

目的

致死性神経変性難病である筋萎縮性側索硬化症に対し、遺伝子改変骨髄移植療法という、新たな治療法を開発すること。

背景と意義

筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis; ALS)は主に中年以降に発症し、大脳皮質と脊髄前角の運動ニューロンが不可逆進行性に障害される致死性疾患である。患者は、進行性の全身骨格筋萎縮と脱力を自覚し、呼吸筋麻痺により通常発症後約 2-4 年で人工呼吸器なしでは生存できなくなる。ALS 発症の原因として興奮性アミノ酸による運動ニューロン死説、ミトコンドリア機能異常説、酸化ストレス説、自己免疫反応説などが想定されているが、その詳細は不明である。現在日本国内では、グルタミン酸受容体拮抗薬であるリルゾールが ALS 治療に臨床応用されているが、患者の予後及び QOL を十分に改善させるには至っておらず、新しい治療法の開発が切望されている。

中枢神経疾患である ALS 治療に於ける最大の課題の一つは、神経保護作用のある化合物や分子をいかにして中枢神経に届けるかということである。中枢神経は脳血液関門 (blood brain barrier, BBB) 並びに脊髄血液関門(blood spinal cord barrier, BSCB)によって血液循環から完全に隔離されており、BBB/BSCB を通過できるのはグルコース並びに低分子化合物のみであるため、中枢神経には経口・経静脈投与した薬剤が到達しにくい。このため、治療効果を持つ物質・分子を中枢神経系に如何に到達させるかが、重要である。

BBB/BSCB を通過するための一つの手段として、骨髄細胞を利用する方法が近年注目を浴びている。骨髄由来の単球・マクロファージは、特定の条件下で BBB/BSCB を能動的に通過することが知られているため、分泌され得る神経保護因子を、レンチウイルスベクターを用いて骨髄細胞に強制発現させ、この遺伝子改変骨髄細胞を利用して神経保護因子を中枢神経に到達させることが可能である。

方法と結果

我々はまず、新規神経保護因子である分子 X と GFP を発現するレンチウイルスベクターを作成した。この際、GFP は細胞を標識する目的で発現させるため GFP が細胞外に分泌されないよう、また、X は細胞外に分泌されて確実に治療効果が挙げられるように、両者を T2A 配列で結合して搭載したベクターを作成した (図 1)。

C57BL/6J マウスの骨髄から採取した造血幹細胞にこのレンチウイルスを感染させ、*in vitro* にて培養造血幹細胞から X が分泌されるかどうかを評価し、また GFP が細胞内に留まり続けるか評価した。この結果、ウェスタンブロットでは、GFP は主に細胞溶解物内に発現が限局している一方、X は主に細胞外の培養液中に分泌されていることが確認され (図 2)、我々が作成したレンチウイルスベクターを用いた実験系が機能することを確認した。

このレンチウイルスベクターを感染させたマウス初代造血幹細胞を、ブスルファンによって前処置した 8 週齢の C57BL/6J マウス (レシピエントマウス) に移植した。移植した骨髄細胞がレシピエントマウスに生着するまで 8 週間待ち、生着骨髄細胞が BBB/BSCB を通過して中枢神経へ移動する遊走能を *in vivo* にて評価した。具体的には、リゾホスファチジルコリン(LPC)の脊髄内直接投与による、骨髄由来単球・マクロファージの脊髄浸潤モデルを利用した (図 3)。

この結果、LPC 投与 3 日後の脊髄内において、病変部に遊走してきている単球・マクロファージのうち約半数 (45-55%) が骨髄由来 (GFP 陽性) であることが明らかとなった (図 4)。

今後の課題

これまでの我々の研究の結果、新規神経保護因子である X を発現した骨髄細胞は、単球・マクロファージの形をとり、BBB/BSCB を通過して炎症病変（LPC によって惹起される炎症病変）へ遊走することが、マウスの生体内で確認できた。ALS モデルマウスの脊髄では活発な炎症が発生していることが近年ますます明らかになっているため、今後 ALS モデルマウスにおいて同様の戦略による神経変性抑制・神経保護が可能かどうか評価する予定である。

