6±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。

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（<sup>11</sup>C-CFT）、ポストシナプスの評価にD1受容体（<sup>11</sup>C-SCH23390）およびD2受容体（<sup>11</sup>C-raclopride）を用いた。このうち特に<sup>11</sup>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<sup>11</sup>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<sup>11</sup>C-CFTの線条体結合能は0.58±0.05であった（図1A）。

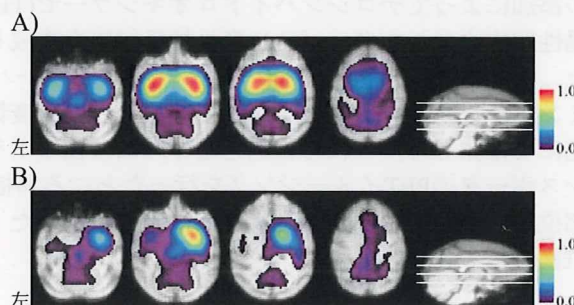


図1. 5頭のサル正常時の平均<sup>11</sup>C-CFT結合能画像（A）とパーキンソン病モデル作成後（MPTP右内頸動脈内注入3ヶ月後）の平均<sup>11</sup>C-C

FT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、<sup>11</sup>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1B)。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<sup>11</sup>C-CFT結合能)との間に良好な相関関係を認めた(図2)。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。

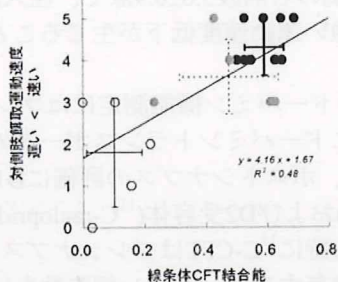


図2. PETにおける<sup>11</sup>C-CFT線条体結合能と対側前肢餌取り運動速度との関係。対側肢の運動速度は、PET解析結果を知らない観測者により6段階で評価した(5:最も速い、0:無動か非常に遅い動き)。結合能が低い場合ほど運動速度が低下し両者に相関が見られた。●:正常時線条体の結合能とその対側運動速度(n=10), ●:MPTP投与対側の線条体(n=5), ○:MPTP投与側(右側)の線条体(n=5)、各群の平均値と標準偏差を十字で示す。

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)。

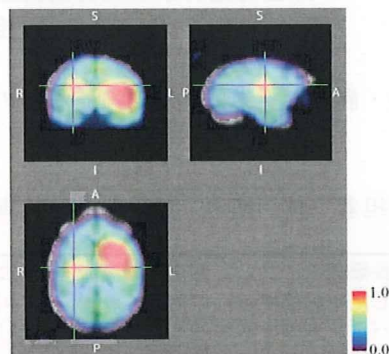


図3. パーキンソン病モデルサルの細胞移植後(1週)の平均<sup>11</sup>C-CFT結合能画像。移植後に右側線条体後背側部のトランスポータ結合が上昇している。解剖学的に標準化した平均MRI画像上に平均CFT結合能画像を重ねて表示した。

また移植後の安全性の評価のため、MRI撮影による移植部位の変化、<sup>18</sup>F-FDGを用いた腫瘍性変化の同定、血中腫瘍マーカーを用いた全身腫瘍性検索などを行ったがいずれも移植細胞の腫瘍化を疑う所見は得られなかった。

#### 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<sup>11</sup>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認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。

またFDG-PET、MRI画像の結果から移植後の腫瘍化を疑う所見が全く見られなかったのは重要な知見で、本治療法の臨床応用を進めるための必要条件が満たされたと考えられる。

## 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。移植後のPET評価においてドーパミン機能の改善を認め、安全性の評価においても腫瘍化を認めなかったことから本治療法の有効性・安全性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文、総説

Wakao S, Hayashi T, Kitada M, Kohama M, Matsue D, Teramoto N, et al. Long-term observation of auto-cell transplantation in non-human primate reveals safety and efficiency of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol*. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20153320](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20153320)

Temma T, Iida H, Hayashi T, Teramoto N, Ohta Y, Kudomi N, et al. Quantification of regional myocardial oxygen metabolism in normal pigs using positron emission tomography with injectable (15)O-O (2). *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 37(2):377-85.

