

デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルを用いた幹細胞の投与効果の評価

○ 上岡 雅菜，林田 尚之，長尾 知佳，崎間 恒之介，田代 貴士，守住 孝輔，西 勝英，廣中 直行

メディフォード株式会社 非臨床事業部 創薬イノベーションセンター 研究第1ユニット

目 的

筋ジストロフィー（Muscular Dystrophy）とは骨格筋の壊死・再生を主病変とする遺伝性筋疾患の総称である。

本疾患には遺伝子治療薬が開発されているが、未だ普及には至らず再生医療に期待がかかっている。

本研究では、デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウスを用いてヒト脂肪由来間葉系幹細胞およびヒト臍帯血幹細胞の治療効果を検討した。

方 法

● 使用動物

- ・C57BL/10-mdx/jcl（以下，mdx）マウス，♂，4 週齢（入荷時），日本クレア
- ・C57BL/10Sns1c（以下，B10）マウス，♂，4 週齢（入荷時），日本エスエルシー

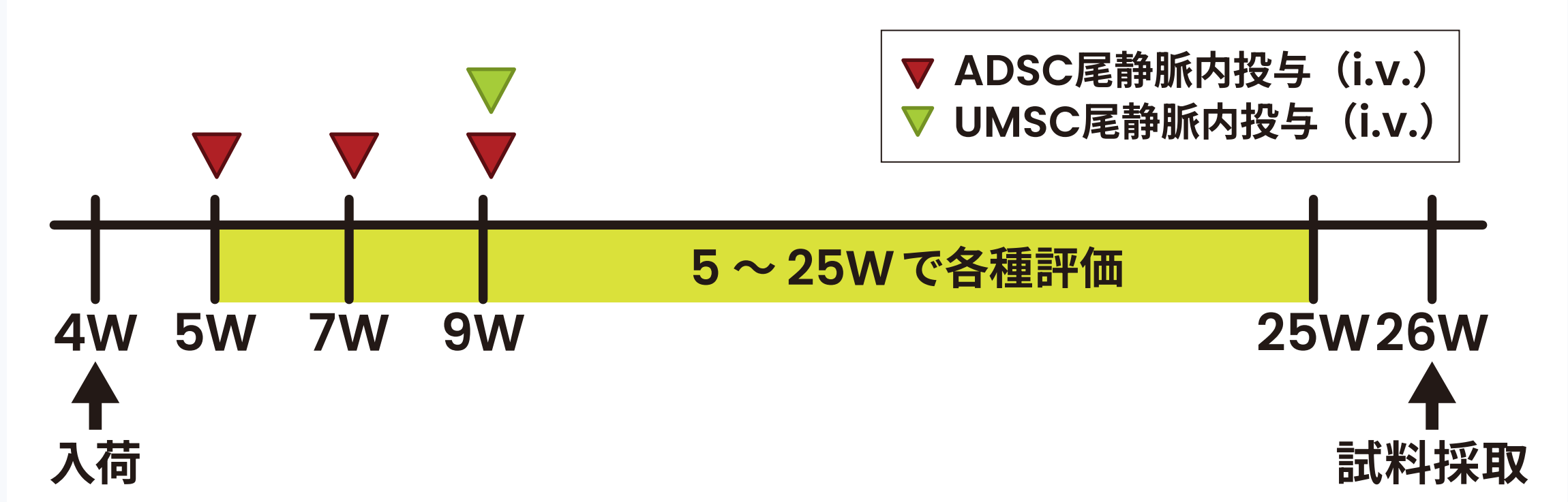
● 群構成

試験群	系統	投与物質	投与量	投与経路	例数
B10-媒体	B10	HBSS	0	i.v.	6
mdx-媒体	mdx	HBSS	0		6
mdx-脂肪由来間葉系幹細胞 単回投与		脂肪由来 間葉系幹細胞	1×10 ⁶ cells/body		5
mdx-脂肪由来間葉系幹細胞 3回投与		脂肪由来 間葉系幹細胞			5
mdx-臍帯血幹細胞 単回投与		臍帯血細胞			6

