

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19年度～21年度 総合研究報告書

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19年度～21年度 総合研究報告書

研究代表者 出沢 真理

平成22（2010）年 3月

目 次

I. 総合研究報告書	
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. 総合分担研究報告書	
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	----- 14
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	----- 18
3. 骨格筋の幹細胞と移植モデルとしての筋ジストロフィー犬 今村 道博	----- 23
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 28
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 34

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)
総合研究報告書

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

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、例えば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・機能発揮に必要な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(J Clin Invest, 2004; J Neuropath Exp Neurol, 2005)や筋衛星細胞を含む骨格筋細胞(Science, 2005)を誘導する極めて優れた方法を開発した。

1. 骨髄間質細胞への有効な遺伝子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. 移植細胞の足場となるマトリックス、移植細胞の生存と分化、さらに血管新生促進を実現する移植条件の検討を神経変性モデル(脳梗塞・脊髄損傷)で行なう。
3. 骨髄間質細胞から誘導する神経前駆細胞

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神経変性モデルで行う。

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安全性・有効性判定を行う。
5. 骨髄間質細胞から誘導する骨格筋細胞の安全性と有効性をイヌ(ビーグル犬)を用いて検討する。

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前駆細胞、成熟神経細胞、ドーパミン神経誘導の評価: ヒト、ラット、サルの骨髄間質細胞に Notch intracellular domain (NICD) を含む pCI-neo ベクターを lipofection にて導入し G418 で選択をした。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。これらの細胞が神経前駆細胞としてどの程度の機能性を獲得しているかを神経変性モデル(脳梗塞モデル)に移植し、評価した。これらの誘導した神経前駆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。この段階の誘導細胞がどの程度神経細胞(post-mitotic neuron)としての性質を有するかを検討した。またこれらの成熟神経細胞を GDNF で刺激するとドーパミン産生細胞に分化する。どの程度の機能性を有するかを検討した。

(3) 神経変性モデルを用いた有効な細胞移植システムの検討(脳梗塞と脊髄損傷モデルを用いて): Wistar rat の中大脳動脈虚血再還流をもちいて脳梗塞モデルを作成し、1 週間後において下記の条件で移植を行った。(1) FGF gelatin 徐放剤のみ投与、(2) collagen spongel のみ投与、(3) FGF gelatin 徐放剤+ collagen spongel、(4) 誘導神経前駆のみ、(5) collagen spongel+誘導神経前駆細胞、(6) FGF gelatin+collagen spongel+誘導神経前駆細胞。これらの 6 条件の移植における評価は limb placing test, beam balance test, Morris water maze test 並びに組織学的検討などによって行った。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+MSC から誘導した Schwann cell、を作成し、また脊髄後根から採取した生体由来

の Schwann 細胞と MSC から誘導したシュワン細胞とを比較検討した。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血管造影法を応用して0.4-0.8mg/kgの1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)を片側の内頸動脈から投与し、片側パーキンソン病モデルを作成した。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などを行い下記の有効性の判定を行った。まず、1)運動機能障害度であるが、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。

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。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。

さらに安全性評価としてFDG-PET scanによって全身の腫瘍細胞スキャンを行い、細胞移植に

伴う腫瘍細胞形成の有無を判定した。さらにヌードマウスへのヒト骨髄間質細胞から誘導した細胞の移植を行い、ガン化試験を実施した。

(5)骨髄間質細胞からの骨格筋誘導:ヒト骨髄間質細胞(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)、ラットおよびビーグル犬骨髄間質細胞を用いた。いずれも、継代4代目にて誘導を開始した。細胞を1,700~1,900 cells/cm²の密度で継代し、24時間後にbFGF(10ng/ml), forskloin (FSK) (5 μ M), neuregulin (200ng/ml) および PDGF (5ng/ml)を含む15% fetus bovine serum (FBS), alpha-MEMの培地で培養した。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を用いて選択した。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質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した。ただし、上記の培養においては、ヒト骨髄間質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、1. 同種移植の無処理の骨髄間質細胞、2. 同種移植の誘導骨格筋、3. 自己細胞移植の無処理の骨髄間質細胞、4. 自己細胞移植の誘導骨格筋の4実験系を作成し、移植を行っ

