

図2 橋 (pons) を参照領域にした際の小脳における[11C]BF-227の Standardized uptake value ratio (SUVRp). GSS 患者様の小脳において明らかに[11C]BF-227の集積が増加していた。この所見はこれまで知られているGSSの病理像(小脳にアミロイド班が蓄積する)に一致している (Okamura et al.: Eur J Nuc Med. 2009 (accepted))

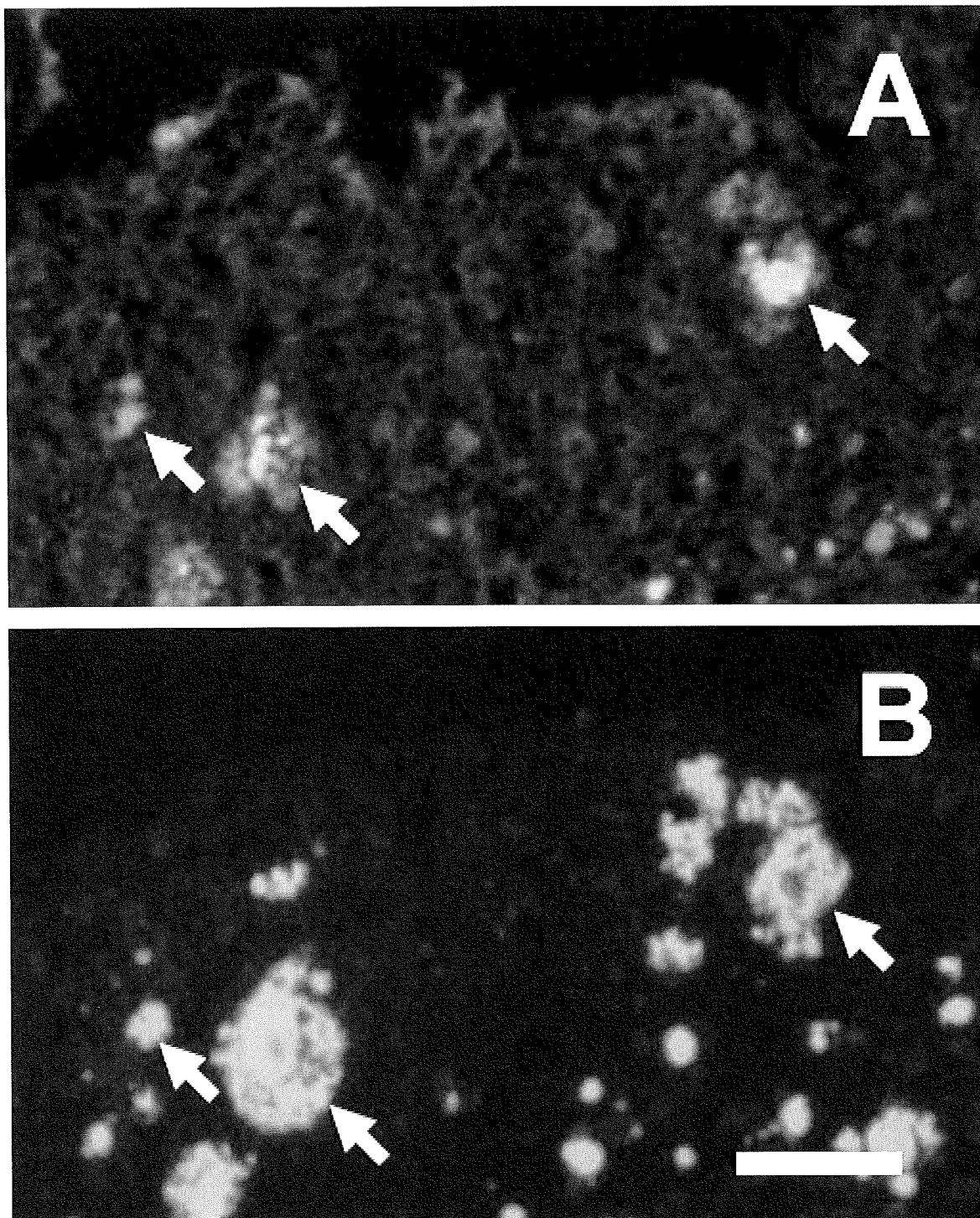


図 3. GSS 患者様小脳標本における BF-227 染色 (A) および抗プリオン蛋白抗体 (B) 染色 (Okamura et al.: Eur J Nuc Med. 2009 (accepted)) Bar=50 μ m

