

平成 21 年度「ALS 基金」研究奨励金
研究成果報告書

筋萎縮性側索硬化症モデルマウスに対する細胞移植

— 骨髄間葉系幹細胞移植および嗅神経被覆細胞移植での解析 —

Mesenchymal stem cell and olfactory ensheathing cell
transplantation in ALS mouse models

鳥取大学医学部脳神経医科学講座脳神経内科学分野講師

渡辺 保裕

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に対する細胞移植治療の基礎的検討をおこなった。マウス第四脳室へ細胞浮遊液を直接注入する方法をもちいて、髄液流を介して脊髄および脳に移植細胞を分布させた。ALS モデルマウスへの移植を通じて以下の点を検討した。1) ALS モデルマウス由来の骨髄間葉系幹細胞 (MSC) を ALS モデルマウスに移植して、宿主と同じ遺伝的背景をもった細胞での移植効果、2) 運動神経への神経保護作用をもつグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) を遺伝改変にて導入したマウス鼻粘膜嗅神経被覆細胞 (OEC) 移植での効果 (GDNF-OEC)。最初の検討では、MSC 移植群はコントロール群と較べ機能評価や発症・生存期間に関して陽性にも陰性にも影響を及ぼさなかった。GDNF-OEC における検討で、単独での有効性が認められない OEC においても GDNF の導入することにより臨床症状の改善効果が一部有意差をもって認められた。

以上より遺伝的背景がホストと同一の症例由来の MSC, OEC あるいはその他の細胞においても、遺伝子改変を組み合わせることで細胞移植をすることで臨床症状改善が期待できる可能性があると考えられた。

はじめに

近年、再生医療に基づく神経変性疾患への治療に注目と期待が集まっている。人工多能性幹（iPS）細胞や間葉系幹細胞（MSC）は、胚性幹（ES）細胞が持つ倫理的な問題をクリアする自家移植の実現の可能性により、細胞移植治療への期待をさらに高めるものである。しかし、発生、成長の過程で神経同志、支持細胞、効果組織と密接なネットワークとして構築される神経細胞を移植により補充することは、他の組織とは異なる困難が想定されている。さらに、運動神経細胞は、大脳、脳幹、頸髄から腰髄までの広範囲な分布を示しており、筋萎縮性側索硬化症（ALS）治療を念頭とした場合は移植細胞を広くに分布させる方法も重要と考えられる。

我々はこれらの事柄を踏まえ、ALS マウスモデルでの細胞移植実験をすすめている。これまでの検討で、脊髄および脳に広範囲に細胞を分布させる方法を確立し、本手技により細胞移植をおこなった ALS モデルマウスでの臨床症状の一定の改善を認めた(1)。また、この効果は残存運動神経細胞に対する移植細胞の保護作用によると考えられた(1)。本法により、どのような種類の細胞をどの程度の量移植すれば治療効果が得られるかの判定が可能となった。

今回我々は、細胞（+遺伝子治療）を用いることでの残存運動神経細胞の栄養、保護を目的として以下の検討をおこなった。

第一に ALS モデルマウスに ALS モデルマウスから採取した MSC を移植して自家移植のシミュレートを試みた。第二に、単独では有効性のない鼻粘膜嗅神経被覆細胞 (olfactory ensheathing cell, OEC) (1)を用いてグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) を強制発現させる (GDNF-OEC) ことにより治療効果の検討をおこなった。

目的と方法

1) ALS モデルマウスからの MSC の樹立とその移植

細胞移植による治療を念頭におけば、本人の細胞を本人に移植する自家移植であることが望ましい。しかし、宿主 (ホスト) と移植片 (ドナー) が同一の場合、移植した際に遺伝的あるいは環境的に同様な背景を有するため、神経保護作用を示すかどうかは不明である。そのため ALS モデルマウスから採取した MSC を ALS モデルマウスに移植することで自家移植のシミュレーションをおこなった。MSC は当科で作製確立した DF7 トランスジェニックマウス(2)より採取した。移植のホストは G93A トランスジェニックマウスとした。移植は既報告(1)と同様の手技でおこなった (図 1)。

2) GDNF 遺伝子挿入 OEC 移植

ホストである DF7 トランスジェニックマウスと遺伝的背景が同じ C57BL/6 マウスから採取培養した OEC に GDNF 遺伝子を pLenti6/V5-D-TOPO システムをもちいて導入した (図 2).