た。評価としては、1)ファイバースコープによる声帯運動の経時的観察と行う、3)移植後半年で、後筋の支配神経である反回神経を電気刺激し、後筋の筋電図を測定することにより定量的な評価を行う、3)後筋の組織学的評価を行う。移植細胞の安全性については、長期モデルの観察による腫瘍などの形成がないか、組織学的評価による正常筋組織との相違点などを詳細に検討する。

(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。

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、細胞死数は通常のlipofectionに比べて極力抑えられ、また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。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、成熟神経細胞、ドーパミン神経誘導の評価: 骨髄間質細胞からNotch細胞質ドメイン遺伝子を導入しfree-floatingで培養することによってsphereが多数誘導できる。これらのsphereにおいては神経幹細胞・前駆細胞のマーカーであるnestin, NeuroD, Musashi, Sox2が発現されていることがimmunocytochemistryおよびpromoter活性解析において確認された。この細胞を特定の密度の

接着培養に移し、さらに神経幹細胞で通常行う分化培地(EGFの低下、FGF, BDNFでの培養)に移し、解析すると神経マーカーである MAP2, Tuj1 陽性細胞が 98%前後であり、一方グリア細胞マーカーである GFAP 陽性細胞はほとんど検出されなかった。このことにより、骨髄間質細胞は Notch シグナルが活性化され、神経幹細胞培地で浮遊培養ことにより神経系に特化した神経前駆細胞に分化することが示唆された。

誘導した神経前駆細胞の sphere を single cell にして bFGF, CNTF, forskolin でサイトカイン処理を行なうと、post-mitotic neuron に分化し、Neurofilament, MAP-2, Tuj1 陽性の細胞となる。さらに NeuN, ChAT(choline acetyl transferase) など神経細胞への分化を示唆するマーカーの発現上昇、さらに誘導前の無処理骨髄間質細胞では発現が認められていない voltage-gated sodium channel の新規の発現が定量 PCR において確認された。また電気生理学的には誘導にともなう静止膜電位の低下、活動電位の計測を認めている。

こらら成熟神経細胞の特徴を有する細胞に GDNF を投与すると Tyrosin hydroxylase(TH)陽性細胞の比率が数%から 50%前後に上昇する。Western blot, RT-PCR においてドーパミン神経のマーカーの発現、TH, Nurr1, Ptx などの発現が確認されている。重要なことに、これらの細胞は脱分極によって培養液中にドーパミンを放出することが確認されたことである。ヒト、ラットの細胞からは 1-50 pMol/10⁶ cells, サルにおいては 1-20 pMol/10⁶ cells の放出が HPLC において確認された。またドーパミントランスポーターの発現は immunocytochemistry によって認められた。(2-1) 誘導神経前駆細胞と成熟神経細胞の脳梗塞モデルへの移植と有効性の比較検討: ラット脳梗塞モデルに両細胞を定位脳手術によって移植し(5万細胞)、細胞の生着、分化、有効性などを検討した。その結果、神経前駆細胞のほうが、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、ホスト内で突起を伸ばし、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、さらにホスト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、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が、生着の分布、生存細胞の分布や各種神経への分化の広さなどの点において、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。