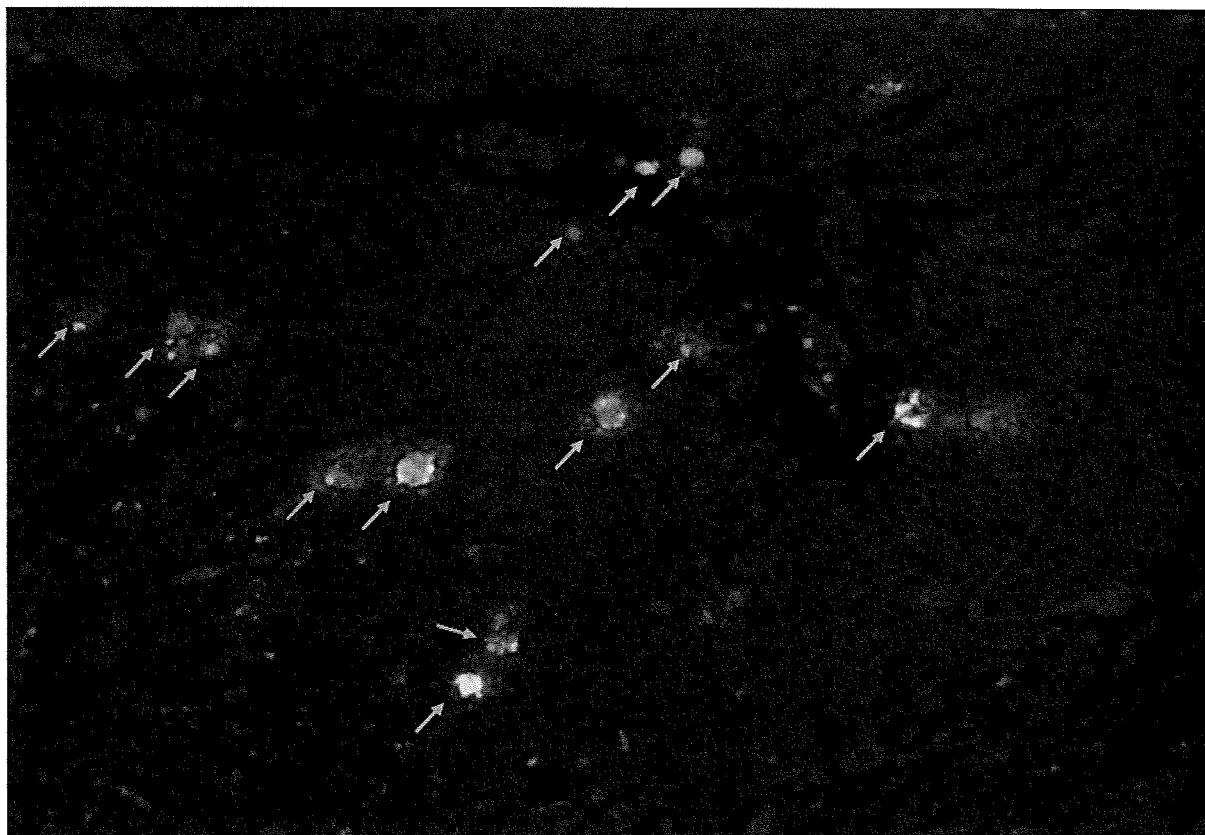


図 4. GSS 患者様小脳切片における FACT の染色像

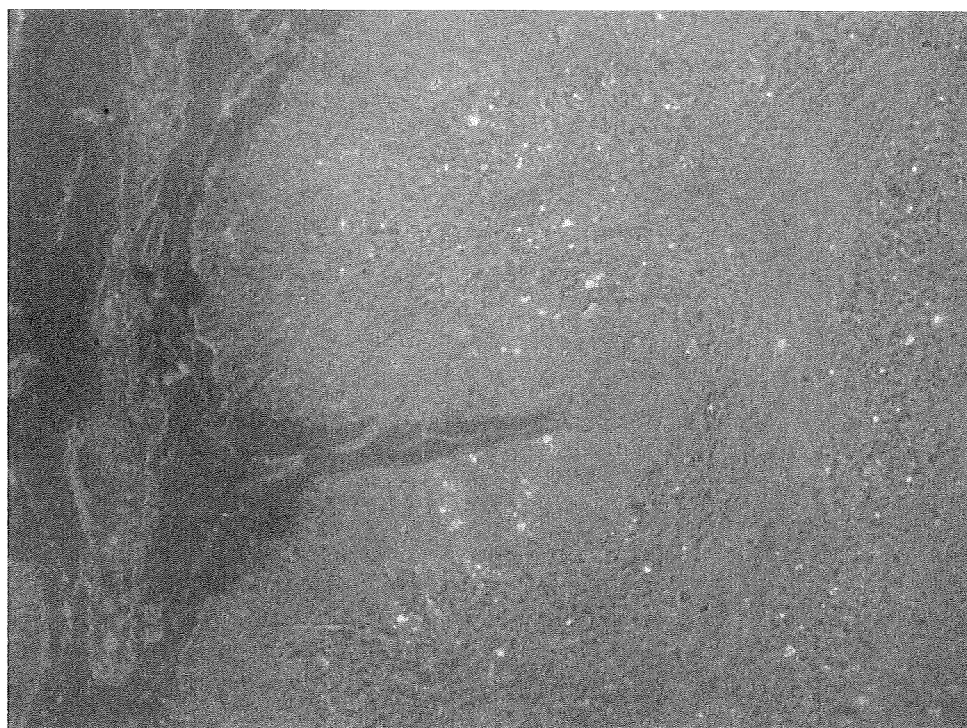


図 5. GSS 患者様小脳切片における THK-265 の染色像(疑似カラーなし)
(フィルターEx:590-650nm, Em:662.5-737.5nm)

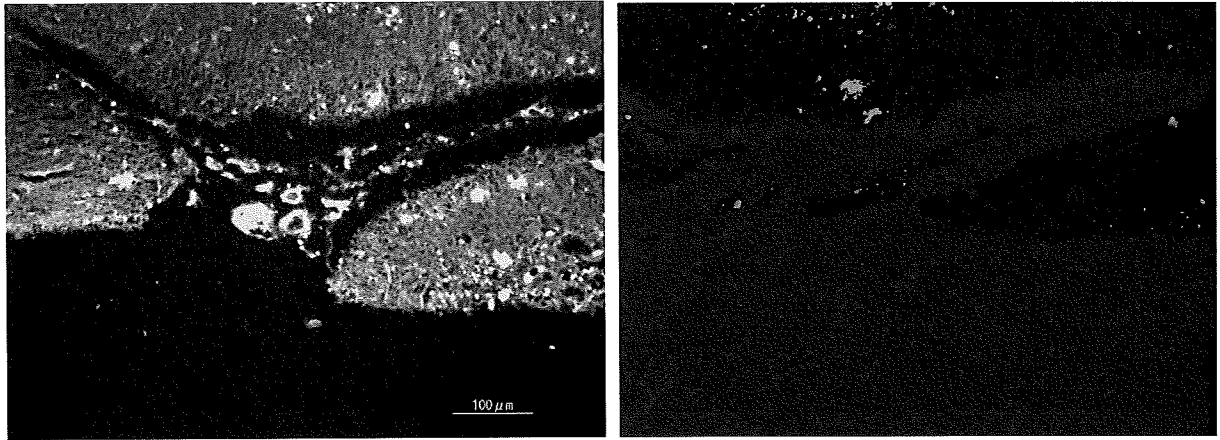


図 6. GSS 患者小脳切片における BF-227 (左) および THK-8XY (右、疑似カラー付き、フィルター : Ex 635-675nm, Em 696-736nm) の染色像

プリオン病に対する体内埋め込み型微量注入器具を用いたペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法に関する研究

研究分担者：坪井義夫 福岡大学医学部神経内科学教室・准教授
研究協力者：山田達夫 福岡大学医学部神経内科学教室・教授

研究要旨

プリオン病に対する有効な治療薬はなく、その開発が期待される。ペントサンポリサルフェートの脳室内持続投与は、2003年に英国で、はじめて臨床応用が行われ、本邦でも2004年11月から、2007年3月までに11例に対して同治療が行われた。病型は孤発性CJD6例、硬膜移植後医原性CJDが2例、家族性CJD（GSS1例を含む）が3例であった。治療開始からの平均生存期間は25ヶ月で5例が2年以上の生存が得られた。しかし治療前のmodified Rankin Scaleは2-5で、現在は全例5-6と症状の進行がみられた。周術期において問題は生じなかったが、手術後3ヶ月以降にさまざまな程度の硬膜下水腫が認められた。PPSに関連したと思われる血液データ（血算、生化学、凝固能）の異常は認められなかった。PPS脳室内持続投与は、比較的安全で長期治療にも耐えうる治療法であると考えられる。

A. 研究目的

クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）に代表されるプリオン病は、その病型にかかわらず、必ず進行性、致死性の経過をたどる難病である。この疾患に対する有効な治療薬はいまだ発見されておらず、その開発が期待されている。実験的に脳内異常プリオン蛋白の蓄積を防ぐ可能性のある、薬剤の存在は知られており、そのうちペントサンポリサルフェート（PPS）はマウスを用いたプリオン蛋白感染実験において、脳室内持続投与により発症遅延効果が確認された薬物である。PPSは血液脳関門を通過せず、脳室内に直接投与する必要がある。本研究では、体内埋め込み型微量注入器具を用いた

PPS脳室内投与療法のプロトコール確立と、プリオン病患者に対する同治療の安全性と患者の生命予後改善への効果を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