Kudomi N, Hayashi T, Watabe H, Teramoto N, Piao R, Ose T, et al. A physiologic model for recirculation water correction in CMRO2 assessment with 15O2 inhalation PET. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29(2):355-64.

Koshino K, Watabe H, Hasegawa S, Hayashi T, Hatazawa J, Iida H. Development of motion correction technique for cardiac 15O-water PET study using an optical motion tracking system. *Ann Nucl Med*. 24(1):1-11.

Iwanishi K, Watabe H, Hayashi T, Miyake Y, Minato K, Iida H. Influence of residual oxygen-15-labeled carbon monoxide radioactivity on cerebral blood flow and oxygen extraction fraction in a dual-tracer autoradiographic method. *Ann Nucl Med*. 2009;23(4):363-71.

Iwanishi K, Watabe H, Fujisaki H, Hayashi T, Miyake Y, Minato K, et al. Evaluation of utility of asymmetric index for count-based oxygen extraction fraction on dual-tracer autoradiographic method for chronic unilateral brain infarction. *Ann Nucl Med*. 2009;23(6):533-9.

Ikoma Y, Watabe H, Hayashi T, Miyake Y, Teramoto N, Minato K, et al. Measurement of density and affinity for dopamine D(2) receptors by a single positron emission tomography scan with multiple injections of [(11)C]raclopride. *J Cereb Blood Flow Metab*. 30(3):663-73.

Ikoma Y, Watabe H, Hayashi T, Miyake Y, Teramoto N, Minato K, et al. Quantitative evaluation of changes in binding potential with a simplified reference tissue model and multiple injections of [11C]raclopride. *Neuroimage*. 2009;47(4):1639-48.

Dagher A, Tannenbaum B, Hayashi T, Pruessner JC, McBride D. An acute psychosocial stress enhances the neural response to smoking cues. *Brain Res*. 2009;1293:40-8.

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. In: 日本臨床増刊号: パーキンソン病—基礎・臨床研究のアップデート. 大阪: 日本臨床社; 2009. p. 429-434.

林 拓也. 高磁場MRI. In: 循環器診療マニュアル 2009年. 東京: 中山書店; 2009.

松原 佳亮, 渡部 浩司, 林 拓也, 飯田 秀博, 湊光太郎. [18F]FDOPA PET データのPatlak 解析により推定された取り込み定数のバイアス評価: [18F]FDOPA 代謝産物の影響. *生体医工学*. 2009;:出版中.

G. 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

研究分担者 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、過去2年間の結果を踏まえて、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。遺伝子導入効率を高めるための非ウイルス性キャリアをデザインと導入培養法の改良を行った。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）を用いることに加えて、3次元ゼラチンスポンジ足場と旋回培養法を組み合わせることで、細胞の生存率を下げることなく、細胞への遺伝子導入を高めることができた。

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発展させ、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遺伝子導入培養方法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ミダゾール（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 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コーティングした2次元あるは3次元スポンジ基材上で細胞を培養し、遺伝子の導入と発現効率を調べた。ゼラチン水溶液に $\beta$ -TCP（トリカルシウムリン酸）顆粒を分散させた後、泡立て、凍結乾燥することで3次元スポンジ基材を作製した。得られた基材を160℃にて異なる時間、熱脱水処理を行うことによって、ゼラチンを化学架橋し、 $\beta$ -TCP含有ゼラチンスポンジ足場を調製した。2次元および3次元基材にコンプレックスをコーティングした後、ラット MSC を培養した。培養は静置および旋回培養の2つの方法を用いた。コンプレックスのコーティング条件、培養方法が遺伝子導入と細胞毒性に与える影響について検討した。

