

令和 3年 1月

中西 真実 学位論文審査要旨

主 査 畠 義 郎
副主査 花 島 律 子
同 香 月 康 宏

主論文

Dynamics of host and graft after cell sheet transplantation: Basic study for the application of amyotrophic lateral sclerosis

(細胞シート移植後の宿主および移植片の動態：筋萎縮性側索硬化症への応用に関する基礎研究)

(著者：中西真実、渡辺保裕、本多直人、宇根滯央、香月加奈子、香月康宏、寺島智也、
樫美和子、中島健二、花島律子)

令和元年 Brain Research DOI:10.1016/j-brainres.2019.146444

参考論文

1. Use of a human artificial chromosome for delivering trophic factors in a rodent model of amyotrophic lateral sclerosis

(ヒト人工染色体ベクターを用いた筋萎縮性側索硬化症モデルマウスへの栄養因子輸送)

(著者：渡辺保裕、香月康宏、香月加奈子、恵比木満喬、中西真実、中村和臣、
山川三穂、細川洋之、大林徹也、押村光雄、中島健二)

平成27年 Molecular Therapy- Nucleic Acids DOI:10.1038/mtna.2015.28

2. Anthocyanin suppresses the toxicity of A β deposits through diversion of molecular forms in in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease

(アントシアニンはin vivo アルツハイマー病モデルおよびin vitroにおいて分子形態

の転換によりA β 沈着毒性を抑制する)

(著者：山川三穂、内野数之、渡辺保裕、足立正、中西真実、市野光、本郷邦広、
溝端知宏、小林沙織、中島健二、河田康志)

平成28年 Nutritional Neuroscience 19巻 32頁～42頁

3. SOD1-interacting proteins: Roles of aggregation cores and protein degradation systems

(SOD1と相互作用するタンパク質：凝集コアとタンパク質分解系の役割)

(著者：宇根澁央、山川三穂、渡辺保裕、内野数之、本多直人、足立麻由香、中西真実、
梅澤明弘、河田康志、中島健二、花島律子)

令和2年 Neuroscience Research DOI:10.1016/j-neures.2020.07.010

学位論文要旨

Dynamics of host and graft after cell sheet transplantation: Basic study for the application of amyotrophic lateral sclerosis

(細胞シート移植後の宿主および移植片の動態：筋萎縮性側索硬化症への応用に関する基礎研究)

アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) といった難治性の神経変性疾患、あるいは急性期の神経損傷の治療として、神経栄養因子による細胞保護効果が注目されている。

我々はこれまでに人工染色体 (HAC) システムを用いて、神経栄養因子を高発現する間葉系幹細胞 (HAC-MSC) を樹立した。このHAC-MSCにおいてはグリア細胞由来神経栄養因子

(GDNF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、インスリン様成長因子 1 (IGF-1) の三因子がホストゲノムとは独立して高発現しており、神経栄養因子の有力なベクターとなりうる。我々はこのHAC-MSCをALSモデルマウス発症直前期 (100日齢) に脳室投与することで、寿命の有意な伸長が認められることを報告した。一方でHAC-MSCは移植後急激に減少し、移植後7日で残存細胞はほぼゼロであった。HACベクターは長期的な発現が可能であることから、HAC-MSCの脳内への生着期間を延長することで、治療効果の更なる向上が期待できると考えられた。

細胞シート法では、細胞間接着を維持したまま移植することができ、移植時の生着が優れているとされる。脳神経外科領域では、脳梗塞モデルラットへのMSC細胞シート移植治療効果が報告されている。だが神経変性疾患における報告はまだない。

本研究では、シート状に培養したHAC-MSC (HAC-MSC細胞シート) を大脳皮質へと移植し、ドナー細胞の生着期間、宿主細胞・ドナー細胞の移植後動態を詳細に調べた。またこのHAC-MSC細胞シートをALSモデルマウスへと移植することで、寿命伸長などの治療効果が見られるかどうかを検討した。

方法

移植1週間前よりマウスに免疫抑制剤を経口投与した。温度応答性細胞培養器材を用いてHAC-MSCを培養し、細胞をシート状に回収した (3×10^5 cells/sheet)。マウスの大脳皮質を外科的に露出し、細胞シート移植を行った。移植部位を人工硬膜で被覆し、頭蓋骨を還納したのち、皮膚を縫合した。

野生型マウスへ移植を行い、*in vivo* ルシフェラーゼシグナル解析を行った。あるいは移植1~7日後に脳を摘出して凍結切片を作成し、免疫組織化学染色を行った。また移植部の大脳皮質を切り出し、細胞生存シグナルのウェスタンブロット解析を行った。

ALSモデルマウス（G93A変異SOD1 Tg マウス）100日齢へ移植を行い、移植効果を発症日齢、死亡日齢、有病期間、体重変化、後肢反射について評価した。対照群にはシャム手術を行った。統計解析はカプランマイヤー法（ログランク検定）あるいはt検定を行った。

結 果

in vivoシグナル解析の結果、ルシフェラーゼシグナルは移植後7日目まで上昇し、14日目まで持続した。移植部位のウェスタンブロット解析では、Akt総量およびp-Aktの発現増加が見られた。一方、脳室投与では、ルシフェラーゼシグナルが3日目までに急激に減少した。細胞シートをALSモデルマウスに移植したところ、症状の発症が遅れ、寿命が延びる傾向が見られた。両群の生存期間の中央値を比較したところ、移植群は150日、対照群は144日であった。移植された細胞が移植後14日まで生存していることを考慮して、それぞれの生存期間中央値のカットオフ値をもとにrapid progressorsとslow progressorsとに分けたところ、生存期間は群間で有意に異なっていた（治療群 vs 対象群=145.4±1.4 vs 139.2±1.2）。組織学的には、ドナー細胞はNeuN、DCX、GFAP、Iba1陰性だった。ホスト由来のIba1陽性細胞の浸潤が見られたものの、その多くはArg1陽性だった。シャム手術群においても同様のホストマイクログリアの浸潤が見られ、手術侵襲によるものと考えられた。

考 察

本研究では細胞シート移植を用いることで、脳室投与と比べ、より長期に渡りドナー細胞を保持できることを示した。移植部位ではp-Aktの発現増加が見られ、HAC-MSCの持つ細胞保護効果のある程度反映しているものと考えられる。移植後のドナー細胞はニューロン、グリア細胞のいずれのマーカーにも陰性であり、これは我々の先行研究と合致している。移植後のMSCがどのように分化するかは様々な報告があり、移植後の微小環境に影響されると考えられる。

一方で、本研究で示されたALSモデルマウスに対する治療効果は限定的であった。これは細胞シート移植に使用した細胞数が少ないこと、細胞シートの生存期間が未だ短いことが要因として考えられる。多層構造の細胞シート移植や血管内皮前駆細胞などとの混合移植、あるいはホストマイクログリアの制御といった移植条件の最適化により、さらなる改善の可能性がある。また細胞シート移植と脳室投与は、必ずしも排他的ではなく、組み合わせによってさらなる効果が期待できる。

結 論

HAC-MSCシートの細胞保護効果は、ALSなどの慢性疾患だけでなく、脊髄損傷や虚血性脳卒中などの急性疾患にも応用できる。HACベクターに他の栄養因子やキータンパク質を導入することも可能であり、今後の発展が期待される。