PPS脳室内持続投与法のプロトコールの概略を述べる。プリオン病の診断は、WHOの診断基準に従った。体内埋め込み型微量注入器具（Archimedes®20 ml reservoir, Flow rate 0.5 ml/24h, Codman Inc., Germany）および脳室内カテーテルの留置手術は福岡大学脳神経外科にて行われた。PPS脳室内投与用の製剤化と、PPS髄液中濃度測定は福岡大学薬学部疾患管理学教室で行われた。薬剤効果の評価はADL、神経学的所見、画像所見および脳は所見にて原則的に福岡大学病院にて行われ、その後、紹介病院にて、その後の経過観察を行った。PPS投与は低濃度で開始し、その後、漸増し維持量に到達させる。最終維持濃度は120µg/kg/dayとして、4週間毎に腹部皮下の微量注入器具中に、経皮的に薬液を交換充填した。（倫理面への配慮）

本研究の対象患者および患者家族に対して十分に説明を行い、理解を得た上で文書による同意が得られた患者にのみ本

治療研究は実施された。本治療研究に対して同意を得る場合は人権保護の立場から慎重に検討し、安全の確保に充分配慮し、対象患者のプライバシー保護には十全の配慮を行われた。同意が得られない場合でも何ら差別なく疾患に対して必要な治療を行うことを原則とし、患者の個人情報については慎重に対応した。

C. 研究結果

これまでに 11 例のプリオン病患者に対して施行された (表)。この 11 例において、治療前後の神経学的評価、日常生活動作、同治療に関連した可能性のある副作用を検討した。病型は孤発性 CJD 6 例、硬膜移植後医原性 CJD が 2 例、家族性 CJD (GSS 1 例を含む) が 3 例であった。治療開始までの経過は平均 6.7 ヶ月

(3-20) で治療後生存期間は平均 25.3 ヶ月 (4-53 ヶ月) でこの期間中に 8 例が死亡し現在 3 例が治療継続中である。治療前の modified Rankin Scale は平均 3.5 (2-5) で、現在は平均 5.7 (5-6) で全例に症状の進行がみられた。8 例の死亡例の分析では、治療から平均 23 ヶ月 (4-53) ヶ月であった。5 例は剖検が得られて、病理学的解析中である。副作用に関して、周術期において問題は生じなかったが、手術後 3 ヶ月以降にさまざまな程度の硬膜下水腫が全例に認められた。1 例に死亡直前の脳室内出血が見られ、その他 3 例に少量の脳質ないあるいは硬膜下水腫内の出血がみられた。腫瘍攣発作が 1 例において認められ、PPS に関連したと思われる血液データ (血算、生化学、凝固能) の異常は認められなかった。

D. 考察

プリオン病に対する PPS 脳室内持続投与療法は、機能的な改善は示さないものの、生命予後の改善を示す可能性が示唆された。英国で同治療を受けた変異型 CJD の生存期間は、その平均をはるかに上回っているという報告もある。我々の

検討でも、病型のより治療開始後 2 年以上の長期生存例も存在した。また同時に、剖検例における、異常プリオン蛋白の蓄積が抑制されている可能性も示唆されている。副作用で全例に硬膜下水腫がみられたが、症状に影響を与えるものではなかった。それ以外は、PPS による血液学的影響は認められておらず、比較的安全で長期治療にも耐えうる治療法であることも確認された。

E. 結論

プリオン病治療法の開発において、PPS 脳室内持続投与法は脳血液関門を通過しない薬剤の中枢内への投与方法として比較的安全で、有用であることが確認された。プリオン病に対する臨床効果として機能的改善が得られず、根治的治療にはなりえないが患者の生存期間の延長や剖検例における、異常プリオン蛋白の蓄積が抑制に関して、同治療がプリオン病理影響を与えている証拠が得られたはじめての研究である。

F. 健康危機情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Terada T, Tsuboi Y, Obi T, Doh-ura K, Murayama S, Kitamoto T, Yamada T, Mizoguchi K: Less protease-resistant PrP in a patient with sporadic CJD treated with intraventricular pentosan polysulphate. *Acta Neurol Scand.* 121(2):127-30, 2010

Tsuboi Y, Doh-Ura K, Yamada T. Continuous intraventricular infusion of pentosan polysulfate: clinical trial against prion diseases. *Neuropathology.* 29(5):632-6, 2009

2. 学会発表

尾畑十善、坪井義夫、井上展聡、馬場康彦、山田達夫. 左手失行と半側空間無視を呈した一側性 Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD) の 1 例. 第 185 回日本神経学会九州地方会. 福岡大学医学部.
2009, 3. 28

石原健司、菊池雷太、山崎貴博、杉江正行、河村 満、坪井義夫、佐々木健介、中野今治. 人工硬膜移植 25 年後に発症しペントサン硫酸治療を受けた C J D 剖検例. 第 50 回日本神経病理学会総会. 高松. 2009, 6. 4-6

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

プリオン病治療過程における蛋白重合度変化と病態への関与の解析

研究分担者：佐々木健介 九州大学大学院医学研究院神経病理学分野・助教

研究要旨

プリオン病治療薬のスクリーニングにあたって、従来指標とされてきたプロテアーゼ抵抗性異常プリオン蛋白の形成抑制に加えて、薬剤投与が培養細胞系のプリオン蛋白重合度変化にどれだけ関与しうるか検討した。プリオン持続感染細胞株の ScN2a 細胞と F3 細胞にペントサンポリ硫酸あるいはアミロイド親和性化合物である Congo red、FSB を投与したところ、プロテアーゼ抵抗性異常プリオン蛋白が減少するのにはほぼ並行して、プリオン蛋白オリゴマーが減少しており、両者の減少効果が得られることが確認された。また、比較的 low molecular weight のオリゴマーの抑制は薬剤の種類によって反応性が異なり、治療効果のより正確な判定には蛋白重合度の変化を含めた複合的な検討が重要であることが示唆された。

A. 研究目的

プリオン持続感染細胞株にペントサンポリ硫酸 (PPS) およびアミロイド親和性化合物を治療薬として投与して、プロテアーゼ抵抗性異常プリオン蛋白 (PrP^{res}) の形成抑制と蛋白重合度変化との間で乖離がないか検討する。薬剤の種類によって治療反応性に違いがないか検討して、その作用機序を考察する。

B. 研究方法

マウス神経芽腫細胞 N2a にスクレイピー由来の RML 株を持続感染させた ScN2a 細胞と、N2a#58 に Fukuoka-1 株を持続感染させた F3 細胞に投与した治療薬の効果を判定した。プリオン病治療薬として PPS のほか、アミロイド親和性化合物である Congo red、fluorostyrylbenzene (FSB)、オートファジーを誘導して異常プリオン蛋白 (PrP^{Sc}) のクリアランスを高めることが期待される塩化リチウム (LiCl) を種々の濃度で投与した。効果の判定には、従来の指標である PrP^{res} の検出に加えて、遠心カラム (CHROMA SPINTE-200、Clontech 社) を用いたゲル濾過サイズ分画法により蛋白重合度の変化を

検討した。

(倫理面への配慮)