### C. 研究成果

CDI やスペルミン濃度、および反応時間を変え

て作製したスペルミン導入率の異なるカチオン化プルランをプラスミド DNA と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。3次元スポンジ基材に関しては、熱処理時間を変えることで $\beta$ -TCP含有ゼラチンスポンジの架橋程度を変化させることができた。架橋度に関係なく、いずれのスポンジも連通多孔質構造をもち、その平均孔サイズは150 $\mu$ mであった。 $\beta$ -TCP顆粒を加えることによって、スポンジ強度が高まり、細胞培養操作時におけるスポンジの変形が抑制された。なお、 $\beta$ -TCP存在は細胞の増殖に影響を与えることはなかった。次に、異なる基材を用いて、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はラットの骨髄より単離した。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した。この培養方法では、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。 $\beta$ -TCP含有力学補強ゼラチンスポンジをアニオン化ゼラチン水溶液に浸漬、スポンジ孔構造の内壁をコーティングした。その後、コンプレックス水溶液をスポンジに加え、スポンジ孔内壁をコーティング処理した。この3次元スポンジ足場を用いて、MSCの遺伝子導入を調べた。その結果、2次元基材に比べて、より高い遺伝子発現効率が得られた。また、遺伝子導入培養による細胞毒性は認められなかった。

### 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、2次元および3次元基材へのコーティング条件などを変えることによ

って、遺伝子発現レベルが変化した。プラスミド DNA とカチオン化多糖との混合条件などによって、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した。また、このコンプレックスのコーティング処理によっても、コンプレックスの物性に変化し、その結果として MSC への取り込みと遺伝子発現に影響を与えた。細胞へのコンプレックスの取り込みと細胞の遺伝子発現レベルとの正の相関性が得られた。また、コンプレックスの基材からの脱離、放出が MSC の遺伝子発現レベルとよく相関していた。このことは、キャリアの設計に加えて、培養方法の工夫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が実現できた。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。また、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、コンプレックスコーティング基材上で細胞を培養するという新しい遺伝子導入法では、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。さらに、基材を 2 次元から 3 次元に変化させたことにより、遺伝子発現はさらに高まることがわかった。巡回培養により細胞への栄養と酸素の供給がよくなり、その結果として、3 次元スポンジ基材内での

細胞の状態がよくなり遺伝子導入効率が向上したことが理由であると考えられる。

## 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 への遺伝子導入を実現させることができることがわかった。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たところ、よい機能回復が見られている。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

Nagane, K., Kitada, M., Wakao, S., Dezawa, M., Tabata, Y.: Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells by spermine-pullulan-mediated reverse transfection method. *Tissue Eng Part A*. **15**(7):1655-65(2009)

### 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

筋ジストロフィー犬での治療効果と安全性の解析  
ー赤外線運動量モニタリングシステムを用いた運動量の評価ー

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**

Duchenne 型筋ジストロフィーのモデル動物である筋ジストロフィー犬は、エクソン・スキップ治療をはじめとする様々な治療研究に利用されている。しかし、実験動物としての供給が限られているために、非侵襲的な臨床症状の評価が望まれる。従来観察によるスコアリングが行われてきたが、運動性の評価に関する客観性と定量性が十分でなかった。そこで、赤外線センサーを用いた運動量モニタリングシステムによる運動量評価を検討した結果、従来法よりも運動性の評価を詳細に描出し、長期的な経過観察・治療評価に有用であることがわかった。

**A. 研究目的**

筋ジストロフィー犬（筋ジス犬）は、Duchenne 型筋ジストロフィーに最も類似した進行性で重症の症候を有するため、筋ジストロフィーに対する治療薬を開発し、評価を行う上では重要な位置を占める実験動物である。しかし、筋ジス犬は新生仔期の死亡率が非常に高く、実験への安定供給が困難であるために、非侵襲的な臨床症状の評価が実験動物の効率的な利用に重要である。

従来、歩行障害、運動性、四肢・側頭筋萎縮、流涎、巨舌、嚥下障害の 6 つの臨床症状について 5 段階評価を行うグレーディングスケールによってスコアリングが行われてきた。このスケールは筋ジス犬の一般状態の評価には有用であるが、5 段階であるために個体ごとの僅差を検出できないこと、多くの筋ジス犬が早期に最大値に達することなどから、十分な客観性と定量性において不十分であった。

げっ歯類では赤外線運動量モニタリングシステムを用いた自発運動量の評価法が確

立されており、筋ジス犬における本法の利用について検討した。

**B. 研究方法**

本研究では赤外線エネルギーの変化を計測する運動量モニタリングシステム (Supermex®, 室町機械株式会社) を用い、以下の検討を行った。

1. 筋ジス犬の自発運動量とグレーディングスケールによる評価との関連性の検討

1~9 歳齢の筋ジス犬 (n=9) について、自発運動量測定の前 5~7 日前にグレーディングスケールによるスコアリングを行った。自発運動量測定は連続する 5 日間について行い、1 日あたりの明期の合計運動量の平均値を各個体の自発運動量とした。Spearman's rank correlation を用いて両者の相関関係を検定した。