結 果

1) ALS モデルマウス MSC 移植

ドナー細胞として DF7 マウス由来の MSC, ホストとして G93A マウスをもちい、生後 70 日齢になった時点で移植をおこなった. 移植細胞での変異 SOD1 遺伝子挿入の確認を PCR でおこなった (図 3). 細胞移植群とコントロール群の間で、体重, hind-limb reflex score に有意な差は認められなかった (図 4). かつ発症日齢, 生存期間にも差は認められなかった (図 4). このことは少なくとも遺伝的背景を有する MSC の移植をおこなっても病気には改善もみられない半面, 有害でもないことを示すと考えられた.

2) GDNF-OEC 移植

これまでの我々の検討では, OEC の移植は ALS マウスの疾患の進行に対して影響をあたえないことが示されていた (1). 今回 OEC に遺伝的に GDNF を強制発現

させる系をもちいて移植効果を検討した。GDNF-OEC 移植は体重, hind-limb score, 歩幅の平均値の何れの評価項目でもコントロールに比し有効な傾向が認められた (図 5)。18 週齢における歩幅では統計的有意差をもって改善を認めた。発症, 生存期間においても良好な傾向が得られたが統計学的な有意差には至らなかった (図 5)。

考 察

国外においては, 嗅粘膜被膜細胞(3), 造血幹細胞(4), 骨髄間葉系幹細胞(5, 6)などの細胞の投与がすでに臨床実施されている。投与経路としては脊髄実質への直接注入が主である。しかしながら現時点では投与法の安全性, 移植細胞の有効性が十分に確認されておらず, さらなる動物実験による検証が不可欠であると考えられる。

本研究は, 移植経路として髄腔内投与をおこなっている。臨床導入された場合の投与経路は腰椎穿刺を想定しており, 投与手技としてのリスクは低いと考えられる。今回はこの方法をもちいて, 以下の点を明らかにした。移植ホストと同様の遺伝的背景を有する MSC を移植すること移植手技自体を含めて疾患に対して何の影響も示さないこと。また, 本来は疾患に影響を及ぼさない移植細胞 (本検討では OEC) であっても遺伝子導入と併用することで症状の改善効果を

期待しうるということである。今回我々は、併用する遺伝子治療として運動神経保護作用が示されている栄養因子の1つである GDNF を選択し、一定の効果を
得た。GDNF の他に運動神経保護作用が示されている栄養因子として、肝細胞増殖因子（HGF）やインスリン様成長因子-1（IGF-1）等が挙げられる。栄養因子による治療の問題としては、治療に用いる大量の栄養因子の精製の問題と栄養因子を神経細胞へ到達させるという方法の2つの問題が挙げられる。栄養因子治療（遺伝子治療）と細胞移植治療との併用は、栄養因子をつくる（供給する）細胞を中枢神経に移植する治療であるので、2つの問題を解決する方法として有効であると考えられている。現時点では、細胞移植治療も栄養因子治療も単一の治療での治療では未だ不十分である可能性が高く、治療の有効性を高める上では細胞治療と遺伝子（栄養因子）治療の併用、遺伝子治療においても複数の遺伝子による治療が1つの方法であると考えられる。今後、GDNF、HGF および IGF-1 を単一の細胞に導入した上での移植の効果について検討を予定している。