特に神経前駆細胞は Notch 細胞質ドメイン導入と浮遊培養を組み合わせることで作成できるために、操作ステップが比較的少なく、実用性が見込まれる。我々は、ヒトから誘導した神経前駆細胞をヌードマウス、ヌードラット線条体へ移植し、半年の追跡を行ったが、それぞれ 100 匹ほど実施した動物の中で腫瘍形成を認めた動物はいなかった。現在、この誘導に関しては、米国 FDA へ脳梗塞患者への移植治療を申請しており、承認を得次第、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) 神経変性モデルを用いた細胞の足場の検討: (1) FGF gelatin 徐放剤のみ投与、(2) collagen sponge のみ投与、(3) 誘導神経前駆細胞のみ、(4) FGF gelatin 徐放剤+誘導神経前駆細胞、(5) collagen sponge+誘導神経前駆細胞、(6) FGF gelatin+collagen sponge+誘導神経前駆細胞、の各条件における limb placing test, beam balance test, Morris water maze test を行ったところ、(6)の FGF gelatin+collagen sponge+誘導神経前駆細胞が最も顕著な回復を認めた。この条件の動物をさらに詳細に調べると、梗塞巣の体積が他の条件に比べて優位に縮小していた。また移植した誘導神経前駆細胞ではホスト組織内で MAP-2, Neurofilament, NeuN 陽性の神経細胞として生着し、神経突起を伸ばしてい

ることが認められた。同時に FGF 徐放の効果と推定されるが、移植組織においては血管新生を多数認め、また CD31, von Willebrand factor による染色で組織の単位面積における血管の有意な増加が確認され、組織修復、移植細胞の生着などに寄与した可能性が考えられる。これらのことから、細胞を移植する場合、collagen, FGF 徐放などの細胞の支持となりうる要素の移植は有効であると考えられる。

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 で行なった。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 を作るとすると、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 を混合して叙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。Gelatin+bFGF 群 8 匹、Gelatin 群 10 匹、生食群 6 匹で行動評価を行ない、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：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。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。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}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}C -CFT の線条体結合能は 0.58 ± 0.05 であった (図 1A)。

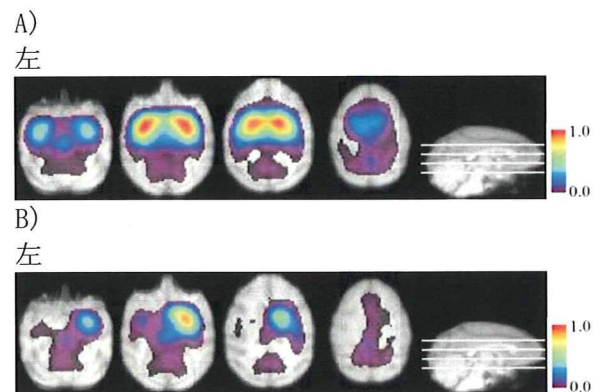


図 1. 5 頭のサル正常時の平均 ^{11}C -CFT 結合能画像 (A) とパーキンソン病モデル作成後 (MPTP 右内頸動脈内注入 3 ヶ月後) の平均 ^{11}C -CFT 結合能画像。正常時に比べパーキンソン病モデル作成後に右側線条体 (MPTP 注入側) 全体の結合能が著明に低下している。また反対側の非注入側も低下している傾向にある。解剖学的に標準化した平均 MRI 画像上に平均 CFT 結合能画像を重ねて表示した。

さらに MPTP 投与 3 ヶ月後に PET を行ったところ、 ^{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 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。

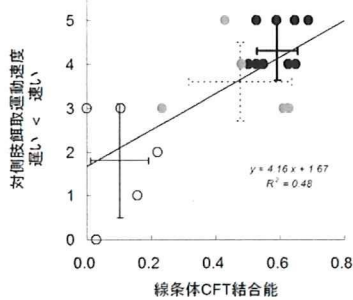


図2. PET における ^{11}C -CFT 線条体結合能と対側前肢餌取り運動速度との関係。対側肢の運動速度は、PET 解析結果を知らない観察者により6段階で評価した（5:最も速い、0:無動か非常に遅い動き）。結合能が低い場合ほど運動速度が低下し両者に相関が見られた。
●：正常時線条体の結合能とその対側運動速度(n=10)，●：MPTP 投与対側の線条体(n=5)，○：MPTP 投与側（右側）の線条体(n=5)、各群の平均値と標準偏差を十字で示す。

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、上述のリバーストランスフェクションを用いて 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。ドーパミン産生能を HPLC で確認した。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、移植半年後、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）。

