パーキンソン病モデルラットの作製および細胞移植による影響

竹 原 俊 幸[1]、寺 村 岳 士[2]、桑 山 新 平[3]、伊 藤 高 恒[3]、
河 相 裕 美[3]、矢 野 史 子[3]、細 井 美 彦[3]

要　約

パーキンソン病は、脳の黒質領域のドーパミン作動性神経が変性することにより、線条体領域にドーパミンが放出されなくなることが原因として起こる神経症候群である。現在治療法として、L-DOPA などの薬剤の投与が行われているが、長期的に投与していると運動障害といった有害な副作用を引き起こすことがわかっている。そのため近年、細胞移植による治療が期待されている。

そこで本実験ではまず、ラット脳黒質内へ 6-OHDA を投与し、パーキンソン病モデルラットを作製し、マウス胚性幹細胞（ES 細胞）から神経細胞へと分化誘導した細胞を移植し、症状の改善が行われるかを検討した。

6-OHDA を投与したパーキンソン病モデルラットへアンフェタミンを投与することにより回転行動が観察された。また、このラットへ ES 細胞由来神経細胞を移植したところ 1 頭において生着が確認されたが回転行動の改善は見られなかった。これらの結果より、今回作製したパーキンソン病モデルラットは実験モデル動物として使用できると考えられる。しかし移植後回転行動の改善が見られず、生着率も低かったことから、今後、移植時において様々な細胞や成長因子などと共移植をすることによる移植細胞の生着率向上の検討を行う必要があると考えられた。

緒　言

パーキンソン病は、脳の黒質領域のドーパミン作動性神経が変性したために、線条体領域にドーパミンが放出されなくなることが原因として起こる神経の症候群である。

現在行われている治療法には、ドーパミンの前駆体である L-DOPA を投与し、不足しているドーパミンを補充する方法が主として行われているが、L-DOPA には、パーキンソン病による黒質から投射されているドーパミン神経の細胞死を抑制する効果は無く、パーキンソン病からの回復は一時的なものである。他の治療法として、ドーパミンアゴニストを投与する治療法も存在するが、これも同様に、パーキンソン病からの回復は一時的なものである。

これらの薬物は長期的に投与していると、その間にもパーキンソン病が進行し、ドーパミン神経末端での L-DOPA をドーパミンに生合成して保存する働きや、放出したドーパミンを再度取り込む機能が低下していき、最終的に薬効がなくなることが分かっている。また、前者において投与した L-DOPA がフリーラジカルを形成することにより、パーキンソン病の進行を助長させ、運動障害といった有害な副作用を引き起こすことが示唆されている。

そこで、現在治療方法としてヒト中絶胎児の中脳腹側細胞や神経細胞を患者脳の線条体領域に移植するという方法も試みられており、移植後運動病状を改善することが報告されている。しかし、移植した細胞の生着率の低さや、ドナーとなる胎児から目的とされる細胞があまり得ることが出来ず、そのため一度の手術に多くの中絶された胎児を用いる必要があり、また、胎児を用いることへの倫理的、法律的な問題と

1. 近畿大学大学院生物理工学研究科　　2. 三重大学大学院医学研究科　　3. 近畿大学生物工学部

いった多くの問題点がある。

それらの問題を解決するため、*in vitro* で ES 細胞由来神経細胞の獲得が考えられている。ES 細胞は初期胚の胚体部位（内部細胞塊；ICM）から樹立され、生殖細胞を含むほぼ全ての細胞に分化する能力を維持しながら、体外培養下で無限に増殖する細胞である。近年、上記のような性質を利用し、ある細胞系譜へ分化誘導し、移植を行うことで、病気の改善を行う再生医療が期待されている。

そこで本研究では、まず Shukla らが報告した手術方法[5]を参考とし、6-OHDA を用いたラット脳線条体破壊によるパーキンソン病モデルラットの作製を行なった。次に、マウス ES 細胞より分化誘導した神経細胞を移植することにより、症状の改善が生じるかどうかを検討した。

材料と方法

6-OHDA 投与によるパーキンソン病モデルラットの作製

供試動物は、Wistar 系雌ラット（導入体重：200g～250g）を使用した。ラットを麻酔（ネンブタール；1mℓ/1kg)、固定し、頭蓋骨左黒質領域にドリルを用いて 2 個の穴を空けた。ガイドカニューレ（12mm、エイコム）を 1 つ目の穴に挿入し、デンタルセメントで固定し、ガイドカニューレにコネクター（18mm、バイオリサーチセンター株式会社）をつけ、ガスタイトシリンジ（10μℓ、イトーマイクロシリンジ）とチューブで繋ぎ、6-OHDA 溶液を 1 つの穴に 3μℓ、1μℓ／分の流速で投与した後、5 分間静置した。次に、別の穴にガイドカニューレ（12mm、エイコム）を挿入し、デンタルセメントで固定し、コネクターをつけ、ガスタイトシリンジ（10μℓ、イトーマイクロシリンジ）とチューブで繋ぎ、6-OHDA 溶液を 2μℓ、1μℓ／分の流速で投与した後、5 分間静置した。その後、ガイドカニューレを外し、ブレグマが覆われないよう、薄くデンタルセメントを塗り、穴を塞いだ。

アンフェタミン投与による回転行動の測定

6-OHDA 投与手術から 4 週間後に D-アンフェタミンを腹腔内注射後、アクリルケース（縦 30cm× 横 30cm× 高さ 35cm）内に置き 10 分間馴致させた後、10 分間の測定を連続して 5 回、計 50 分間回転行動の有無、回転数を測定した。

ES 細胞の樹立

供試動物には、C57BL/6J 系統マウスを用いた。胚盤胞期胚を 0.5％ Pronase 添加 PBS（-）で処理し、透明帯を除去した。ES 細胞培養用培地で 5 倍に希釈した抗マウス脾臓・モルモット抗血清、ES 細胞培養用培地で 5 倍に希釈したモルモット抗血清で順次処理することにより、ICM を回収しフィーダー細胞上で ES 細胞培養液を用いて培養した。その後、培養 3-4 日目に未分化細胞を持つコロニーを確認した後、未分化細胞のみを新鮮なフィーダー細胞上に継代培養し、数日後に未分化細胞が成長しているコロニーが認められれば最初の継代培養法と同様の操作を行った。以降、継代コロニーの増殖力及び、未分化性が安定するまでは同様の操作を行い、樹立を行った。

ES 細胞への遺伝子導入

樹立された ES 細胞に電気穿孔法を用いて pEGFP-N3 vector 遺伝子導入を行った。導入方法は定法を用いて行った。その後、150μg/ml の G418 を用いて 7 日間薬剤選抜を行い、薬剤耐性コロニーのみを回収し、培養した。本実験では、GFP 蛍光 ES 細胞を移植材料とした。

ES 細胞由来神経細胞の分化誘導

ES 細胞をコンフルエントな状態まで培養後、細胞解離液を用いてフィ ES 細胞のみを回収した。bFGF 10ng/ml及びEGF 20ng/mlを添加したES細胞培養液中で浮遊培養を行い、神経細胞への分化誘導を行った。

ES 細胞由来神経細胞の移植

6-OHDA 投与によるパーキンソン病モデルラットの作製と同様の方法を用いて行った。移植細胞は、約 1 μℓ／分の流速で投与した。

ラット脳凍結切片の作製

細胞移植 2 週間後に断頭し、線条体部分の組織を回収した。その後、OCT-compaund で組織を包埋し、液体窒素下で凍結を行なった。次にクリオスタットを用いて 5 μm の厚さで凍結切片を作製し、サンプルとした。

蛍光免疫染色を用いたラット脳移植による細胞生着の確認

ラット脳凍結切片を作製後、抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行った。なお、免疫染色は定法に従って行った。

３．結　　果

本研究において、D－アンフェタミンの腹腔内注射によるアンフェタミン誘発回転行動の 6－OHDA 投与ラット細胞移植前と細胞移植後 12 週間目の回転行動数の変化を検討した。全ての PD モデルラットで、細胞移植後 12 週間目のアンフェタミン誘発回転行動数は、移植前の回転行動数よりも減少していた。また、異常行動が見られた No.9 のラットでは異常行動の改善は確認されなかった（図 1 ）。次に、免疫染色を用いて、GFP を指標として移植細胞の生着を確認した。移植細胞の生着が確認されたラットは 6 頭中 1 頭のみであった。

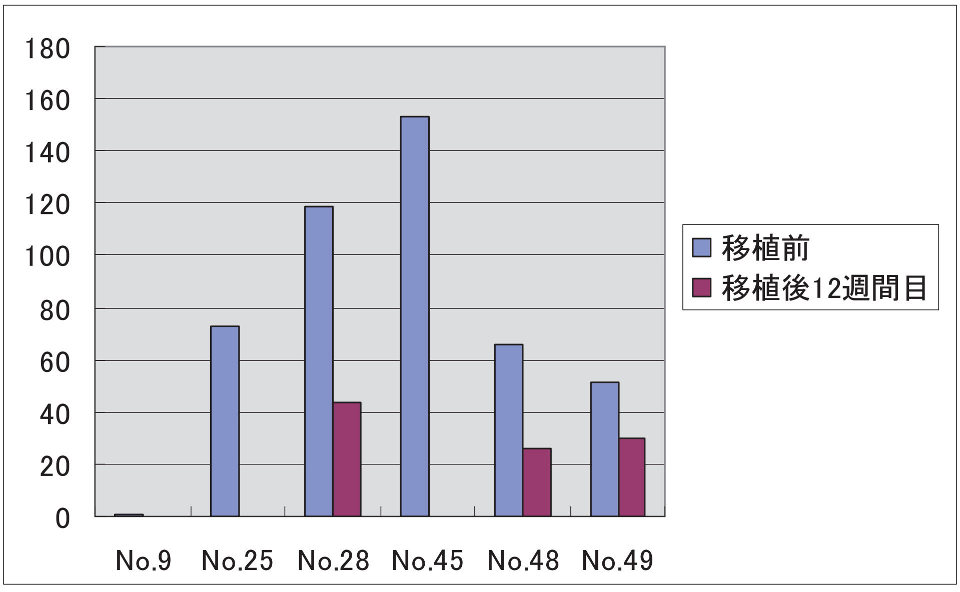
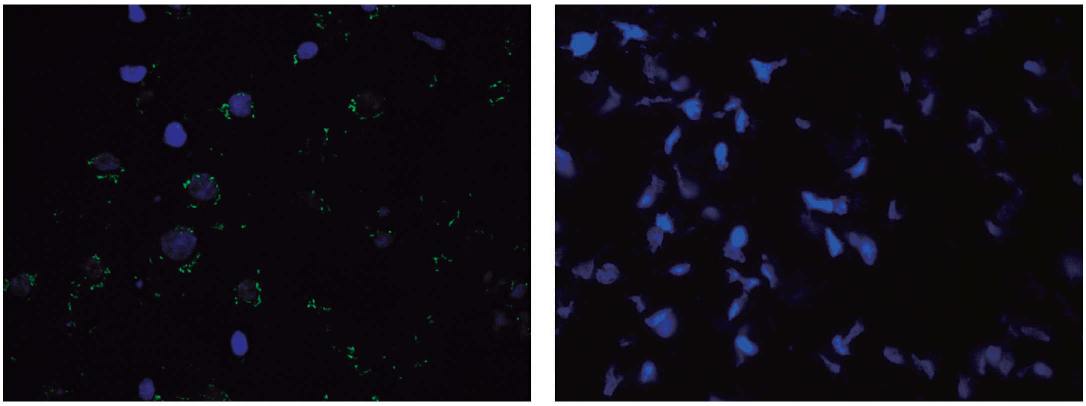


図 1 ．D－アンフェタミン投与における誘発回転行動



PD-9　　PD-28

図２．細胞移植後における細胞生着の確認

考　察

本研究結果より、ラット脳線条体に6-OHDAを投与し、D-アンフェタミン腹腔内へ投与することにより、回転行動を起こした。このことより、線条体を損傷したパーキンソン病モデルラットの作製が確認された。

次に、パーキンソン病モデルラットでのアンフェタミン誘発回転行動数は、細胞移植前の回転行動数と比較した。細胞移植後12週間目の回転行動数は減少した（図１）。しかし、回転行動以外の常行動では改善は見られなかった。また、パーキンソン病モデルラットへの細胞移植後12週間目では線条体内での生着は確認されたが、細胞の生着が確認されたのは細胞移植を行った６頭中１頭のみ（図２）であり、なおかつ異常行動の改善が見られなかった個体であった。これらの結果より、回転行動の改善が観察されたラットでは移植細胞の生着は確認されなかったことから、回転行動の改善が移植した神経細胞によるものであるかどうかは明らかではない。6-OHDA投与手術、または細胞移植手術の際に、カニューレ及び、6-OHDA、移植細胞の脳内への挿入、投与によって脳内の細胞を傷つけたことで脳内の内因性ＮＧＦが増加し、その結果もともと脳内に存在していたドーパミン産生細胞の再生が行われたことで行動改善が行われたという可能性である。以前に、腹側神経根切断を行ったラットの後根神経節では、神経栄養因子ー免疫反応性（NGF-IR）神経が増加したということが報告されている。[3] また、コリン作動性神経毒（AF64A）によるコリン作動性中隔海馬経路損傷後に、NGFタンパク質濃度の一時的な上昇が報告されている。[2] 以上のことから、外部からの異物挿入による細胞損傷に応じて脳内の内因性NGF濃度が上昇した可能性がある。また、本研究において移植細胞の生着が低率だった。これは脳内の免疫機能によって移植細胞が死滅させられている可能性があるため、今後生着率を高めるために、移植後免疫抑制剤の投与が必要かもしれない。神経栄養因子（NGF）は移植細胞の生着と増殖を促進させる効果を持つことが報告されている。特にグリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）はドーパミン神経細胞に対する強力な神経保護因子であり、投与後一定期間移植された神経細胞の生着を補助することが報告されている[7, 9]。このため、細胞移植後、神経栄養因子の移植部位への投与も検討する必要があるかもしれない。しかし、GDNFは投与後、時間経過に従って神経保護効果を減少させていくことも報告されており、GDNF投与を行うのであれば、その打開策として神経栄養因子の継続的投与も検討すべきかもしれない。また、頚動脈小体は、GDNFや脳由来神経栄養因子（BDNF）などの神経栄養因子を多く含んでいることが明らかとされており[8]、細胞の培養も容易であるため、頚動脈小体との共移植も有効ではないかと考えられる。今後、移植細胞の生着率の向上を行うことで、パーキンソン病の症状の改善が可能であるかもしれない。