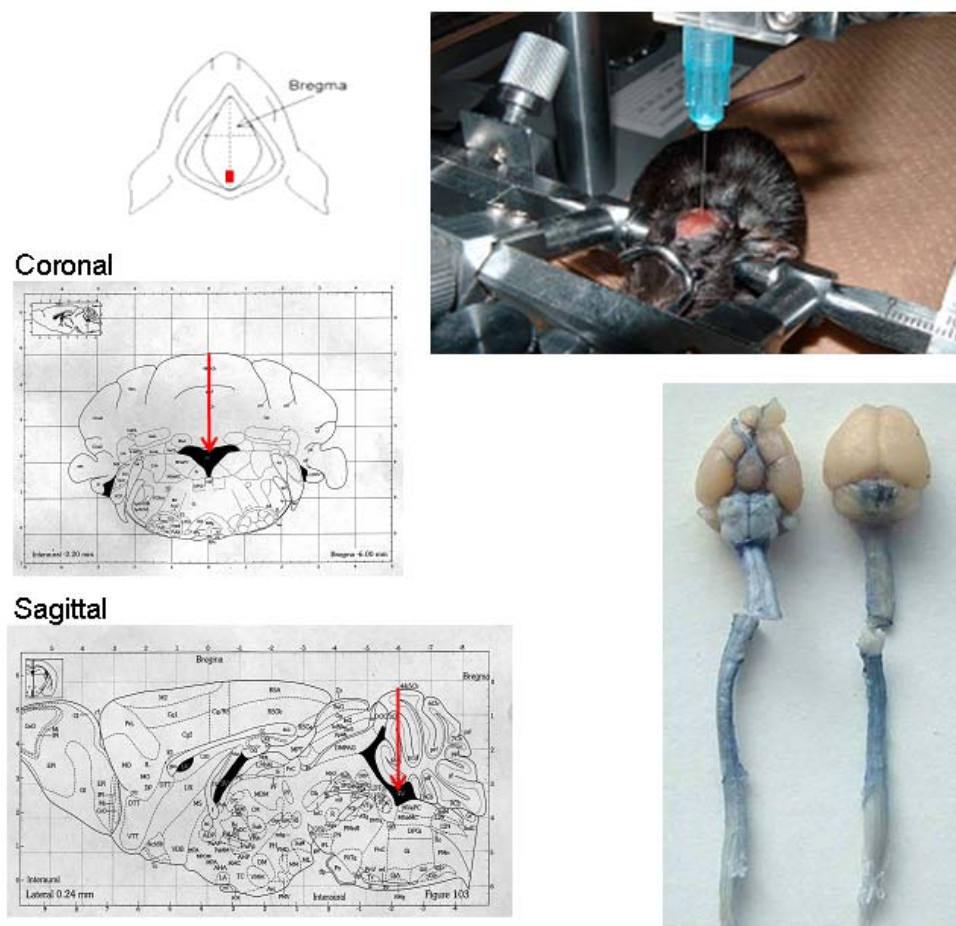
謝 辞

本研究は更なる検討を要する箇所や追加の研究を残していますが、21年度としてこの報告書の内容を実施する事ができました。奨励金は本研究の遂行のため有効に使用させていただきました。この場をおかりして深謝申し上げます。

文 献

1. Morita E, Watanabe Y, Ishimoto M, et al. A novel cell transplantation protocol and its application to an ALS mouse model. *Exp Neurol* 2008;213:431-438.
2. Watanabe Y, Yasui K, Nakano T, et al. Mouse motor neuron disease caused by truncated SOD1 with or without C-terminal modification. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;135:12-20.
3. Huang H, Chen L, Xi H, et al. Fetal olfactory ensheathing cells transplantation in amyotrophic lateral sclerosis patients: a controlled pilot study. *Clin Transplant* 2008;22:710-718.
4. Appel S, Engelhardt J, Henkel J, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 2008;71:1326-1334.
5. Mazzini L, Vercelli A, Mareschi K, Ferrero I, Testa L, Fagioli F. Mesenchymal stem cells for ALS patients. *Amyotroph Lateral Scler* 2009;10:123-124.
6. Deda H, Inci M, Kürekçi A, et al. Treatment of amyotrophic lateral sclerosis patients by autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year follow-up. *Cytotherapy* 2009;11:18-25.