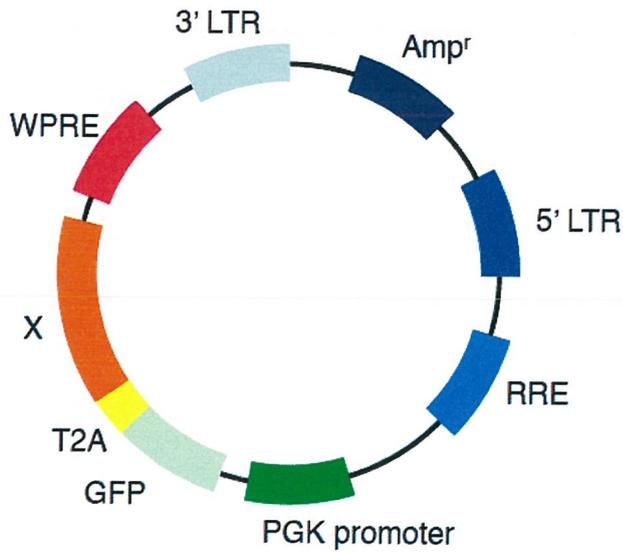


図1 XとGFPを発現するレンチウイルスベクターの配列模式図

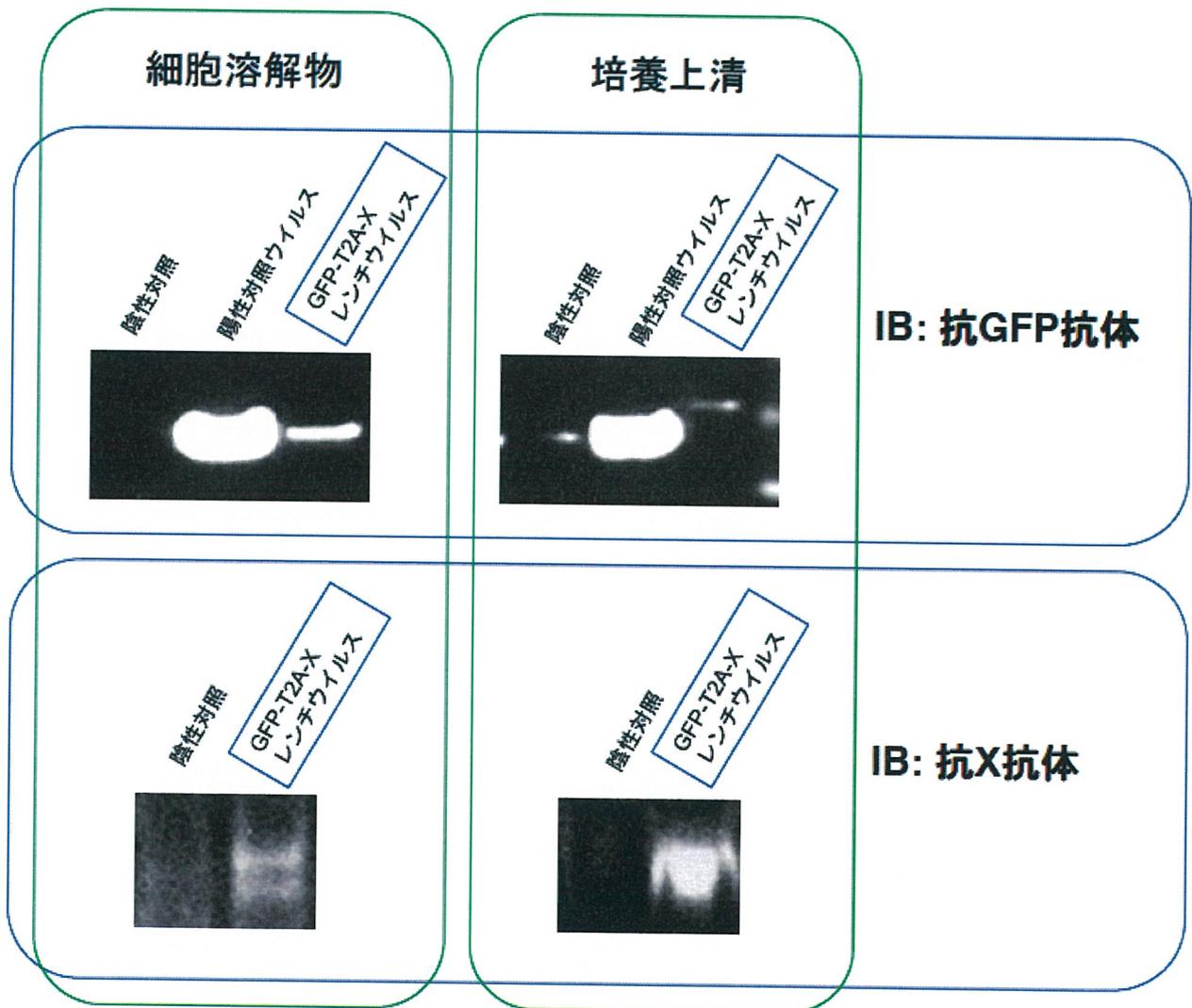


図2 GFP-T2A-X 発現レンチウイルスベクターを感染させて培養した、マウス初代培養造血幹細胞に対するウェスタンブロット

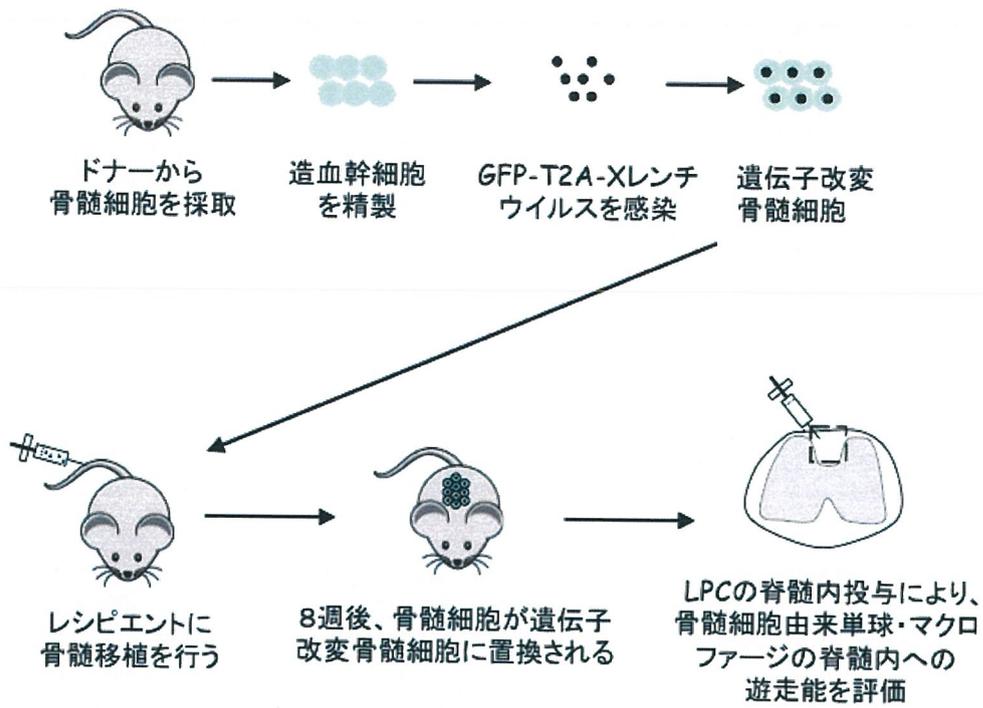