特記すべきことはない。

C. 研究結果

まず、プリオン持続感染細胞株におけるプリオン蛋白重合度を本手法により解析したところ、非感染細胞に比べ顕著に高分子の PrP オリゴマーが増加していることが確認された。また、今回 LiCl 投与では十分な治療効果が確認できなかったが、その他の薬剤は全て一定の PrP^{res} 抑制作用を示した。

これらの薬剤投与による蛋白重合度変化をみると、PrP オリゴマーの形成も抑制されることが示され、特に比較的高分子の PrP 重合体は、PrP^{res} の抑制と同様の治療反応動態を示した。一方で、数 100kDa 程度の比較的 low molecular weight のオリゴマーは、PPS 投与では薬剤濃度を高めるとその発現が減少したが、低濃度のアミロイド親和性化合物 (Congo red 等) を投与した時には、発現がかえって増加する傾向がみられた。F3 細胞を用いた実験でも同様のパターンを示した。

D. 考察

本研究で検討した薬剤のうち、PPS と アミロイド親和性化合物は、これまでの報告通りいずれも PrP^{res} 抑制効果を示し、さらに PrP^{res} の減少にほぼ並行して、PrP オリゴマーの形成を抑制し、治療効果に寄与していることが確認された。培養細胞系においても蛋白重合度解析が治療効果の判定に有用であると考えられる。一方で、分子量にして数 100kDa 程度のオリゴマーについては薬剤により治療反応性が異なる傾向が見られ、Congo red とその誘導体である FSB が同様のパターンを示したことから、アミロイド親和性化合物は、PrP が高度に重合してアミロイド線維を形成するのを防ぐが低分子オリゴマーを抑制する作用は弱いという可能性がある。

これまでプリオン病治療候補薬のスクリーニングでは、培養細胞系への薬剤投与による PrP^{res} の抑制効果を指標としてきたが、そうして確認された効果と、モデルマウスにおける治療成績に乖離が見られることがあった。そこで、PrP^{res} の抑制というこれまでの薬剤スクリーニングの指標に加えて、更に蛋白重合度のデータを組み合わせることで治療効果をより正確に判定することができる可能性がある。今回用いた LiCl は治療効果よりも細胞毒性のほうが強く、検討には適さなかったが、一旦形成された異常 PrP のクリアランスに関わるような、作用機序の異なる薬剤についても検討することで病態の解明や治療薬の作用機序の理解につなげていくことが必要であろう。

E. 結論

プリオン持続感染細胞株を用いた in vitro の系においても、遠心カラムを用いたゲル濾過サイズ分画法により蛋白重合度の変化を検討することが可能である。病態解析や治療効果の判定、治療候補薬のスクリーニングにあたっては、従来の PrP^{res} の解析だけでなく、蛋白重合度の

変化を含めた複合的解析の必要性を示した。

F. 健康危機情報

特記すべきことはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Minaki H, Sasaki K, Honda H, Iwaki T: Prion protein oligomers in Creutzfeldt-Jakob disease detected by gel-filtration centrifuge columns. *Neuropathology* 29 (5): 536-542, 2009

Sasaki K, Minaki H, Iwaki T: Development of oligomeric prion-protein aggregates in a mouse model of prion disease. *J Pathol* 219 (1): 123-130, 2009

Matsui Y, Tanizaki Y, Arima H, Yonemoto K, Doi Y, Ninomiya T, Sasaki K, Iida M, Iwaki T, Kanba S, Kiyohara Y: Incidence and survival of dementia in a general population of Japanese elderly: the Hisayama Study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80 (4): 366-370, 2009

2. 学会発表

佐々木健介、岩城徹：多彩なプリオン蛋白沈着パターンを示した MM1+2 孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病の一剖検例。第 50 回日本神経病理学会，高松，2009 年 6 月

本田裕之、皆木晴彦、柴野智子、佐々木健介、岩城徹：ペントサンポリ硫酸治療症例におけるプリオン蛋白重合度変化の解析。第 50 回日本神経病理学会，高松，2009 年 6 月

柴野智子、佐々木健介、皆木晴彦、岩城徹：プリオン持続感染細胞株におけるプリオン蛋白重合度の解析。第 50 回日本神経病理学会，高松，2009 年 6 月
松崎尊信、藤見恒平、佐々木健介、松井

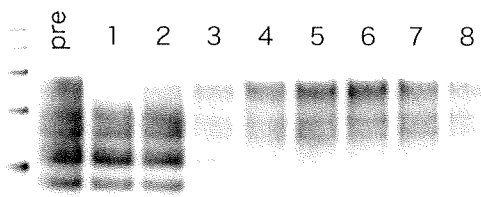
幸子、関田敦子、谷崎弓裕、鈴木諭、
清原裕、岩城徹：耐糖能異常とアルツ
ハイマー病の病理学的関連. 第50回
日本神経病理学会，高松，2009年6月

H. 知的財産権の出願・登録状況

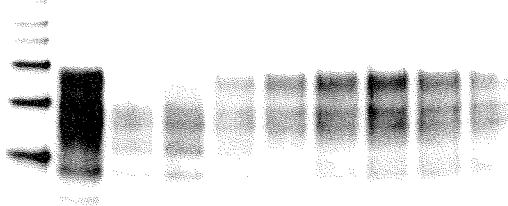
(予定も含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

A. ScN2a



B. ScN2a+PPS 4μg/ml



C. ScN2a+Congo red 40nM

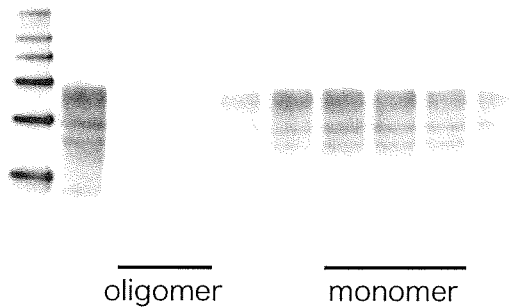


図 1：培養細胞系における PrP 重合度の治療による変化

サンプルを遠心ゲル濾過カラムでサイズ分画して、各分画中の PrP を SDS-PAGE、western blot にて検出した。プリオン持続感染細胞株である ScN2a 細胞の溶解液を検討したところ、分子サイズの大きい PrP オリゴマーが早期に溶出するため、分画 1、2 に明瞭な PrP のシグナルが検出された (A)。治療薬として PPS または Congo red を投与すると、オリゴマー分画のシグナルが減少して、治療効果が確認された (B, C)。なお、Congo red 投与では、分画 4 の比較的 low molecular weight 状態のオリゴマーがかえって増加する傾向が認められた (C)。

骨髄由来間葉系幹細胞の末梢投与によるプリオン病治療効果の検討

研究分担者：堀内 基広 北海道大学大学院獣医学研究科・プリオン病学
講座・教授
研究協力者：宋 昌鉉 北海道大学大学院獣医学研究科・プリオン病学
講座・博士研究員
大澤 夏生 北海道大学大学院獣医学部・プリオン病学講座・
学部学生