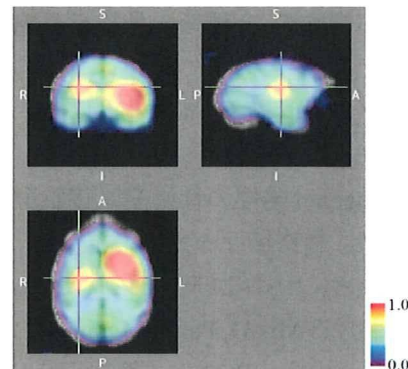


図3、パーキンソン病モデルサルでの細胞移植後（1週）の平均 ^{11}C -CFT 結合能画像。移植後に右側線条体後背側部のトランスポータ結合が上昇している。解剖学的に標準化した平均 MRI 画像上に平均 CFT 結合能画像を重ねて表示した。

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、 ^{18}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、いずれも半年経過した時点においても移植細胞の腫瘍化を疑う所見は得られなかった。

(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質細胞に 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質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。

健常犬のビーグル犬骨髄液から骨髄間質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ヶ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(後輪状披裂筋)の作成を行い、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、を検証し実験系を確立した。また、犬骨髄間質細胞からの骨格筋誘導は

全個体から確認され、特に骨格筋幹細胞のマーカーである Pax7 の陽性率は低栄養培養などのストレスをかけることによって比率を上げることができることを確認した。これらの細胞に GFP lentivirus をかけて標識し、1. 同種移植の無処理の骨髄間質細胞、2. 同種移植の誘導骨格筋、3. 自己細胞移植の無処理の骨髄間質細胞、4. 自己細胞移植の誘導骨格筋の4実験系で移植を継続している。

D. 考察

1) 達成度について

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、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。

骨髄間質細胞からの各誘導段階における神経系細胞や骨格筋細胞の評価を行い、誘導系の確立を行い、さらにそれらの細胞の有効な移

植システムの検討するために神経変性モデルとして脳梗塞モデルに移植した。その結果、細胞の足場として collagen を同時に投与することや、血管新生の促進を図ること(本実験においては bFGF の叙法を用いたが、この bFGF の場合には移植細胞の分化や生存にも影響を与えていることが想定され、必ずしも血管新生が主たる作用ではない可能性があるが)は大きな意義があると考えられる。さらに、当システムの実現化を目指して、サル、イヌなどの高等哺乳類での自己細胞移植実験は大きな意味があり、パーキンソンモデルサルにおいて C-CFT-PET でドーパミントランスポーターが移植半年においても確認されていることは非常に大きな意義がある。このシグナルは、本当にドーパミンを産生する神経細胞が存在しないと検出されないので、骨髄間質細胞から真の意味でドーパミン神経の機能を獲得したものが誘導され、それが生着しているということを示唆しているので、本システムの有望を強く支持すると考えている。また FDG-PET による全身の癌スキャンは網羅的に調べる手段としては有効であり、この点において腫瘍形成が確認されていないということはこのシステムの安全性を担保することにつながるのではと期待される。これらの結果を持って、有効性安全性を慎重に検討し、FDA の承認を得て脳梗塞患者への移植を実現したい。

イヌの実験においては当初、筋ジストロフィー犬での移植実験を予定していたが、国立精神神経センターの方での管理・維持の問題や筋ジストロフィー犬の出産頭数の限界などがあり、プロジェクト期間内にデータを出すことが困難であると判断した。我々としては喉頭の変性モデルへの移植に急ぎ切り替えたことは現実的な判断であると考えているが、期間内に全ての実験データがそろわなかったことは残念に思っている。特に筋ジストロフィー犬などのように、国内で限定された期間で飼育繁殖が承認されている動物の場合、簡単に移植実験ができず、今回のような困難に直面することがあることを改めて認識したが、喉頭への移植はある意味で別の利点があり、移植細胞数が少