2. 10 週齢、1~2 歳齢の正常犬及び筋ジス犬の自発運動量の測定

10 週齢の正常犬 (n=2) および筋ジス犬 (n=5)、1~2 歳齢の正常 (n=3) および筋ジス犬 (n=3) について連続する 5 日間の自発運動



量を測定した。(n=5)、1~2 歳齢の正常犬 (n=3) および筋ジス犬(n=3)について、連続する 5 日間の自発運動量を測定した。またこのデータから 1 日ごとの合計運動量を求めた。

各年齢群において正常犬と筋ジス犬の 24 時間の運動量パターンの比較に関する統計学的分析は two-way repeated ANOVA による分散分析によって行った。また、1 日の合計運動量の有意差は unpaired student t-test によって、統計学的に検定した。

### 3. 新規環境に対する正常犬及び筋ジス犬の反応の比較

環境変化に対する反応性を比較するために 1~2 歳齢の正常犬(n=5)および筋ジス犬 (n=4)を通常飼育しているケージから運動量モニタリングシステムを設置したケージに移動させ、その後 2 時間の運動量を測定した。5 分間のインターバルごとに、運動量が自動的に算出されるように運動量モニタリングシステムを予め設定した。

正常犬と筋ジス犬の運動量パターンの比較に関する統計学的分析は two-way repeated ANOVA による分散分析によって行った。また各群についてケージ交換直後の運動量とその後 5 分ごとの運動量との有意差は Bonferroni/Dunn の post-hoc test を用いて検定した。

### 4. 筋ジス犬の治療研究における運動量モニタリングシステムを用いた効果の評価

同腹の筋ジス犬(n=2)において、一方には3~10ヵ月齢まで治療薬Xを投与した後、治療を中止した。もう一方は10ヵ月齢までは溶媒のみを投与し、以降治療薬Xを投与した。これらの犬の自発運動量を実験2と同じ方法で 10、11、12、13ヵ月齢の時点で評価した。

## C. 研究成果

1. 歩行障害のスコアは運動量と有意な相関を認めたが運動性のスコアでは認めなかった。

2. 2 つの年齢群において、正常犬、筋ジス犬の運動レベルは正常犬で有意に高かった。

3. 正常犬ではケージを交換後 85 分まで交換直後と同程度の運動量が維持されたが、筋ジス犬では 40 分後に運動量の有意な低下を認めた。

4. 10 ヶ月齢の治療犬では未治療犬に比べて有意に運動量が高かったが、治療を入れ替えて 3 ヶ月後の 13 ヶ月齢では 2 頭の運動量の有意差を認めなかった。

## D. 考察

グレーディングによる運動性のスコアに関しては、赤外線モニタリングによる運動量との相関を認めなかった。グレーディングでは犬は評価者が近づいたことによる反応を示すために個体の性格が評価に影響することが考えられる。運動量モニタリングシステムでは人為的な因子を除外して評価できると考えられた。

筋ジス犬では 2 ヶ月齢頃から歩様異常を認めることが過去に報告されているが、今回の検討により 10 週齢群で正常犬より有意に運動量が低いことが示された。また 1~2 歳齢群では正常犬と筋ジス犬の差が大きくなっており、過去の報告による臨床症状の進行と合致することが示唆された。運動量モニタリングシステムにより症状の進行を定量的に捉えることができると考えられた。

新規環境に対する反応性に関しては、正常犬に比べて筋ジス犬で早く運動量の低下を認めた。筋ジス犬の易疲労性や情緒機能の異常が考えられた。

治療研究における赤外線運動量モニタリングを用いた評価に関しては、治療の有効性を示唆する結果を得た。運動量モニタリングシステムは長期的な経過観察を行う必要がある場合に優れた評価法であると考えられた。

## E. 結論

赤外線運動量モニタリングシステムは、筋ジス犬の運動機能を定量的に評価する優れた方法であると考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Masuda-Hirata M, Suzuki A, Amano Y, Yamashita K, Ide M, Yamanaka T, Sakai M, Imamura M, Ohno S. Intracellular polarity protein PAR-1 regulates extracellular laminin assembly by regulating the dystroglycan complex. *Genes Cells*, 14, 835-850, 2009