研究要旨

プリオン病治療法の確立を目的として、骨髄由来間葉系幹細胞（Bone marrow-derived Mesenchymal stem cells, MSC）のプリオン病の治療への応用について、プリオン感染マウスをモデルとして検討した。ヒト不死化 MSCs (hMSCs) を Chandler 株感染マウスの尾静脈から移植した場合、非移植対照群(147.8 ± 6.3 日)と比べて潜伏期が有意に延長した(157.8 ± 6.4 日)。hMSCs を移植したマウスでは、PrP^{Sc} の蓄積量は対照群と比較して差は認められなかったが、空胞変性は軽度であった。また、末梢から投与した hMSCs が中枢神経系組織の病変部へ移行する機構を解析するために、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)を用いて、in vitro 走化試験を実施した。その結果、プリオン感染マウス脳内で産生される CCL3、CCL5、IL-1β、TNF-αなどのケモカイン・サイトカインが HUVECs における ICAM-1 の発現を誘導することが、hMSCs の血管内皮の通過に関与することが示唆された。今後より詳細な検討は必要であるが、MSCs を用いた再生医療はプリオン病の治療に応用可能であることが示唆された。

A. 研究目的

骨髄由来間葉系幹細胞 (MSCs) を用いる再生医療・細胞治療が、プリオン病の治療法に応用可能であるかを検討するために、MSCs の末梢投与がプリオン感染マウスにおよぼす影響について検討した。また、MSCs がプリオン病病変部に走化・定着する機構についても検討した。

B. 研究方法

1. hMSCs の末梢投与

プリオン Chandler 株および Obihiro 株感染マウスを用いた。プリオン接種後 120 日 (dpi) に、ヒト不死化骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSCs) を尾静脈から投与した (1×10^6 個)。これらのマウスの経過を観察した。

2. in vitro 走化試験

血管内皮細胞のモデルとして正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) を用いた。HUVECs をインサートウエル上層で培養し、電気抵抗値 (transepithelial electrical resistance, TEER) が $220 \Omega \text{ cm}^2$ /インサート以上のものをタイトジャンクションを形成した HUVECs 単層培養と判断し、実験に用いた。HUVECs 単層培養の下層にプリオン感染マウス脳乳剤を含む培地を、上層に hMSCs を加えて、下層に走化する hMSCs をカウントした。MSCs の走化に関与する宿主側の因子を調べる場合は、脳乳剤を各種サイトカイン・ケモカインに対する抗体で前処理した。

(倫理面の配慮)

動物実験は北海道大学大学院獣医学研究科の実験動物委員会で承認された動物実験計画書 (実験番号 09-104, 09-105) に従って実施した。

C. 研究結果

1. hMSCs の末梢投与による延命効果

MSCs を低酸素濃度で前培養することで、その後の細胞の走化活性が向上することが報告されている。そこで、通常酸素濃度で前培養した hMSCs (hMSCs-normoxic) と低酸素濃度で前培養した hMSCs (hMSCs-hypoxic) を用いた。Chandler 株接種後 120 日 (120 dpi) のマウスに DMEM を尾静脈から投与した群 (陰性対照群) の平均生存期間は 147.8 ± 6.1 日であった。一方、hMSCs-normoxic 投与群は 157.8 ± 6.4 日、hMSCs-hypoxic 投与群では 157.8 ± 6.8 日であり、hMSCs 投与群で生存期間が有意に延長した。しかし、hMSCs を低酸素濃度で前培養することによる、さらなる生存期間の延長は認められなかった (図 1)。

DMEM 投与群と hMSCs 投与群の体重変化を比較したところ、134 dpi から 155 dpi の時点まで、hMSCs 投与群で有意に体重が重かった (図 1)。これらの結果から、Chandler 株感染マウスでは、末梢から投与した hMSCs が病気の進行に抑制的に働いたと考えられた。一方、120 dpi の Obihiro 株感染マウスに DMEM を尾静脈から投与した群の平均生存期間は 148.6 ± 5.3 日、hMSCs-normoxic 投与群が 152.8 ± 5.7 日、hMSCs-hypoxic 投与群が 149.7 ± 5.1 日であった。hMSCs-normoxic 投与群で僅かに潜伏期が延長する傾向が認められたが、実験群の間に有意な差は認められなかった (図 1)。また、120 dpi から病末期に至るまで DMEM 投与群と hMSCs 投与群の間で体重の変化に差は認められなかった (図 1)。従って、臨床期の Obihiro 株感染マウスに末梢から hMSCs を投与しても、明らか

な病気の進行の抑制には至らなかったと考えられた。

2. PrP^{Sc} の蓄積および神経病変

脳内 PrP^{Sc} 量および神経病変の変化を調べたところ、Chandler 株感染マウスでは、DMEM 投与群と hMSCs 投与群の病末期における PrP^{Sc} 量に差は認められなかった (図 2)。しかし、hMSCs 投与群のマウスの空胞変性領域は、DMEM 投与群と比較して、海馬で約 80%、視床で約 50%、小脳で約 35%に減少していた (図 2)。これらの結果から、Chandler 株感染マウスに投与した hMSCs は、PrP^{Sc} の産生は抑制しないが、病気の進行に伴う神経細胞の変性を抑制することが示唆された。一方、Obihiro 株感染マウスでは DMEM 投与群と比較して hMSCs 投与群で PrP^{Sc} 量に差は認められず、空胞変性にも差が認められなかった (図 2)。

3. hMSCc の走化機構の解析

HUVECs を通過する hMSCs の走化を *in vitro* 走化試験により調べた。抗 CCL3 抗体で Chandler 株感染マウス脳乳剤を前処理したところ、走化する hMSCs は陰性対照の約 74%に減少した。また、CCL5、IL-1 β 、TNF- α に対する抗体で前処理すると、走化する hMSCs はそれぞれ約 52%、69%、67%に減少した。一方、CCL4 に対する抗体では約 88%と若干の減少に留まり、CXCL10、IL-6 に対する抗体の前処理は hMSCs の走化を抑制しなかった (図 3)。これらの結果から、CCL3、CCL5、IL-1 β 、TNF- α は HUVECs を介した hMSCs の走化に関与する可能性が示唆された。*In vitro* 走化試験中の TEER の変化について調べたところ、TEER の変化は 10%以内に留まっていたことから、走化試験中にタイトジャンクションの大きな破綻はないと考えられた (結果は示さず)。

次に、マウス脳乳剤で刺激した HUVECs に発現する接着分子について調べた。HUVECs では、若干の ICAM-1 の発現が認められるが、VCAM-1 および

P-selectin の発現は殆ど認められなかった。非感染マウス脳乳剤で刺激した HUVECs では、未処理ものと比較して、若干 ICAM-1 および VCAM-1 を発現する細胞が増加した。また、Chandler 株感染マウス脳乳剤で刺激した HUVECs では、ICAM-1、VCAM-1 を発現する細胞の数がさらに増加する傾向が認められた (図 4)。

HUVECs に発現する ICAM-1 および VCAM-1 が hMSCs の走化に関与するかどうかについて検討した。抗 VCAM-1 抗体、あるいは抗 P-selectin 抗体の処理では、陰性対照と比較して走化した hMSCs はほとんど変わらなかった。一方、抗 ICAM-1 抗体処理により走化した hMSCs は約 76%に減少した (図 4)。