図3 マウスに対する遺伝子改変骨髄細胞移植とLPC脊髄内投与による骨髄由来単球・マクロファージ遊走能評価の模式図

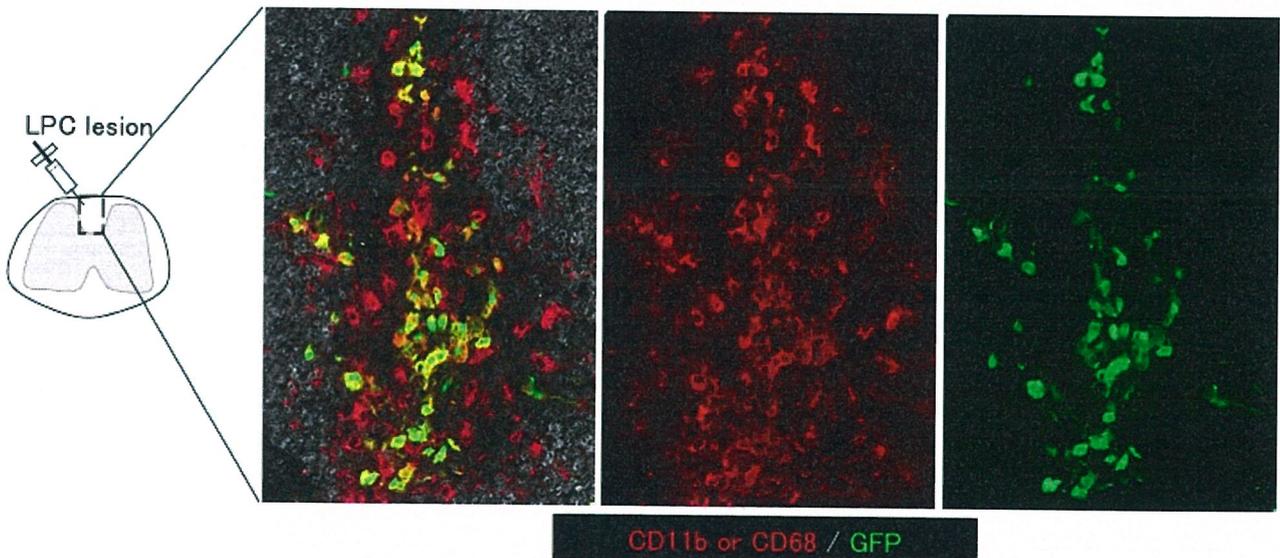


図4 LPC脊髄内投与による骨髄由来単球・マクロファージ遊走を示す免疫二重染色写真。GFP陽性細胞は、GFP-T2A-Xレンチウイルス感染骨髄由来細胞であり、CD11bとCD68は、単球・マクロファージのマーカー分子である。