量で済むこと、機能回復が声紋検査などで定量性をもってできるなどの別の利点もある。この実験は現在も継続しており、結果をまとめて論文に発表する予定である。

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。

2) 研究成果の学術的意義について

1998 年に Pittenger らが骨髄間質細胞に骨・軟骨・脂肪に対する分化転換能があることを報告して以来、間葉系幹細胞の領域は大きく発展してきた。骨髄間質細胞はもともと骨髄中において造血系幹細胞を支持している役割を持つために多くの因子を産生するので、損傷組織などに移植すると組織保護効果があることが心筋梗塞や脊髄損傷などで示されている。しかしこれらの効果は一過性であり、変性によって失われた細胞を replace するものではない。したがって、骨髄バンクの利用など多くの利便性は備えるものの、この細胞の移植治療への本格的な推進は目的とする細胞への効率的な誘導法の確立にかかっていた。幹細胞の領域の中でも間葉系幹細胞を研究する研究者人口は多く、競争も激しい状況で、我々の一連の研究が国際的に評価されている理由の一つは、生体で機能しうる細胞を選択的に誘導するシステムを確立したことにある。特に、成体の間葉系細胞が特定の誘導操作によって胚葉を越えて選択的に神経前駆細胞やドーパミン神経に分化転換するシステム、また再生や機能改善に寄与する骨格筋幹細胞が誘導されることを示し、独創性・新規性のいずれにおいても評価を受けている。

また我々のシステムは海外の複数のラボでも再現されている。たとえばイギリス University of Manchester の Giorgio Terenghi 教授らのグループも、我々の誘導系を脂肪の間葉系幹細胞において追試し、Exp. Neurol, 2007 において発表し

ている。さらに Xu et al., BMC Neuroscience, 2008; Jiang et al., Regeneration and Transplantation, 2008 の報告も独立に発表されている。また Notch 導入による神経誘導についてもフロリダ大学の Cesario Borlongan 教授らのグループが独自に追試し、Stem Cells and Development, 2009 において発表している。

ともすると失われた細胞の供給源をどの細胞にするか、という議論に終始している現在の再生医学研究においては、移植細胞をどのように生体に投与するか、有効な組織構築につながるシステムとはどのような要素を必要とするのか、という重要な課題に関して焦点が当てられて来ない。その意味で本研究はまさにこれからの再生医学を先取りしたものであり、学術的意義はあると考えている。

3) 研究成果の行政的意義について

再生医学、ことに細胞移植の分野では ES 細胞や幹細胞におけるしのぎを削る競争が世界的な規模で繰り広げられているが、本件の骨髄間質細胞からの誘導系を産業レベルで確立することはこの分野における世界に先駆けた新規の医療技術の創出となり、高齢化に伴い増加している神経・筋肉変性疾患に対する根本的治療法開発の突破口になると思われる。また高齢化に伴い増大する変性疾患は現在有効な治療法が無い。これらの疾患における医療費の増大も大きな社会的な問題となっており、治療法の開発は保健医療に大きく貢献する。本研究により得られた成果、すなわち新たな細胞治療の方法、またそれらの有効な移植システムの検討は変性疾患患者の治療に貢献する可能性があり、厚生福祉政策に資するところが大きいと期待される。

4) その他特記すべき事項について

ヒト骨髄間質系細胞から誘導した神経前駆細胞に関しては、脳梗塞患者への移植治療を米国の食品衛生局 (FDA) に申請した。FDA では細胞移植治療のガイドラインが整備されており、ノウハウも蓄積されている。現在まで 3 回の IND meeting を行い、承認に向けた折衝の最終段階に至っている。承認されれば Pittsburgh 大学の

脳神経外科・Douglas Kondziolka 教授との共同でヒトへの移植を行う予定となっている。

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生存・分化のため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。さらにサルのパークンソンモデル実験において、本方法を用いた自己細胞移植システムの有効性・安全性が示唆された。

F. 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.
- 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)
- 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 2 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* (26), 210-213, 2008.
- 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.
- 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 塾中征哉編集 61-4, 2009. (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. (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.* 83(1): 33-40, 2007
- 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.
- 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 (A β) 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。発生日工学・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：思わぬ発見の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
 - 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: 思わぬ発見を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 21st Chinese SCI Academic Annual Meeting & The 3rd 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.
 - 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.
- G. 知的所有権の取得状況
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び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。当該研究は、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動野領域に移植した。