次に、図 3 で HUVECs を介する hMSCs の走化に関与することが示唆されたケモカインおよびサイトカインが、ICAM-1 の発現誘導に関与するかどうかについて調べた。抗 CCL3 抗体、抗 CCL5 抗体、抗 IL-1 β 抗体、抗 TNF- α 抗体は、Chandler 株感染マウス脳乳剤に対する hMSCs の走化を抑制したが (図 3)、これらの抗体で前処理した Chandler 株感染マウス脳乳剤で HUVECs を刺激すると、未処理対照と比較して ICAM-1 を発現する細胞数が減少した。一方、hMSCs の走化を抑制しなかった抗 IL-6 抗体の前処理は、ICAM-1 の発現に影響しなかった (図 4)。

D. 考察

hMSCs の末梢投与により、Chandler 株感染マウスの生存期間は延長した (図 1)。hMSCs 投与群と非投与照群で PrP^{Sc} 量に差が認められないが、hMSCs 投与群で空胞変性が軽度であったことから、hMSCs はプリオンの増殖は抑制しないが、病気の進行を抑制したと考えられる。プリオン感染マウスに移植した hMSCs の一部は神経細胞様、アストロサイト様、あるいはオリゴデントロサイト様の細胞に分化するが、神経系の細胞に分化する

hMSCs の割合は低いことから、神経系の細胞へ分化することが生存期間の延長につながった可能性は低いと考えられる。一方、プリオン感染マウスに hMSCs を移植後 3 週間までは、BDNF や NGF など神経栄養因子の産生は徐々に増加することから、各種栄養因子の持続的な産生が神経保護作用を発揮して神経変性の進行が抑制された結果、生存期間が延長したのかもしれない。

Obihiro 株感染マウスに hMSCs を末梢から投与した場合は、normoxic 投与群で僅かに生存期間が延長する傾向が認められたものの、群全体では有意な延命効果は認められなかった (図 1)。Obihiro 株は Chandler 株と比較すると、hMSCs を投与した 120 dpi の時点では PrP^{Sc} 量および神経病変は軽度であるが、120 dpi 以降に PrP^{Sc} は急速に増加し、末期では Chandler 株よりも多くなること、空胞変性、ミクログリアおよびアストロサイトの増生などの神経病変も顕著になる (未発表)。つまり、Chandler 株感染マウスと比較して、Obihiro 株感染マウスでは、感染後期にあたる 120 dpi あたりから病態が急速に増悪する。このため、Obihiro 株感染マウスでは hMSCs の効果が十分に発揮されず、有意な生存期間の延長には至らなかった可能性がある。

末梢から移植した MSC は、BBB を通過して脳実質に移行すると考えられるが、MSCs が BBB および血管内皮を通過する機構は殆ど知られていない。そこで、HUVECs を血管内皮細胞のモデルとして、MSC が血管内皮細胞を通過する機構について検討した。CCL3、CCL5、あるいは IL-1 β のように、プリオン感染マウス脳で発現が上昇するサイトカイン・ケモカインが血管内皮細胞を刺激して ICAM-1 などの接着分子の発現を誘導する結果、hMSCs の走化効率を高める可能性が示唆された。本研究では HUVECs を血管内皮細胞のモデルとして用いたが、BBB は血管内皮細胞の周囲をアストロ

サイトおよび周皮細胞が取り囲んだ構造をしていることから、BBBの通過機構を詳細を解析するためには、より脳に存在するBBBに構造・機能的に近いin vitroモデル系を用いる必要がある。

E. 結論

hMSCsを投与したChandler株感染マウスでは未処置対照群と比較して有意に生存期間が延長した。hMSCsを投与したマウスのPrP^{Sc}量は未処置対照群のマウスと差は認められなかったが、神経細胞および神経網の空胞変性が軽度になった。また、プリオン感染マウス脳乳剤中に存在するCCL3、CCL5、IL-1 β 、およびTNF- α などのサイトカイン・ケモカインが血管内皮細胞でのICAM-1などの接着分子の発現を誘導することが、末梢から投与されたhMSCsの血管内皮の通過に関与することが示唆された。これらの結果は、再生・細胞医療をプリオン病の治療に応用する上で、重要な基礎知見になると思われる。

F. 健康危機情報

本研究の実施に起因する、健康上の問題を生じた事例は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Shindoh R, Kim C-L, Song C-H, Hasebe R, Horiuchi M. : The region approximately between amino acids 81 and 137 of proteinase K-resistant PrP^{Sc} is critical for the infectivity of the Chandler prion strain. . J Virol, 83:3852-3860, 2009.

Song C-H, Honmou O, Nakamura K, Hamada H, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. : Effect of transplantation of immortalized human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prions J Virol, 83: 5918-5927, 2009.

Horiuchi M, Karino A, Furuoka H, Ishiguro N, Kimura K, Shinagawa M. : Generation of monoclonal antibody that distinguishes PrP^{Sc} from PrP^C and neutralizes prion infectivity. Virology, 394: 200-207, 2009

Nakamitsu S, Kurokawa A, Yamasaki T, Uryu M, Hasebe R, Horiuchi M. : Cell-density dependent increase of the amount of protease-resistant PrP in prion-infected Neuro2a mouse neuroblastoma cells. J Gen Virol, in press

2. 学会発表

Song C-H, Honmou O, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Identification of chemotactic factors for migration of mesenchymal stem cell to brain lesions of mice infected with prions. Prion2009, Porto Carras, Greece, Sept. 23-25, 2009.

Yamasaki T, Nakamitsu S, Suzuki A, Horiuchi M. : Recycling of PrP^{Sc} via retrograde transport pathway from endosome to TGN in Neuro2a mouse neuroblastoma cells. Prion2009, Porto Carras, Greece, Sept. 23-25, 2009.

Sakata H, Horiuchi M, Kinjo M. : Characterization of soluble oligomers of prion protein by fluorescence correlation spectroscopy. Prion2009, Porto Carras, Greece, Sept. 23-25, 2009.

Horiuchi, M. : Intracellular localization of abnormal isoform of prion protein. "Prion and Virus Infections" BSJ & ABA Joint

Symposium, Tokushima, Japan, Oct. 30,
2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

