

幹細胞療法・抗体療法の複合による多発性硬化症治療法の開発

島根大学医学部 解剖学講座 神経科学
宮嶋 久雄

1. 諸言

多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) は、脳や脊髄などの中枢神経系に脱髄病変 (神経細胞の軸索を取り巻く髄鞘の脱落) が多発し、再発・寛解を繰り返しながら運動麻痺や感覚障害など様々な症状がおきる難病である。MS は、急に症状が出ては治まる再発寛解型 MS、発病当初から慢性的に症状が進行する一次進行型 MS に分類される。そして、再発寛解型 MS の約半数は、次第に障害が進行していく二次進行型 MS へ移行する¹⁾。しかし、患者の半数を占める進行型の MS に対しての特異的な治療法は未だ確立されていない。

近年の臨床研究から、MS への治療法として多分化能をもつ間葉系幹細胞が有効であることが明らかとなった^{2),3)}。最近になり、免疫抑制機能に優れた高純度のヒト間葉系幹細胞 (Rapidly Expanding Cells : REC) が開発された⁴⁾ことから、MS モデル動物への治療効果が期待される。また、高品質のモノクローナル抗インターロイキン (interleukin : IL) -18 抗体が開発された⁵⁾。IL-18 は、炎症性サイトカインとして多彩な機能を持ち、脱髄性疾患との関連についてもこれまで多くの知見が得られており^{6),7)}、IL-18 の制御が再髄鞘化の促進につながることを示唆されている。

そこで本研究では、免疫抑制 (神経細胞保護) と再髄鞘化 (神経機能再建) の両方への寄与が期待できる REC および IL-18 に対する抗体に着目し、これらを組み合わせた新規治療法の確立することを目的とした (図 1)。具体的には、Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 投与による実験的自己免疫脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE) 動物モデル (自己免疫性 MS モデル) およびクプリゾン投与脱髄モデル (非自己免疫性 MS モデル) 動物に対して、発症の前後の時期に、それぞれ REC および抗 IL-18 抗体を単独または同時に投

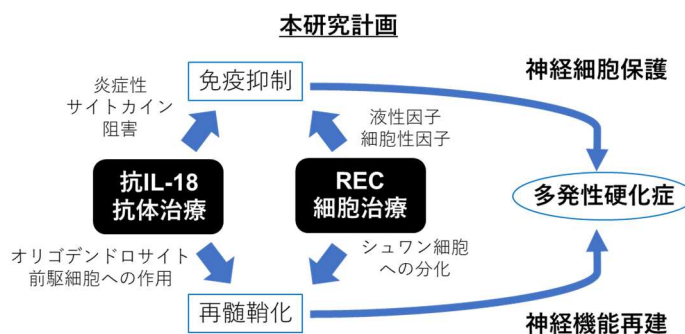


図 1 抗体治療と細胞療法の複合による多発性硬化症の画期的治療法の開発を目指す

与し、①EAE 進行抑制、②再髄鞘化促進、③発症予防について検証した。そして、①②③の結果を基に、治療法の組み合わせを最適化し、組み合わせた時の効果を臨床スコア、免疫染色法による組織学的な解析等により評価した。

2.方法

実験動物は、8週齢の C57BL/6J 雌マウスを日本エスエルシーから購入し、3週間馴化させた後 EAE の誘導を行った。REC は島根大学医学部生命科学講座松崎有未教授より分与を受けた。投与する REC は、先行研究を参照して細胞培養を行った⁴⁾。

EAEの誘導は以下の通りに行った。リン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline : PBS) に溶かしたMOG₃₅₋₅₅ペプチド溶液 (2 mg/mL) とM.Tuberculosis H37Ra死菌 (6 mg/mL) 入りフロイト完全アジュバントを等量混和し、エマルジョンを作製した。そして、イソフルラン吸入麻酔下で、購入後3週間馴化させたマウスの左右の脇腹に、作製したエマルジョンを100 μ Lずつ投与した。初回感作時と2日後にPBSに溶かした400 ngのPertussis toxinを腹腔内投与した。感作から17日後または10日後に、PBS 200 μ Lに溶かしたREC (1 \times 10⁶個/匹) を眼窩静脈叢から投与した後、臨床評価及び体重測定を42日後まで行った。コントロール群には、PBSのみの投与を行った。臨床評価には以下のスコア (EAE score) を用いた (0 : 正常、1 : 尾の部分下垂、2 : 尾の完全下垂、3 : 後肢の部分麻痺、4 : 後肢の完全麻痺、5 : 後肢の完全麻痺及び上肢の麻痺、6 : 死亡)。