### 1. 学会発表

Imamura M, Takeda S: Searching for loss of imprinting of the  $\epsilon$ - sarcoglycan gene in the cells of  $\epsilon$ -sarcoglycan partial knockout mice. 49 th American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Diego (USA), December 8, 2009

## H. 知的財産権の出願・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
<u>M. Dezawa</u> et al.	Vision	R. Splinter	Handbook of Physics in Medicine and Biology	Taylor and Francis Publishing	米国	2010	10-1～10-20
<u>出澤真理</u>	脳神経	松島綱治・西脇徹編	炎症・再生医学事典	朝倉書店	日本	2009	

## 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
Kentaro Nagane, Masaaki Kitada, Shohei Wakao, <u>Mari Dezawa</u> , Yasuhiko Tabata, (5人中4番目： <u>Dezawa</u> = correspondence)	Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells by spermine-pullulan-mediated reverse transfection method.	Tissue Engineering	15(7)	1655-65	2009
Ishikawa N, Suzuki Y, <u>Dezawa M</u> , et al	Peripheral nerve regeneration by transplantation of BMSC-derived Schwann cells as chitosan gel sponge scaffolds.	J Biomed Mater Res A	89(4)	1118-24	2009
Hayase M, Kitada M, Wakao S, et al	Committed neural progenitor cells derived from genetically modified bone marrow stromal cells ameliorate deficits in a rat model of stroke.	J Cereb Blood Flow Metab	29(8)	1409-20	2009
Makinoshima H, <u>Dezawa M</u>	Pancreatic cancer cells activate CCL5 expression in mesenchymal stromal cells through the insulin-like growth factor-I pathway.	FEBS Lett.	583 (22)	3697-703	2009
Noguchi A, Matsumura S, <u>Dezawa M</u> , et al	Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high-mass amyloid beta-protein (A $\beta$ ) assembly from Alzheimer's disease brains.	J. Biol. Chem.	284 (47)	32895-905	2009
Matsumoto N, Taguchi A, Kitayama H, et al	Transplantation of cultured choroid plexus epithelial cells via cerebrospinal fluid shows prominent neuroprotective effects against acute ischemic brain injury in the rat.	Neurosci. Lett.	-	-	In press

Shohei Wakao, Takuya Hayashi, Masaaki Kitada, et al (14人中14番目: Dezawa = correspondence)	Long-term observation of auto-cell transplantation in non-human primate reveals safety and efficiency of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in peripheral nerve regeneration.	Exp. Neurol.	-	-	In press
出澤真理	間葉系幹細胞の分化転換	治療学	43(6)	615-8	2009
林拓也, 出澤真理	骨髄間葉系細胞を用いた自己細胞移植の可能性	日本臨床「パーキンソン病 - 基礎・臨床研究のアップデート」	67(4)	429-34	2009
出澤真理	筋ジストロフィーと細胞移植治療	ミオパチー - 臨床と治療研究の最前線 埜中征哉編集	-	61-4	2009

(分担者: 林 拓也)

#### 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
林 拓也	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		日本臨床増刊号: パーキンソン病 - 基礎・臨床研究のアップデート	日本臨床社	大阪	2009	429-434
林 拓也	高磁場MRI	友池仁暢	循環器診療マニユアル2009年	中山書店	東京	2009	

#### 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
Temma T, Iida H, Hayashi T, Teramoto N, Ohta Y, Kudomi N, et al	Quantification of regional myocardial oxygen metabolism in normal pigs using positron emission tomography with injectable (15)O-O (2)	Eur J Nucl Med Mol Imaging	37(2)	377-85	In press
Kudomi N, Hayashi T, Watabe H, Teramoto N, Piao R, Ose T, et al	A physiologic model for recirculation water correction in CMRO2 assessment with 15O2 inhalation PET	J Cereb Blood Flow Metab	29(2)	355-64	2009
Koshino K, Watabe H, Hasegawa S, Hayashi T, Hatazawa J, Iida H	Development of motion correction technique for cardiac 15O-water PET study using an optical motion tracking system	Ann Nucl Med	24(1)	1-11	In press