

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究班 分担研究報告

脊髄小脳変性症 1 型モデルマウス神経障害に対する間葉系幹細胞の治療効果

研究分担者 中村 和裕（群馬大学大学院医学系研究科神経生理学）
共同研究者 平井 宏和（群馬大学大学院医学系研究科神経生理学）

研究要旨

間葉系幹細胞は臍帯血、骨髄、脂肪等、複数の生体試料から簡単に単離できる細胞であり、脊髄小脳変性症 2 型マウス、*Lurcher* マウスなどの小脳失調モデルマウスに対して間葉系幹細胞小脳内移植の有効性が報告されている。今回我々は、脊髄小脳変性症 1 型マウスに対する間葉系幹細胞髄腔内投与の治療効果を検討することを目的とした。生後 1 か月の脊髄小脳変性症 1 型ノックインマウスおよびブルキンエ細胞特異的トランスジェニックマウスにマウス骨髄由来間葉系幹細胞を投与した結果、ノックインマウスにおいて観察される脊髄前根運動神経軸索の変性、運動神経伝導遅延が部分的に改善された。同様に、トランスジェニックマウスに見られるブルキンエ細胞の配列の乱れ、樹状突起退縮および運動失調が改善された。この改善効果は間葉系幹細胞培養上清投与でも再現されたため、間葉系幹細胞からの神経栄養因子の傍分泌が改善効果に寄与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

遺伝性脊髄小脳変性症 1 型は常染色体優性遺伝性疾患で異常伸長したポリグルタミン鎖を持つアタキシン 1 が原因蛋白である。中枢および末梢神経系の広範な領域にわたって神経細胞の変性が認められる。

脊髄小脳変性症 1 型に対する幹細胞治療研究としては、マウス脳室周囲から単離した神経幹細胞を脊髄小脳変性症 1 型トランスジェニックマウス小脳白質に移植したところ、小脳ブルキンエ細胞の形態異常および運動機能が改善されたという報告がある。

一方、間葉系幹細胞の治療効果に関し

ては脊髄小脳変性症 1 型以外の運動失調マウスにおいて調べられている。例えば脊髄小脳変性症 2 型マウスとデルタ 2 型グルタミン酸受容体に変異を持つ *Lurcher* マウスの小脳内に間葉系幹細胞を移植したところ運動機能の改善が見られた。

今回我々は、脊髄小脳変性症 1 型モデルマウスに対する間葉系幹細胞髄腔内投与の治療効果検討を行った。なぜならば、臨床応用を念頭においた時、間葉系幹細胞は臍帯血、骨髄、脂肪等、複数の生体試料から簡単に単離できるという利点を持ち、また、髄腔内注射はヒトで一般的に行われている投与経路であるからであ

る。

B. 研究方法

使用したマウスは脊髄小脳変性症 1 型のノックインマウスおよびプルキンエ細胞特異的トランスジェニックマウスである。生後 5 週令の両マウス髄腔内に骨髄から樹立された間葉系幹細胞の細胞株 KUM10 を 3 0 0 0 個投与した。

末梢神経に対する効果判定は生後 2 5 週以上のノックインマウスを用いて行った。腰髄神経細胞の髄鞘形成を myelin basic protein 抗体を使った免疫染色で解析し、運動神経伝達速度は MEB9404 Neuropack S1 により腰髄を刺激し、マウス大腿部の筋肉に記録電極を設置することにより計測した。

小脳での効果判定はトランスジェニックマウスを用いて行った。生後 1 0 - 2 0 週のマウスを使ったロータロッドテストにより協調運動機能を解析し、生後 2 1 - 2 3 週のマウスで小脳プルキンエ細胞の形態の解析を行った。形態解析はカルピンジン抗体による免疫染色および、プルキンエ細胞へのバイオサイチン注入による描出の 2 通りで行った。

また、間葉系幹細胞から放出される神経栄養因子の傍分泌による治療効果を判定するために間葉系幹細胞培養上清を 5 週令のノックインマウスに髄腔内投与し、その後、1 0 週まで週 1 回静脈注射し、ロータロッドテストおよびプルキンエ細胞の膜容量測定を行った。

C. 研究結果

ノックインマウスでは下部腰髄前根に

おいて運動神経軸索変性が見られるが、間葉系幹細胞の髄腔内投与を施されたマウスでは変性が軽減された。また、ノックインマウスで観察される腰髄刺激時の下肢筋肉収縮開始時間遅延も間葉系幹細胞の髄腔内投与により、部分的な改善を見た。

同様に、脊髄小脳変性症 1 型トランスジェニックマウスに見られるプルキンエ細胞の配列の乱れ、樹状突起退縮および運動失調が間葉系幹細胞髄腔内投与により改善された。

最後に、間葉系幹細胞培養上清をトランスジェニックマウスに投与したところ、プルキンエ細胞の膜容量が有意に上昇したことから、樹状突起退縮が抑制されたと思われる。また、ロータロッドテストの結果、協調運動機能障害が改善された。

D. 考察

間葉系幹細胞は損傷を受けた脳において複数の栄養因子を分泌し、局所の炎症の抑制、細胞死抑制、血管新生等を引き起こすことが報告されている。今回、間葉系幹細胞の髄腔内投与により、小脳プルキンエ細胞の樹状突起退縮が抑制されたこと、および、この改善効果は間葉系幹細胞培養上清髄腔内投与でも再現されたことから、間葉系幹細胞からの神経栄養因子の傍分泌が改善効果に寄与している可能性を考えている。今後、間葉系幹細胞から分泌される未知の神経栄養因子を探索する予定である。

E. 結論

間葉系幹細胞髄腔内投与は脊髄小脳変

性症1型マウスに対して治療効果をもたらした。間葉系幹細胞が分泌すると予想される神経栄養因子を探索する予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuura S, Shuvaev AN, Iizuka A, Nakamura K, Hirai H: Mesenchymal stem cells ameliorate cerebellar pathology in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 1. *Cerebellum*, in press.
- 2) Konno A, Shuvaev AN, Miyake N, Miyake K, Iizuka A, Matsuura S, Huda F, Nakamura K, Yanagi S, Shimada T, Hirai H: Mutant ataxin-3 with abnormally expanded polyglutamine chain disrupts dendritic development and metabotropic glutamate receptor signaling in mouse cerebellar Purkinje cells. *Cerebellum* 2014;13:29-41

2. 学会発表

- 1) 中村 和裕, 平井 宏和: 遺伝性脊髄小脳変性症1型ノックインマウスにおける末梢神経障害. 第3回国際放射線神経生物学会, 2013年1月25 - 26日

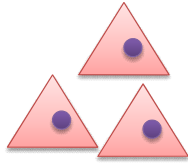
H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

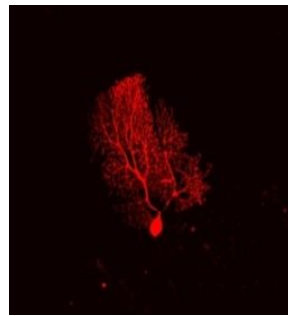
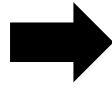
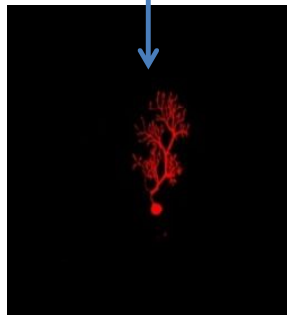
2. 実用新案登録

3. その他

間葉系幹細胞



神經營養因子



樹狀突起退縮抑制
運動機能改善