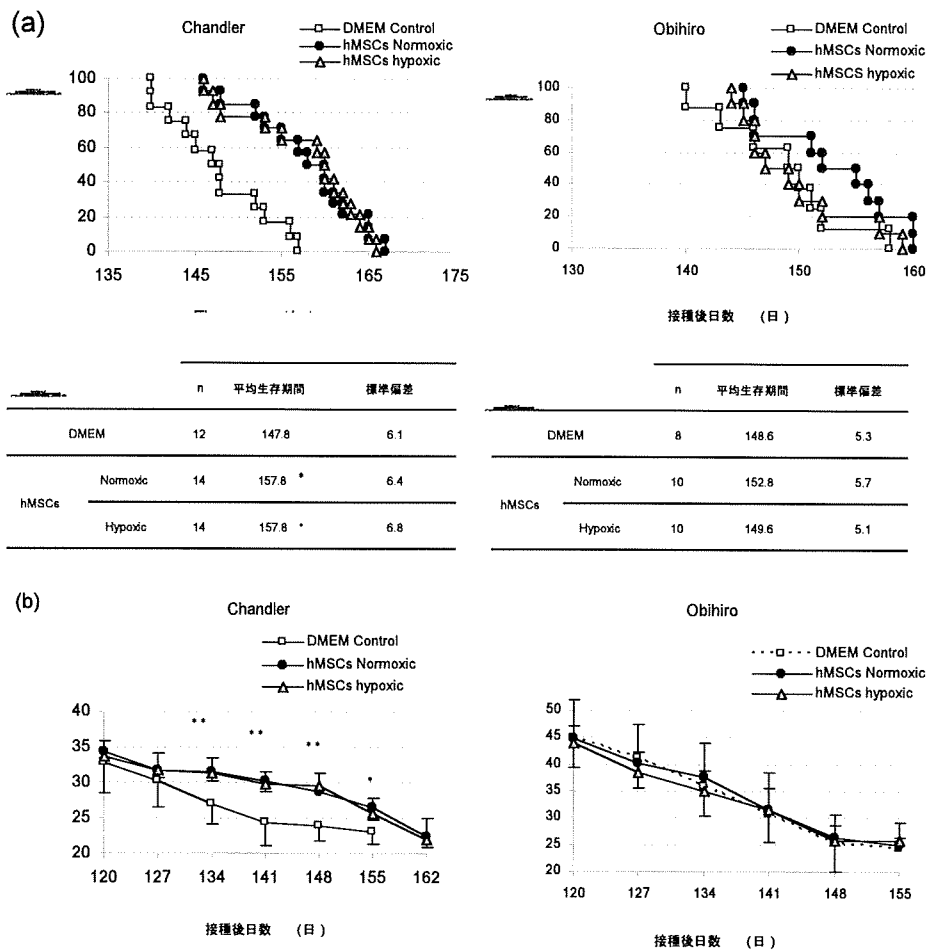


図1 hMSCsの尾静脈投与がプリオン感染マウスの生存期間に及ぼす影響

- (a) 生存曲線と生存期間。Chandler株およびObihiro株感染120 dpiのマウスに、DMEM (未処置対照) あるいはhMSCsを尾静脈から投与した。マウスの臨床症状を観察し、プリオン病末期症状を呈した日をその個体の生存期間とした。グラフの縦軸はマウスの生存率、横軸は接種後日数を示す。グラフ下の表は、実験に使用した個体数 (n)、平均生存期間、および標準偏差を示す。*, $p < 0.01$. (Studentのt検定による)
- (b) 体重変化。DMEM あるいは hMSCs を投与したマウスの体重を 120 dpi から一週間に一度測定した。DMEM 投与群と hMSCs 投与群のマウスの体重の平均値と標準偏差をグラフに示した。グラフの縦軸はマウスの体重 (g)、横軸は接種後日数 (dpi) を表す。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$. (Student の t 検定による)

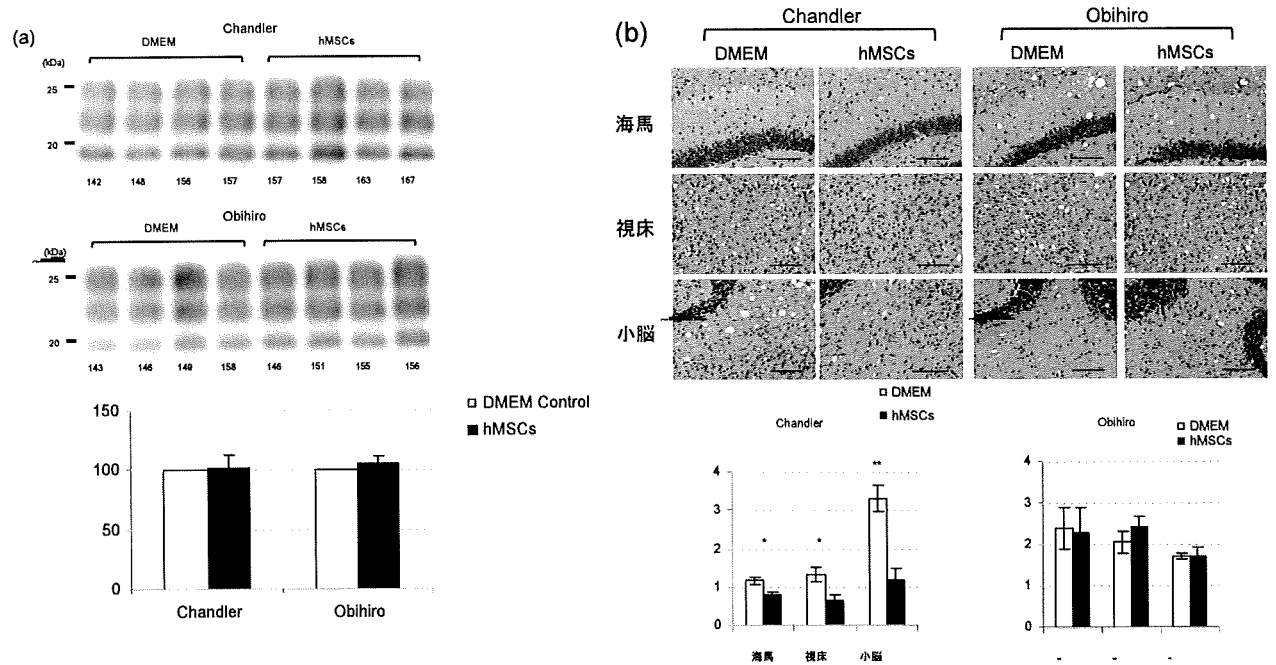


図 II-2 hMSCsの尾静脈投与がプリオン病の病態に及ぼす影響

- (a) PrP^{Sc} の検出。病末期に陥ったマウスの脳から乳剤を作製して、イムノブロット法により脳内PrP^{Sc} を定量した。Chandler株（上）、Obihiro株感染マウス（下）からのPrP^{Sc}検出の結果を示す。200 μg 組織等量を電気泳動した。DMEM、hMSCs投与群ともに4匹のマウスを用いた。各レーン下の数字はそれぞれのマウスの生存期間を示す。写真左の数字は分子量を示す。下のグラフはDMEM投与群のマウスの脳内PrP^{Sc}量の平均値を100とした場合の、hMSCs投与群のマウスのPrP^{Sc}相対量（平均値と標準偏差）を示す。
- (b) 空胞変性の解析。末期症状を呈したマウスの右脳を採材し、HE標本を作製した。DMEM投与群およびhMSCs投与群の海馬、視床、小脳について代表的な染色像を示す。図中のスケールバーは、100 μmを示す。HE標本中の空胞変性を示す領域をImage Jを用いて定量解析した。グラフは1.5 × 10⁻¹ mm² 当たり占有する空胞変性領域の面積の平均値と標準偏差を示した。DMEM、hMSCs投与群それぞれ3匹のマウスを使用した。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$. (Studentのt検定による)