3.結果

本研究では、EAE モデルを用いて、REC の治療効果の検証を行った。まず EAE 進行抑制効果を検証するため、臨床症状ピーク期 (EAE 誘導 17 日目) に REC 投与を行った (図 2)。その結果、各種 EAE スコア (図 2A、C、D、E) および体重変化 (図 2B) に関して、REC

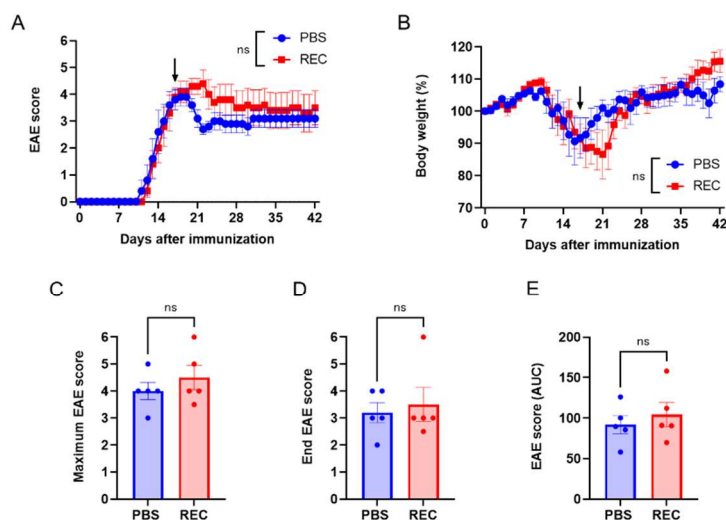


図2 発症ピーク期 (EAE誘導17日目) でのREC投与の治療効果の検討

投与群とコントロール群間で有意差はなかった。

次に、EAE 発症予防効果を検証するため、発症前期（EAE 誘導 10 日目）に REC 投与を行い、同様に臨床症状スコアと体重変化の評価を行った（図 3）。その結果、各種 EAE スコア（図 3A、C、D、E）及び体重変化（図 3B）に関して、REC 投与群とコントロール群間で有意差はなかった。また、発症日においても 2 群間での違いはなかった（図 3F）。

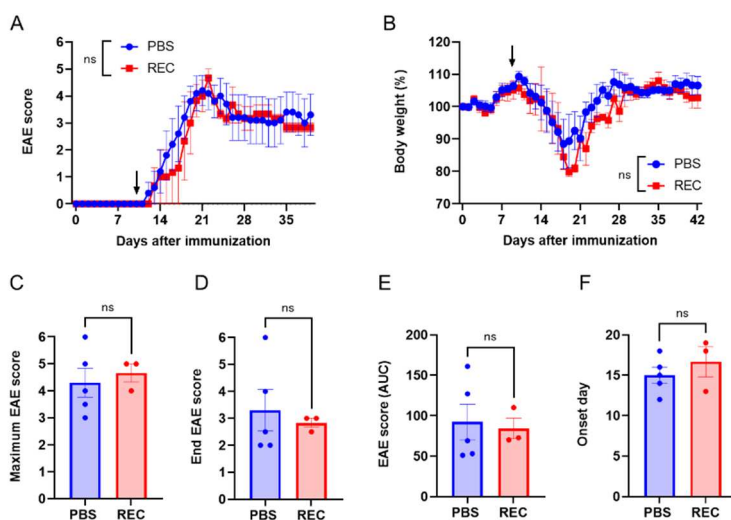


図3 発症前期（EAE誘導10日目）でのREC投与の治療効果の検討

4. 考察

現在においても進行型の MS に対する治療法は未確立である。したがって、効果のある薬剤を組み合わせるなどより効果の高い方法が模索されるべきである。本研究は、2 点独創的な特徴がある。1 点目は、これまでの先行研究で用いられた細胞や抗体よりも、高い治療効果を持つ可能性がある REC および抗 IL-18 モノクローナル抗体を使用している点である^{4),5)}。そしてもう 1 つは、免疫抑制作用と再髄鞘化の両者に着目して最適化する点である。これまで、異なる治療目標に対する複合的な治療法は少なく、治療法を融合させてより効果的な治療法を模索することで、難病の治療の進歩に大きく貢献すると考えられる。