図 1



脊髄移植手技

Bregma 縫合から 6mm 尾側の正中線上の頭蓋骨に約 0.5mm の穴を設け、小脳表面から 3.75mm の深さに 30 ゲージの針を挿入した。同様の方法で青色色素を注入し 3 時間後に脳脊髄を肉眼的に評価した。色素は髄液流に沿って脊髄および脳幹、脳底部への分布が確認された。

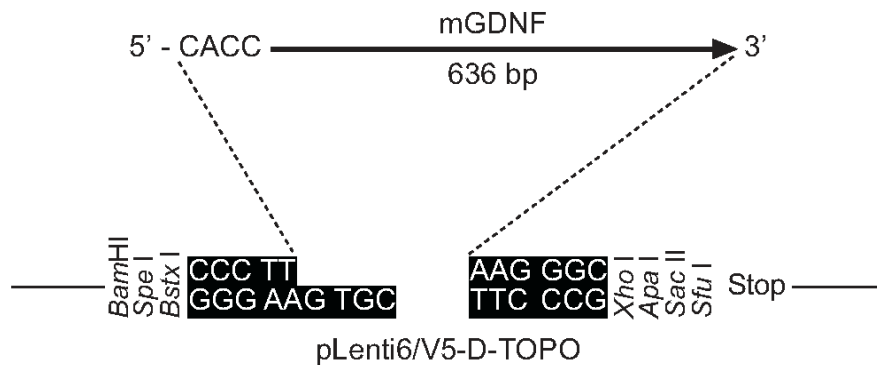
図 2

(a)

```

1   CCGCCTCCAG CGCGCCCTTG CTGCCCCGCG CGACCCAGG ATTGCGAACT
51  CTTGCCCCTG ACCTGTTGGG CGGGGCTCCG CGCTCCAGCC ATCAGCCCGG
101 ATGGGTCTCC TGGCTGGGAC TTGGGGCACC TGGAGTTAAT GTCCAACCTA
151 GGGTCTGCGG AGACCCGATC CGAGGTGCCG CCGCCGGACG GGACTTTAAG
201 ATGAAGTTAT GGGATGTCGT GGCTGTCTGC CTGGTGTCTG TCCACACCGC
251 GTCCGCCTTC CCGCTGCCCG CCGGTAAGAG GCCTCCCGAG GCGCCCCCGG
301 AAGACCGCTC CCTCGGCCGC CGCCGCGCGC CCTTCGCGCT GAGCAGTGAC
351 TCAAAATATG CAGAGGATTA TCCTGATCAG TTCGATGATG TCATGGATTT
401 TATTCAAGCC ACCATTAAAA GACTGAAAAG GTCACCAGAT AAACAAATGG
451 CAGTGCTTCC TAGAAGAGAG CGGAATCGGC AGGCTGCAGC TGCCAACCCA
501 GAGAATTCCA GAGGAAAAGG TCGGAGAGGC CAGAGGGGCA AAAACCCGGG
551 TTGTGTCTTA ACTGCAATAC ATTTAAATGT CACTGACTTG GGTCTGGGCT
601 ATGAAACCAA GGAGGAACTG ATTTTATAGT ACTGCAGCGG CTCTTGGCAT
651 GCAGCTGAGA CAACGTACGA CAAAATATTG AAAAACTTAT CCAGAAATAG
701 AAGGCTGGTG AGTGACAAAG TAGGGCAGGC ATGTTGCAGA CCCATCGCCT
751 TTGATGATGA CCTGTCGTTT TTAGATGATA ACCTGGTTTA CCATATTCTA
801 AGAAAGCATT CCGTAAAAAG GTGTGGATGT ATCTGA
  
```

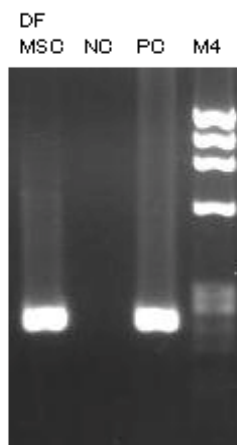
(b)



GDNF 遺伝子挿入

GDNF の翻訳領域 cDNA をトポクロニングシステムをもちいて pLenti6/V5-D-TOPO に挿入した。プロトコールに従ってレンチウイルスシステムにて細胞へ導入した。