● 投与

- ・脂肪由来間葉系幹細胞（以下，ADSC），ロンザジャパンより入手
単回投与群は1×10⁶ cells/匹，5週齢時に尾静脈内投与
3回投与群は1×10⁶ cells/匹，5，7および9週齢時に尾静脈投与
B10-媒体群，mdx-媒体群には，同容量のHBSS（Hanks’ Balanced Salt Solution, Thermo Fisher Scientific K. K）を5，7および9週齢時に尾静脈投与
- ・臍帯血幹細胞（以下，UMSC），理化学研究所より入手
1×10⁶ cells/匹，9週齢時に単回尾静脈内投与

● 実験スケジュール



● 評価項目

5～25週齢で各種評価を実施した。

□ 握力測定：1回／4週の頻度で測定

握力計（デジタルフォースゲージ：FGN-2B，ニデックドライブテクノロジー株式会社）を用いて左右前肢の握力を5回測定し，その平均値を個体値とした。

□ 筋力測定：1回／4週の頻度で測定

セボフルラン吸入麻酔下で筋力測定装置（I300A，Aurora Scientific Inc.）を用いて2本の電極をマウスの左後肢の腓腹筋の皮内に刺し，最大筋力を測定した。

□ 加速式ロータロッド：1回／4週の頻度で測定

加速式ロータロッド（MK-660C/CMP，室町機械株式会社）を用いてロッド上の滞在時間を測定した。

初回測定時の測定前に10 rpmの条件で60秒間ロッド上に滞在させ，装置への馴化とした。測定は初速10 rpm，300秒後に40 rpmに到達する条件でロッド上の滞在時間を測定した。

□ CatWalk：25週齢時に測定

歩行解析装置（CatWalk™ XT，Noldus Information Technology BV.）を用いて測定した。

□ 尿中バイオマーカー（タイチン：Titin）の測定：

5，9，13および25週齢時の検体を測定

Mouse Titin N Fragment Assay Kit IBL（株式会社免疫生物研究所）を用いてn=1で測定した。

□ 血液生化学検査（クレアチンキナーゼ：CK）：26週齢時に測定

2～4%セボフルラン吸入麻酔下で血清を採取し，自動分析装置7180（株式会社日立製作所）を用いて測定した。

□ 腓腹筋，ヒラメ筋，前脛骨筋および横隔膜重量：試料採取時に測定

□ 病理組織学的検査

2～4%セボフルラン吸入麻酔下で放血し，腓腹筋，ヒラメ筋を採取した。

採取後の筋肉組織について，ジストロフィン免疫染色標本を用いてジストロフィン陽性率を算出した。

使用抗体：ジストロフィン免疫染色（Anti Dystrophin antibody）
画像解析装置：HALO（Indica Labs Inc.）

ま と め

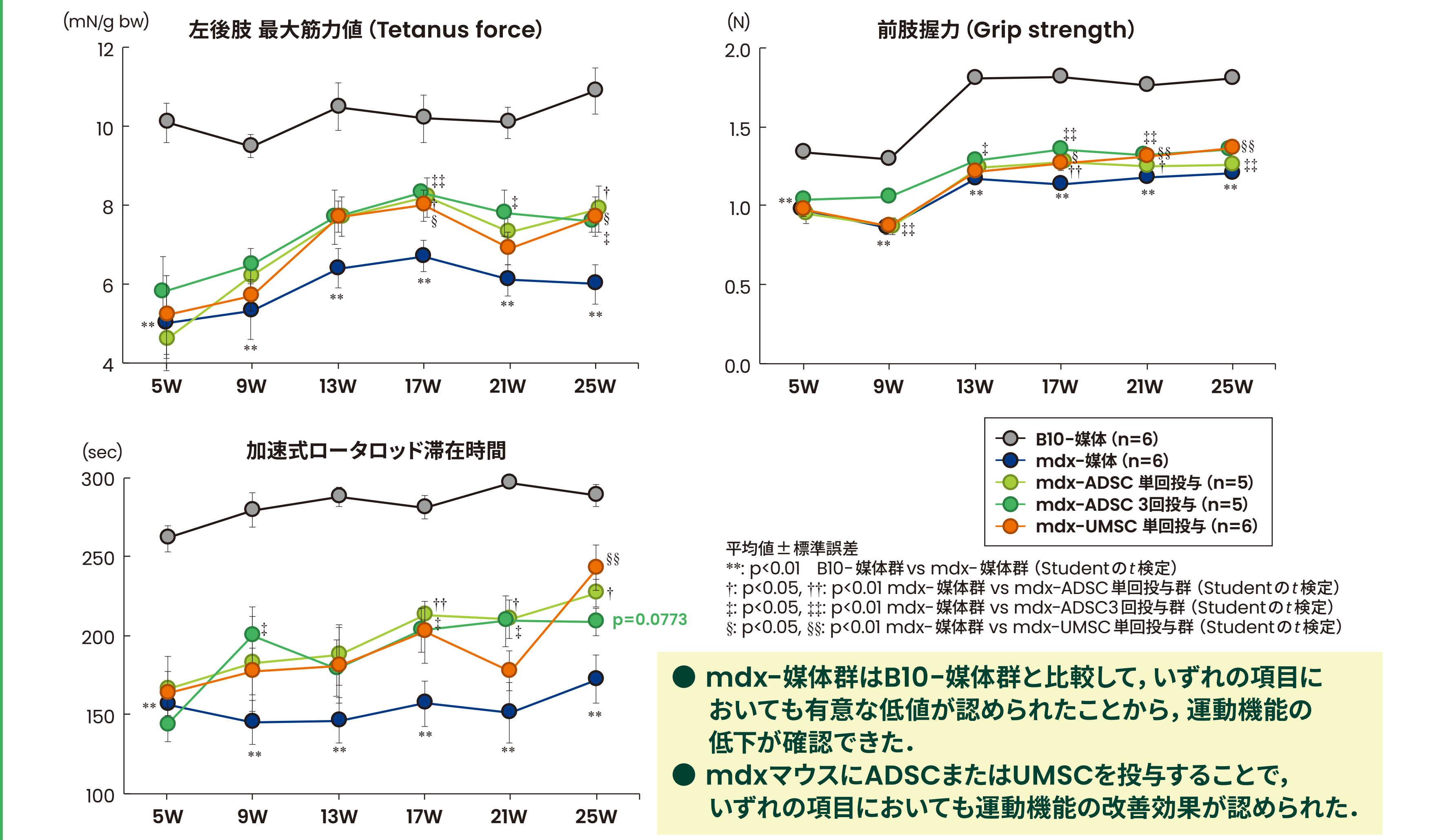
- mdxマウスはB-10マウスと比較して運動機能の低下，血中CKや尿中Titinの上昇などが確認され，ジストロフィン陽性率の減少も認められたため筋ジストロフィーモデルとして有用であることが示唆された。

- ADSCまたはUMSCの投与により，運動機能低下の改善や尿中titinの上昇を有意に抑制したことから，細胞投与の有効性が示唆された。一方で，血中CKの上昇を抑制する効果やジストロフィン陽性率の増加作用は認められなかったことから，投与量や投与タイミングを今後検討していく必要がある。

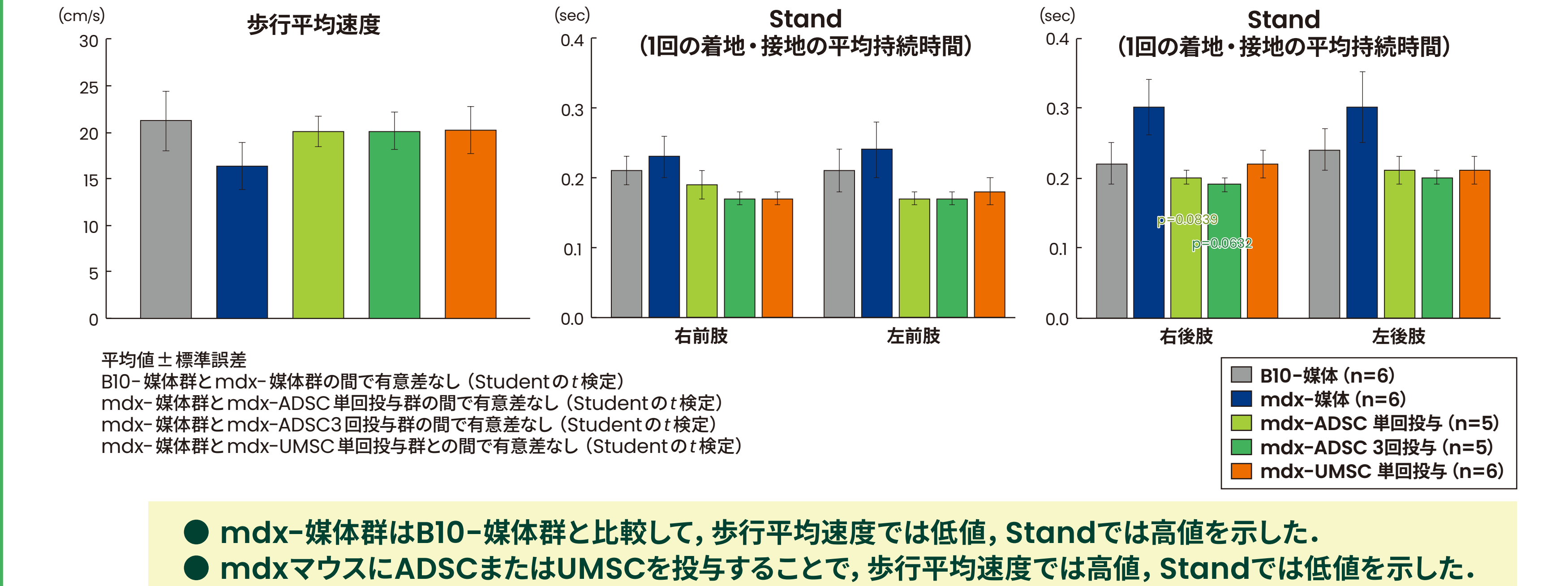
以上の結果から，筋ジストロフィーモデルを用いた実験系の有用性を示すことができたため，本評価系は本疾患の再生医療研究に有用であることが示唆された。

結 果

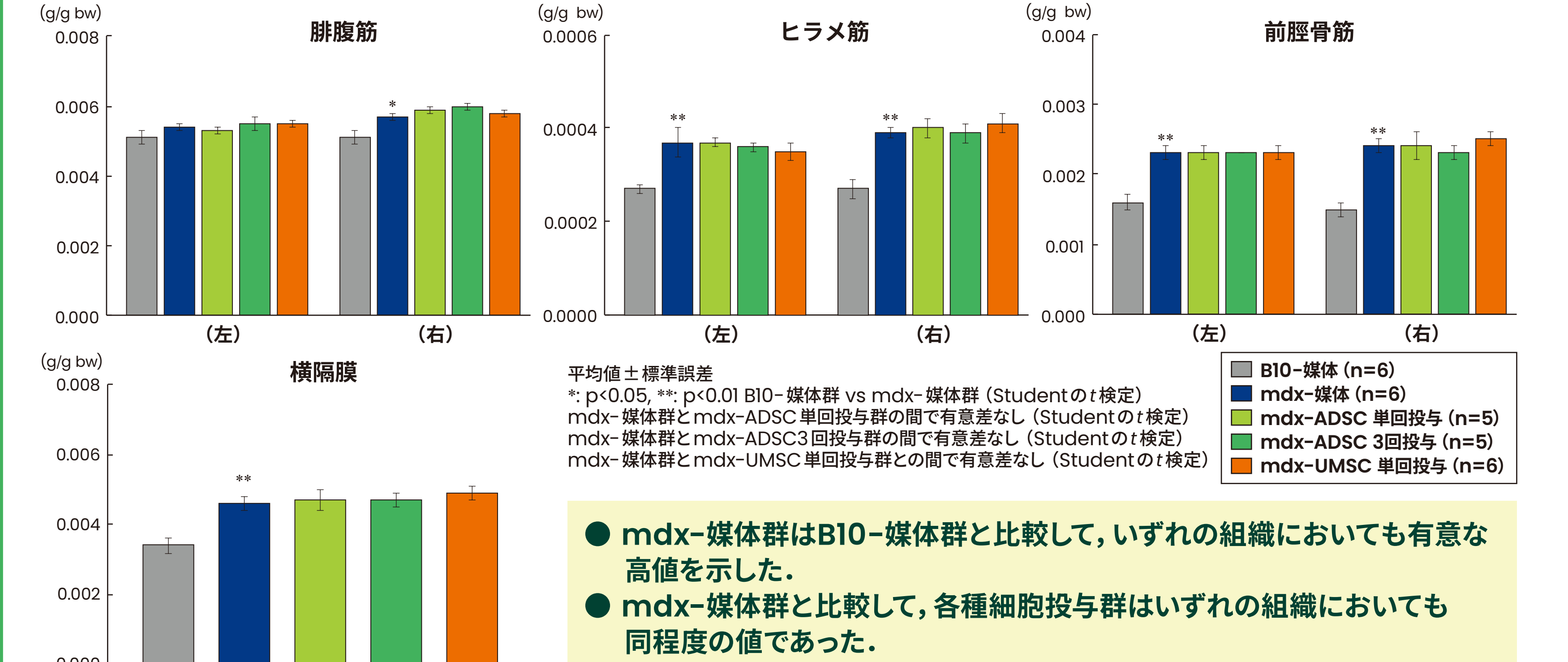
最大筋力・握力・加速式ロータロッド



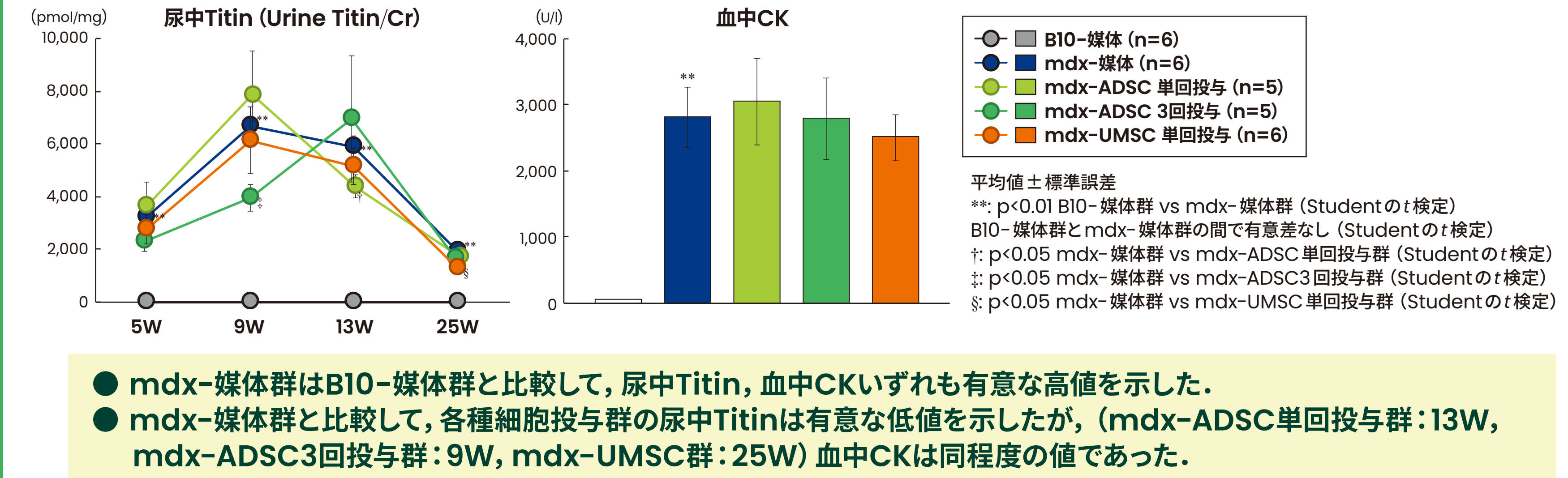
CatWalk



組織重量



尿中バイオマーカー（Titin）・血液生化学検査（CK）



病理組織学的検査