参 考 文 献

1. Evans M. J. and Kaufman M. H. Estabrishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. Nature 1981;292:154-156
2. Rainer Hellweg, Heike Thomas, Astrid Arnswald, Sita Von Richthofen, Sonja Kay, Heidrun Fink, Rudolf Morgenstern, Heide Hortnagl. Serotonergic lesion of median raphe nucleus alters nerve growth factor content and vulnerability of cholinergic septohippocampal neurons in rat. Brain Research 907 (2001) 100-108
3. Koichi Obata, Hiroki Yamanaka, Yi Dai, Toshiyuki Mizushima, Tetsuo Fukuoka, Atushi Tokunaga, Hideki Yoshikawa, Koichi Nogushi. Contribution of degeneration of motor and sensory fibers to pain behavior and the changes in neurotrophic factors in rat dorsal root ganglion. Experimental Neurology 188 (2004) 149-160
4. Nosrat CA, Tomac A, Lindqvist E, Lindskog S, Humpel C, Stromberg I, Ebendal T, Hoffer BJ, Olson L. Cellular expression of GDNF mRNA suggesta multiple functions inside and outside the nervous system. Cell Tissue Res. 1996Nov;286 (2):191-207
5. Shukla S, Agrawal AK, Chaturvedi RK, Seth K, Srivastava N, Sinha C, Shukla Y, Khanna VK, Seth PK. Co-transplantation of carotid body and ventral mesencephalic cell as an alternative approach towards functional restoration in 6-hydroxydopamine-lesioned rats:implications for Parkinson`s disease. J Neurochem. 2004 oct;91 (2):274-84
6. Takahito Yoshizaki, Motoki Inaji, Hiroko Kouike, Takuya Shimazaki, Kazunobu Sawamoto, Kiyoshi Ando, Isao Date, Kazuto Kobayashi, Tetsuya Suhara, Yasuo Uchiyama, Hideyuki Okano. Isolation and transplantation of dopaminergic neurons generated from mouse embryonic stem cells. Neuroscience Letters 363 (2004):33-37
7. M Aoi, I Date, S Tomita, T Ohmoto. GDNF Induces Recovery of Nigrostriatal Dopaminergic System in the Rat Brain Following Intracerebroventricular or Intraparenchymal Administration. Acta Neurochirurgica (Wien) (2000) 142:805-810
8. A D Smith, D A Kozlowski, M C Bohn, M J Zigmond. Effect of AdGDNF on dopaminergic neurotransmission in the striatum of 6-OHDA-treated rats. Experimental Neurology 193 (2005):420-426
9. Biljana Georgievska, Thomas Carlsson, Benjamin Lacar, Christian Winkler, Deniz Kirik. Dissociation between short-term increased graft survival and long-term functional improvements in Parkinsonian rats overexpressing glial cell line-derived neurotrophic factor. Feder. European Journal of Neuroscience, Vol. 20, pp. 3121-3130, 2004
10. Nosrat CA, Tomac A, Lindqvist E, Lindskog S, Humpel C, Stromberg I, Ebendal T, Hoffer BJ, Olson L. Cellular expression of GDNF mRNA suggesta multiple functions inside and outside the nervous system. Cell Tissue Res. 1996Nov;286 (2):191-207

英 文 要 旨

Produce of Parkinson's disease model rat and influence by cell transplants

Toshiyuki Takehara[1], Takeshi Teramura[2], Shinpei Kuwayama[3], Takatsune Ito[3], Yumi Kawai[3], Fumiko Yano[3], Yoshihiko Hosoi[3]

Abstract

Parkinson's disease occurs because of a loss of dopamine in the brain. It is know that to cause the negative side-effect of motility disturbance when administering it for the long term though the medicine such as L-DOPA is being treated. Therefore, recently, it is expected that was treated with cell transplants.

Then, 6-OHDA was treated in a rat brain strium, the Parkinson's disease model rat was produced, the cell that did the nerve cell from the mouse embryonic stem cell and the differentiation inducement was transplanted, and whether the symptom was improved was examined.

The rotation action was observed by administering the amphetamine to the Parkinson's disease model rat that had treated 6-OHDA. Moreover, when the embryonic stem cell derived neuronal cell was transplanted to this rat, the improvement of the rotation action was not seen. We obtain the Parkinson's disease model rat that can use as an experiment model animal. However, it was thought that it was necessary to examine the improvement of the rate of the presence by transplanting various cells, growth factors and when transplanting it in the future because the improvement of the rotation action was not seen after it transplanted it.

1. Department of Genetic Engineering, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan
2. Graduate School of Medicine, Mie University, Tsu, Mie 514-8507, Japan
3. Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan
4. Department of Molecular Genetics, Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka, Osaka 545-8585, Japan