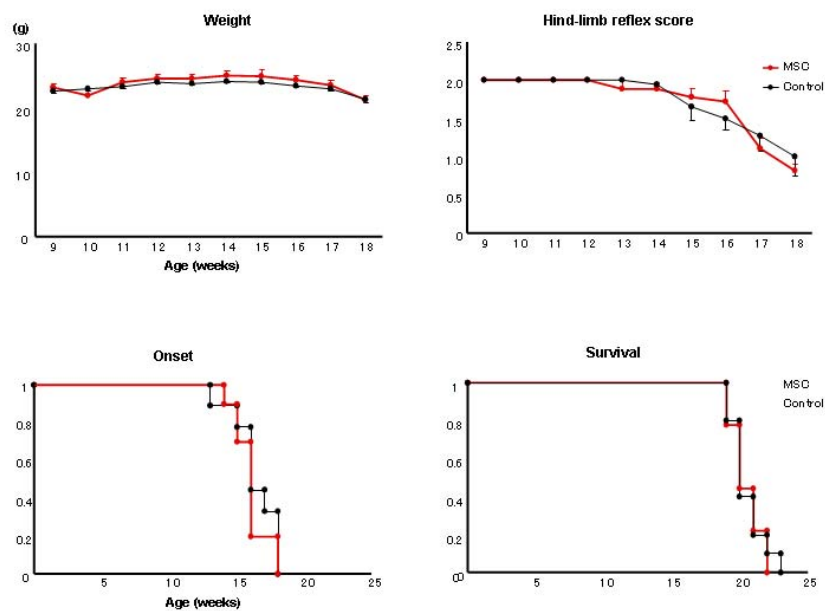
図 3



DF7 トランスジェニックマウス由来の MSC における PCR

DF7 由来 MSC の PCR 産物は陽性コントロール (PC) と同様であった。一方陰性コントロール (NC) では PCR 産物を認めていない。最右のレーン M4 は泳動マーカー: Marker 4 (ϕ X174 / Hae III digest)。

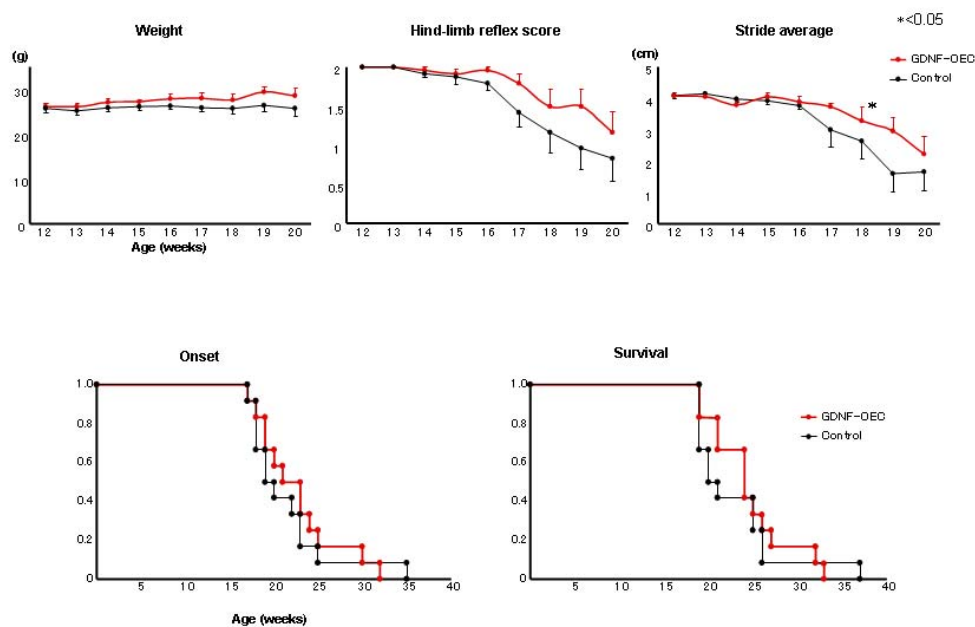
図 4



DF7 由来 MSC の移植効果

DF7 由来 MSC の G93A マウスの移植では体重, hind-limb reflex score に対照と比べ差違は認められなかった. 発症時期, 生存期間に関しても, MSC の移植はなんらの影響もあたえていないと考えられた.

図 5



GDNF-OEC の DF7 マウスへの移植効果の検討

GDNF-OEC 移植は体重, hind-limb reflex score, 歩幅の平均値いずれも有効な傾向が示された. 歩幅の平均値においては対照に比べ有意差をもって改善傾向を認めた. 発症, 生存期間においても改善傾向が認められたが統計学的な有意差には至らなかった.