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

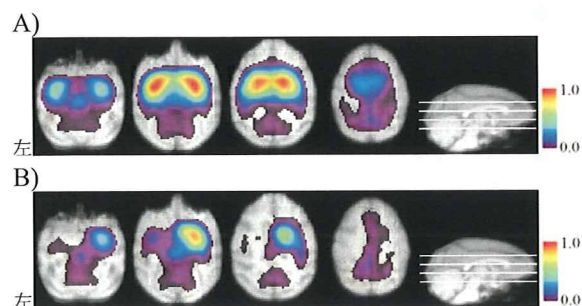


図 1. 5頭のサル正常時の平均 ¹¹C-CFT 結合能画像 (A) とパーキ

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¹¹C-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、¹¹C-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べ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¹¹C-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。

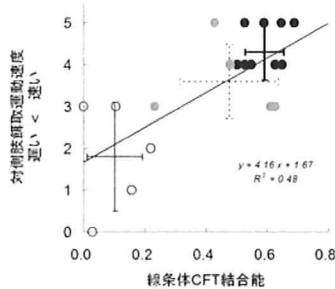


図2. PETにおける¹¹C-CFT線条体結合能と対側前肢餌取り運動速度との関係。対側肢の運動速度は、PET解析結果を知らない観察者により6段階で評価した(5:最も速い、0:無動か非常に遅い動き)。結合能が低い場合ほど運動速度が低下し両者に相関が見られた。●: 正常時線条体の結合能とその対側運動速度(n=10), ●: MPTP投与対側の線条体(n=5), ○: MPTP投与側(右側)の線条体(n=5)、各群の平均値と標準偏差を十字で示す。

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)。

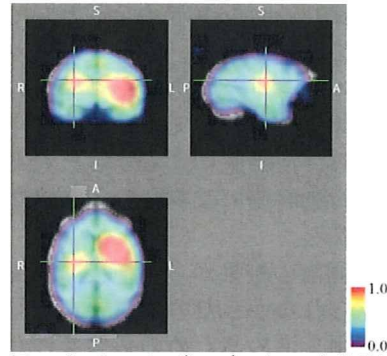


図3.パーキンソン病モデルサルの細胞移植後(1週)の平均¹¹C-CFT結合能画像。移植後に右側線条体背側後部のトランスポータ結合が上昇している。解剖学的に標準化した平均MRI画像上に平均CFT結合能画像を重ねて表示した。

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、¹⁸F-FDGを用いた腫瘍性変化の同定、血中腫瘍マーカ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¹¹C-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・時間的变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

Hayashi T. [Connectivity between cortex and basal ganglia revealed by the diffusion-weighted imaging]. *Rinsho Shinkeigaku*. 2007;47(11):838-40.

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*. 2007;52(7):1893-908.

Shimamura M, Sato N, Sata M, Kurinami H, Takeuchi D, Wakayama K, et al. Delayed Postischemic Treatment With Fluvastatin Improved Cognitive Impairment After Stroke in Rats. *Stroke*. 2007;38(12):3251-8.

Iida H, Eberl S, Kim KM, Tamura Y, Ono Y, Nakazawa M, et al. 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*. 2008;35(5):896-905.

Sato H, Enmi J, Teramoto N, Hayashi T, Yamamoto A, Tsuji T, et al. Comparison of Gd-DTPA-induced signal enhancements in rat brain C6 glioma among different pulse sequences in 3-Tesla magnetic resonance imaging. *Acta Radiol*. 2008;49(2):172-9.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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* [Internet]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20153320

林 拓也. 拡散強調画像に基づいた大脳皮質線条体の神経線維連絡. *クリニカルニューロサイエンス (Clinical Neuroscience)*. 2007;25(1).

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. In: *循環器病研究の進歩*. 東京: 協和企画; 2008. p. 79-86.

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.

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.

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.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし