

# ALSモデルマウスにおける幹細胞投与の効果

○ 上岡 雅菜, 林田 尚之, 長尾 知佳, 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

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、上位運動ニューロンと下位運動ニューロンの細胞体が散発性・進行性に変性脱落し、全身の筋力低下や筋肉の萎縮を起こす神経疾患である。

本研究では、近年ALSモデルとして注目されているTDP-43マウスを入手し、本マウスに対する超高純度ヒト間葉系幹細胞 (REC) の効果を検討した。

## 方法

### ● 使用動物

- C57BL/6J (以下, B6J) マウス, ♂, 5週齢 (入荷時), ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社
- B6.Cg-Tg (Prnp-TARDBP\*Q331K) 103Dwc/J, WT (以下, WT) マウス, ♂, 5週齢 (入荷時) ※
- B6.Cg-Tg (Prnp-TARDBP\*Q331K) 103Dwc/J (以下, TDP-43) マウス, ♂, 5週齢 (入荷時) ※

※ WTおよびTDP-43マウスは、米国Jackson Laboratoryより種親マウスを購入し、国内のジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社にて体外受精により繁殖

### ● 投与

- 超高純度ヒト間葉系幹細胞 (REC), 富士フィルム和光純薬株式会社より入手
- $1 \times 10^5$  cells/body, 6週齢時に単回尾静脈内投与または単回脳室内投与

### ● 群構成

#### ● 本体試験

試験群	系統	投与物質 (cells/body)	投与経路	例数
B6J-媒体	B6J	0	脳室内	8
WT-媒体	WT			
TDP-43-媒体	TDP-43	$1 \times 10^5$	静脈内	
TDP-43-REC (i.v.)				
TDP-43-REC (i.c.v.)			脳室内	

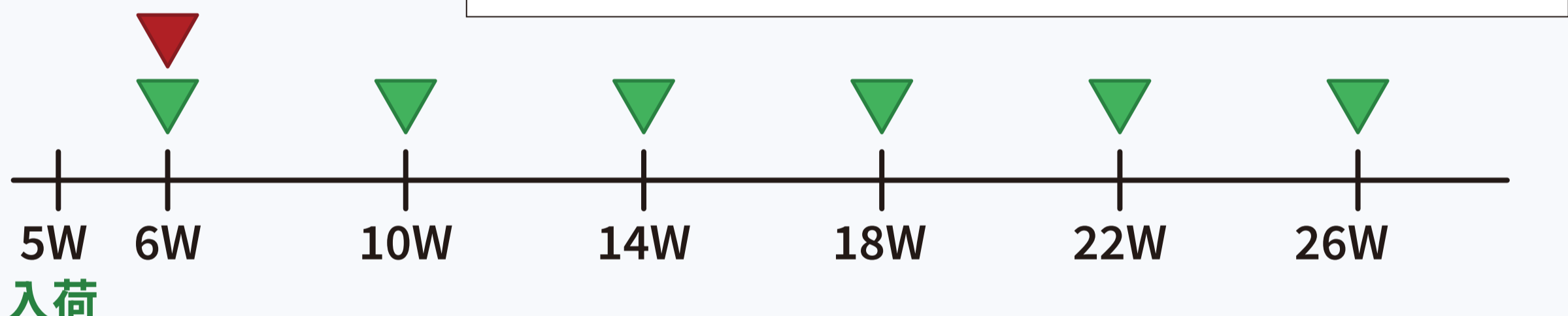
#### ● サテライト

試験群	系統	投与物質 (cells/body)	投与経路	例数
B6J-媒体	B6J	0	脳室内	5
WT-媒体	WT			
TDP-43-媒体	TDP-43	$1 \times 10^5$	脳室内	4
TDP-43-REC				5

### ● 実験スケジュール

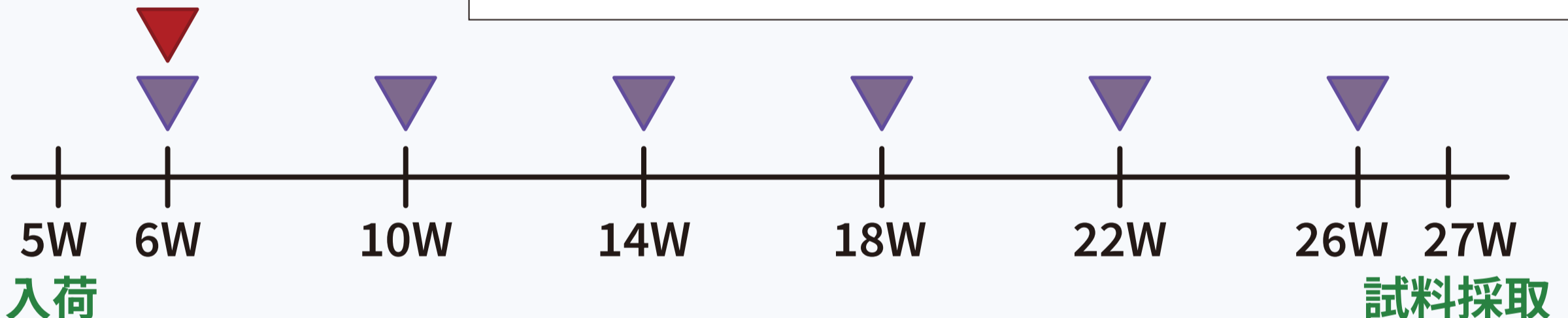
#### ● 本体試験

- ▼ 脳室内・尾静脈内投与
- ▼ 体重・クリニカルスコア・握力・加速式ロータロッド



#### ● サテライト

- ▼ 脳室内投与
- ▼ 体重・クリニカルスコア・尾静脈採血・筋力測定

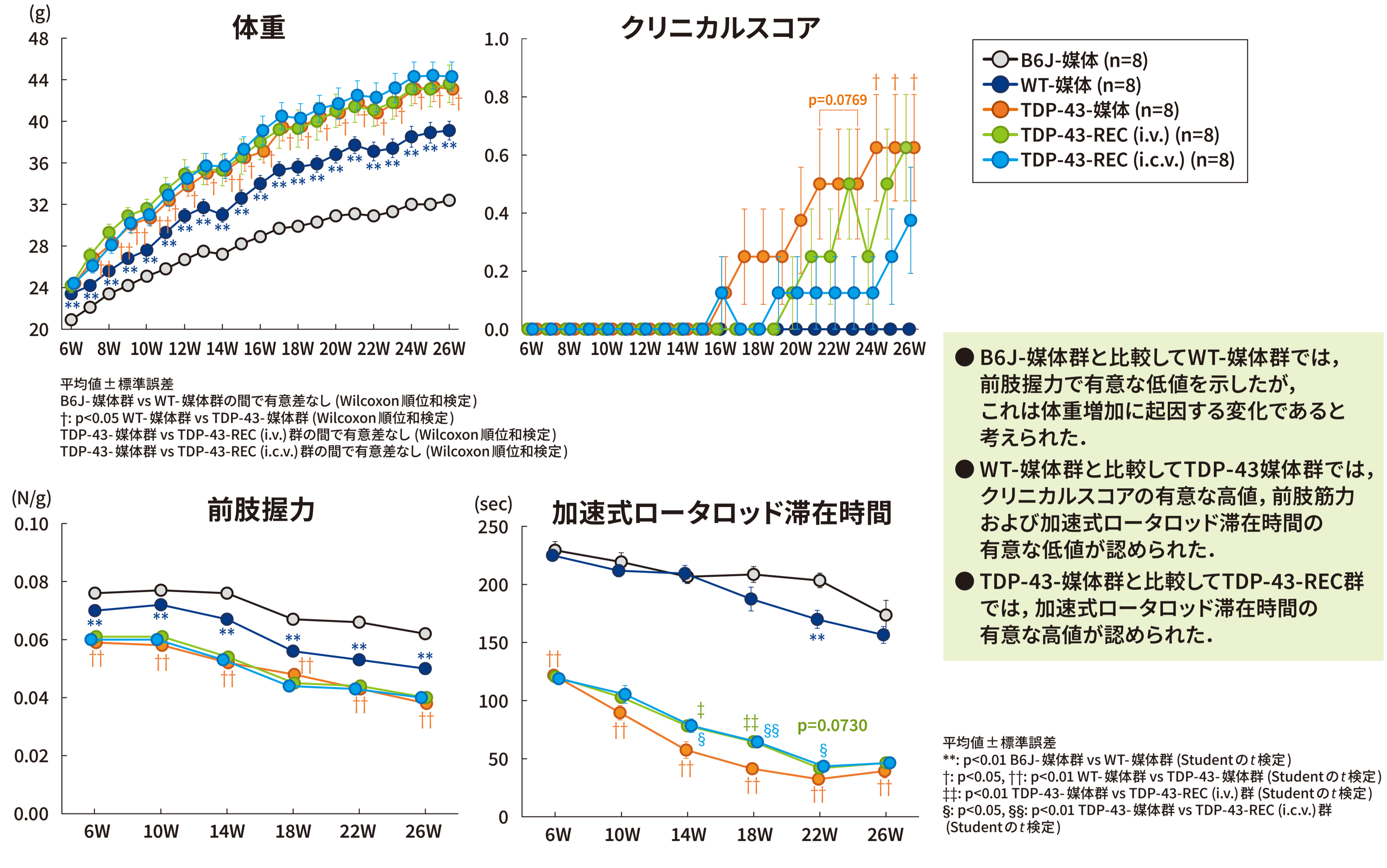


### ● 評価項目

- **体重測定**：1回/週の頻度で測定 (本体試験・サテライトで実施)
- **クリニカルスコア**：1回/週の頻度で測定 (本体試験・サテライトで実施)
- **握力測定**：1回/4週の頻度で測定 (本体試験で実施)  
握力計 (ニデックドライプ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。
- **加速式ロータロッド**：1回/4週の頻度で測定 (本体試験で実施)  
加速式ロータロッド (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4 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4 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。
- **筋力測定**：1回/4週の頻度で測定 (サテライトで実施)  
2% イソフルラン吸入麻酔下で筋力測定装置 (Aurora Scientific Inc.) を用いて2本の電極をマウスの左後肢腓腹筋の皮内に刺し、最大筋力を測定した。
- **血清中・CSF中NF-Lの測定**：(サテライトで実施)  
Human NF-L ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて代表例をn=1 (single) で測定した。
- **腓腹筋重量**：試料採取時 (27週齢時) に測定 (サテライトで実施)
- **病理組織学的検査** (サテライトで実施)  
2% イソフルラン吸入麻酔下で放血後に各種組織を採取し、以下の評価に供した。
  - ・腓腹筋：HE定性検査
  - ・脊髄 (腰部)：c-myc免疫染色

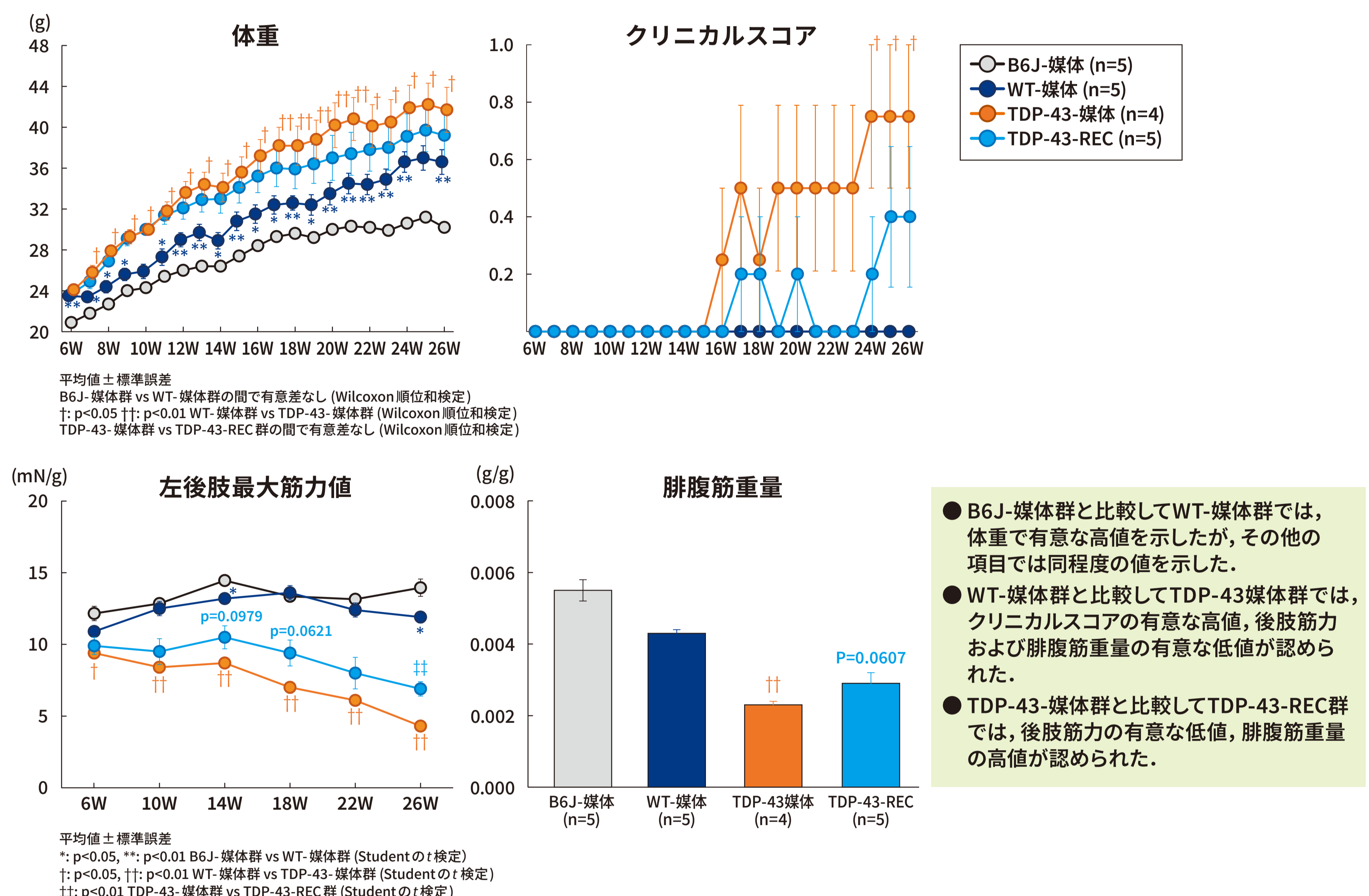
## 結果

### ● 本体試験



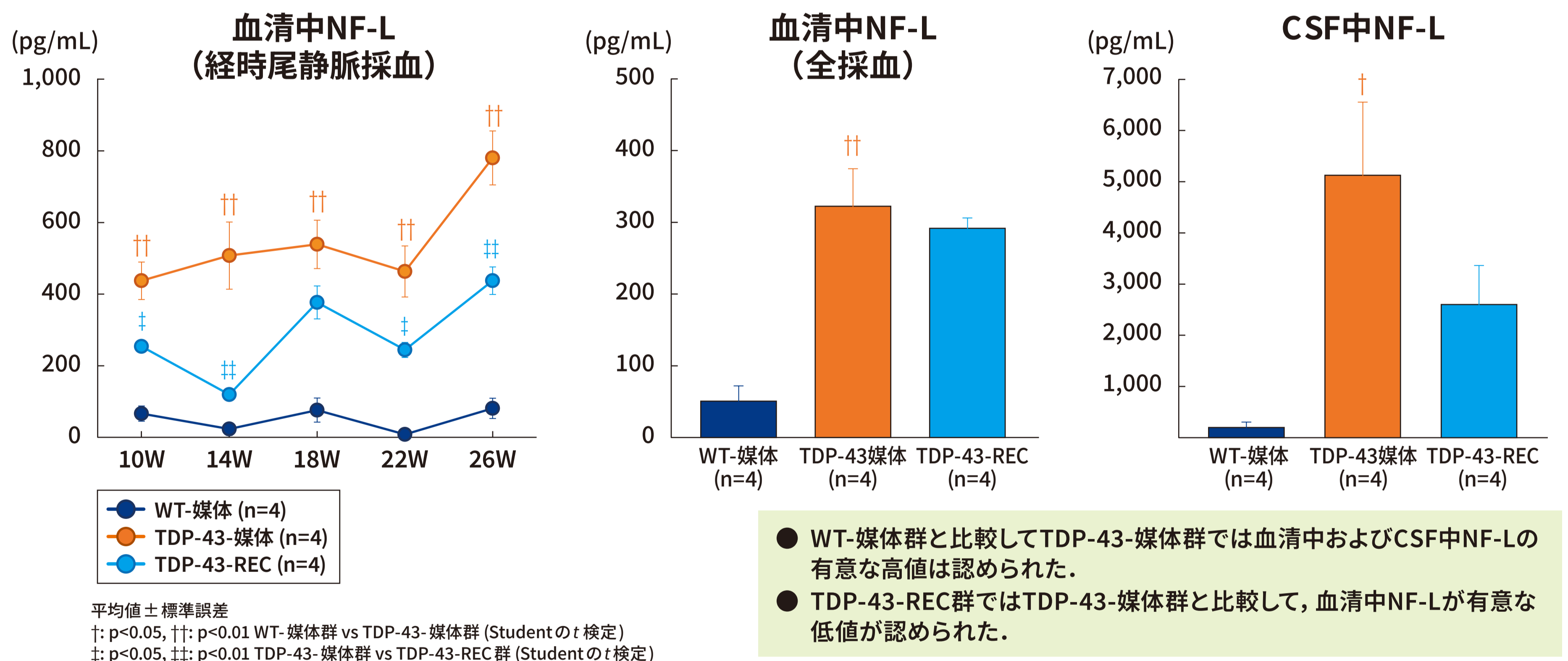
- B6J-媒体群と比較してWT-媒体群では、前肢握力で有意な低値を示したが、これは体重増加に起因する変化であると考えられた。
- WT-媒体群と比較してTDP-43媒体群では、クリニカルスコアの有意な高値、前肢筋力および加速式ロータロッド滞在時間の有意な低値が認められた。
- TDP-43-媒体群と比較してTDP-43-REC群では、加速式ロータロッド滞在時間の有意な高値が認められた。

### ● サテライト



- B6J-媒体群と比較してWT-媒体群では、体重で有意な高値を示したが、その他の項目では同程度の値を示した。
- WT-媒体群と比較してTDP-43媒体群では、クリニカルスコアの有意な高値、後肢筋力および腓腹筋重量の有意な低値が認められた。
- TDP-43-媒体群と比較してTDP-43-REC群では、後肢筋力の有意な低値、腓腹筋重量の高値が認められた。

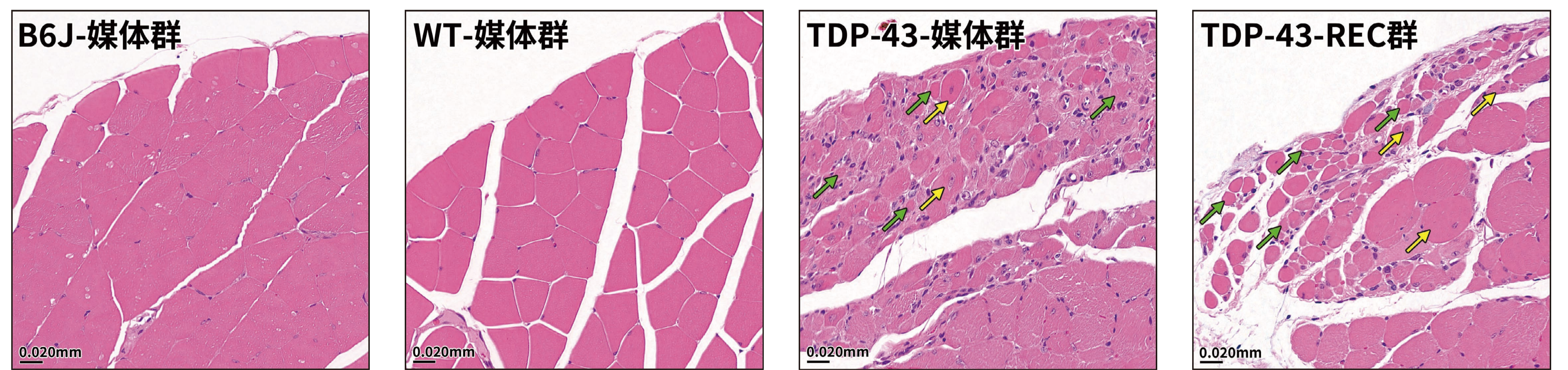
### ● 血清中・CSF中NF-L



- WT-媒体群と比較してTDP-43-媒体群では血清中およびCSF中NF-Lの有意な高値は認められた。
- TDP-43-REC群ではTDP-43-媒体群と比較して、血清中NF-Lが有意な低値が認められた。

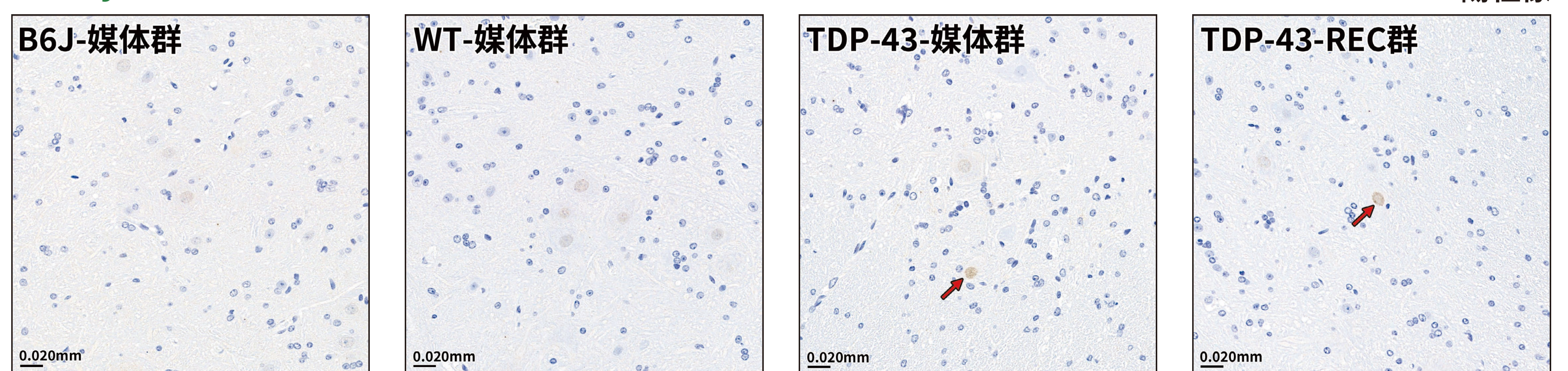
### ● 病理組織学的検査

#### ■ HE染色：腓腹筋 (代表例)



- B6J-媒体群およびWT-媒体群では、均一の大きさの筋線維が認められた。
- TDP-43マウスでは、筋線維の萎縮や中心核が認められた。

#### ■ c-myc免疫染色：脊髄腹角 (腰部) (代表例)



- TDP-43マウスでは、腹角の運動神経の核に弱い陽性像が認められる。

## まとめ

- 本研究で使用したTDP-43マウスは、WTマウスと比較して運動機能の低下、血清中およびCSF中NF-Lの上昇などが確認されたことからALSの特徴的な変化を捉えることができた。
  - RECの投与により、運動機能低下の改善や血清中NF-L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。
- 以上の結果から、ALSモデルマウスを用いた評価系を構築することができ、本疾患の再生医療研究に有用であることが示唆された。