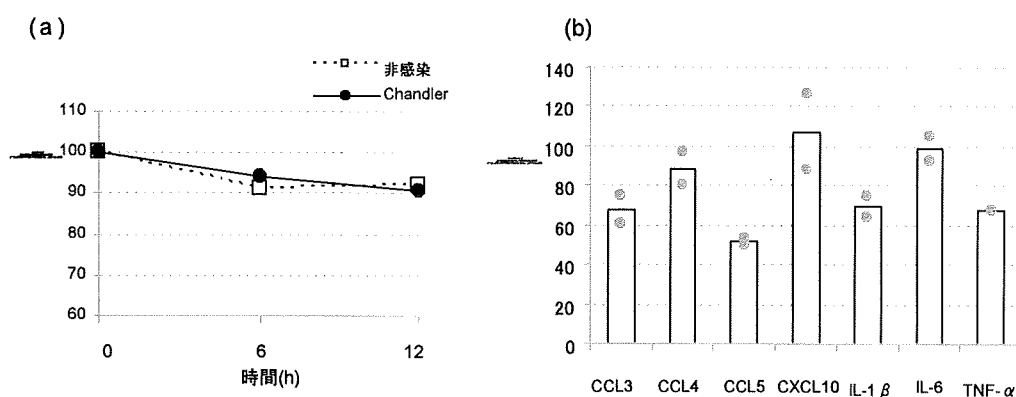


図3 HUVECsを介するhMSCsの走化に関与する宿主因子の解析

- (a) TEERの変化。走化試験開始直後(0 h)、6時間、および12時間後のTEERを測定した。試験開始直後のTEERを100%とし、時間経過に伴うTEERの変化を示した。0.1%非感染およびChandler株感染マウス脳乳剤でそれぞれ3つのインサートウェルを使用し、その平均値と標準偏差をグラフに示した。
- (b) hMSCsの走化に関与する宿主因子の解析。0.1%のChandler株マウス感染脳乳剤に抗CCL3、抗CCL4、抗CCL5、抗CXCL10、抗IL-1 β 、抗IL-6、あるいは抗TNF- α 抗体を2 μ g/mlになるように添加し、37 $^{\circ}$ Cで30分間前処理した。前処理したマウス脳乳剤をインサートウェルの下層に加え、走化したhMSCsの細胞数をImage Jを用いて定量解析した。グラフは抗体未添加のChandler株感染マウス脳乳剤(陰性対照)に対して走化したhMSCs数を100%として、抗体で前処理したChandler株感染マウス脳乳剤に対して走化したhMSCs数の相対値を示す。独立した2回の実験を行い、各々の値(赤丸)とその平均値(棒グラフ)を示した。

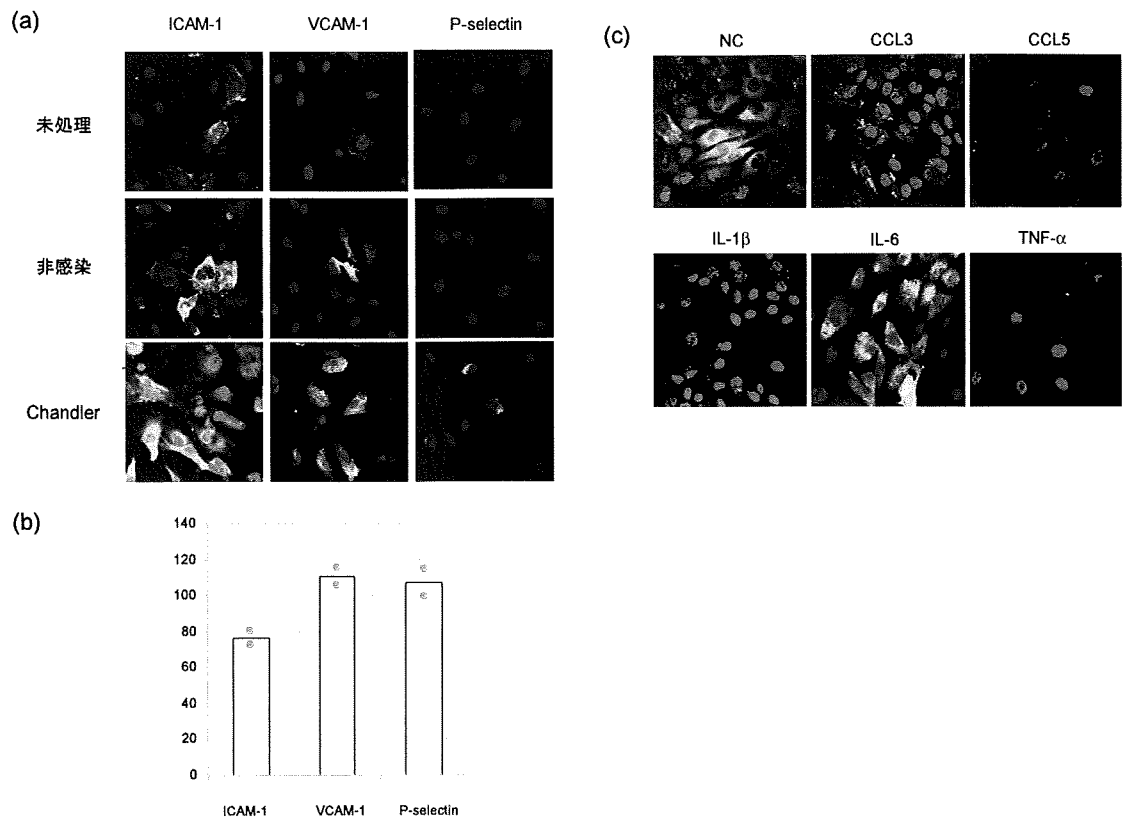


図4 hMSCsの走化に関する接着分子の解析

- (a) HUVECsにおける接着分子の発現。HUVECsを0.1%の非感染あるいはChandler株感染マウス脳乳剤を存在下で、37°C、5% CO₂、12時間培養した。その後、図に示した接着分子に対する抗体を用いてIFAを行った。上段は脳乳剤未処理、中段は非感染マウス脳乳剤、下段はChandler株感染マウス脳乳剤存在下で培養したHUVECsを示す。
- (b) 接着分子がhMSCsの走化に与える影響。抗ICAM-1、抗VCAM-1、あるいは抗P-selectin抗体存在下の0.1%Chandler株感染マウス脳乳剤に対して走化するhMSCs数を、Image Jを用いて定量解析した。グラフは抗体非存在下で走化したhMSCs数（陰性対照）を100%として、抗体存在下で走化したhMSCs数の相対値を示す。独立した2回の実験を行い、各々の値（赤丸）とその平均値（棒グラフ）を示した。
- (c) HUVECsでのICAM-1の発現誘導。抗CCL3、抗CCL5、抗IL-1β、抗IL-6、抗TNF-α抗体を2 μg/mlになるように添加した0.1%Chandler株感染マウス脳乳剤を、37°Cで30分間インキュベートした。抗体で前処理した脳乳剤をHUVECsに添加し、37°C、5% CO₂、12時間培養した。その後、HUVECsでのICAM-1の発現をIFAにより調べた。脳乳剤の前処理に用いた抗体は図上に示した。NC（陰性対照）は抗体未処理のChandler株マウス感染脳乳剤で培養したHUVECsを示す。