本研究では、EAE モデルを用いて、REC の治療効果の検証を行った。まず臨床症状ピーク期および発症前期に REC 投与を行い、臨床症状スコアと体重変化の評価を行った。その結果 EAE 進行抑制及び発症予防に対しての効果は観察されなかった。しかしながら、今回の解析に用いたサンプルは未だ少ない。また、組織学的な解析についても、進行中であるものの、検討できていない。間葉系幹細胞は、その免疫抑制効果が証明されているが、その他に様々な細胞へ分化できる多分化能を活かして、脱髄が起きた部位の髄鞘の修復—再髄鞘化が期待できる。その他、中枢神経系内でオリゴデンドロサイト前駆細胞（中枢神経系内で髄鞘を形成する細胞の前駆細胞）に働きかけて再髄鞘化を促進することが示唆され

ている^{8),9)}。一方、IL-18の制御も、抗炎症作用のみならず、再髄鞘化の制御にも関与する可能性が示されている⁷⁾。そこで、この両者を同時に制御することで、免疫制御と、再髄鞘化制御の両方への効果が期待される。したがって、RECの治療効果を正確に評価するためには、サンプル数を増やすと共に、より詳細な解析を行う必要がある。本研究が発展すれば、免疫抑制と再髄鞘化という2つの異なる治療目標に対する複合的な治療法の開発につながり、難病治療の発展に大きく貢献できると期待している。

5.結語

本研究では、EAEモデルにおけるヒト間葉系幹細胞RECの治療効果の検討を行った。臨床症状ピーク期及び発症前期に投与した場合には、EAE進行抑制及び発症予防に対する効果は観察されなかった。しかし、サンプル数が不十分であるため、サンプル数を増やして、治療効果の確認を行う必要がある。また、組織学的な解析も進行中であり、詳細なRECの治療効果は検証段階である。さらに、REC投与の改良方法やクプリゾン投与脱髄モデルを用いて、RECと抗IL-18抗体との複合投与による、脱髄疾患への治療効果も解析を行う予定である。

6.文献

- 1) Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. Multiple sclerosis. *The Lancet*. 2018; 391: 1622-1636.
- 2) Connick P, Kolappan M, Crawley C, Webber DJ, Patani R, Michell AW, et al. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *The Lancet Neurology*. 2012; 11: 150-156.
- 3) Llufriu S, Sepulveda M, Blanco Y, Marin P, Moreno B, Berenguer J, et al. Randomized placebo-controlled phase II trial of autologous mesenchymal stem cells in multiple sclerosis. *PLoS One*. 2014; 9, e113936.
- 4) Mabuchi Y, Morikawa S, Harada S, Suzuki S, Renault-Mihara F, et al. LNGFR(+)THY-1(+)VCAM-1(hi+) cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reports*. 2013; 1, 152-165.
- 5) Nariai Y, Kamino H, Obayashi E, Kato H, Sakashita G, Sugiura T, et al. Generation and characterization of antagonistic anti-human interleukin (IL)-18 monoclonal antibodies with high affinity: Two types of monoclonal antibodies against full-length IL-18 and the neoepitope of inflammatory caspase-cleaved active IL-18. *Arch Biochem Biophys*. 2019; 663, 71-82.
- 6) Gutcher I, Urich E, Wolter K, Prinz M, Becher, B. Interleukin 18-independent engagement of interleukin 18 receptor-alpha is required for autoimmune inflammation. *Nat Immunol*. 2006; 7, 946-953.

- 7) Jha S, Srivastava SY, Brickey WJ, Iocca H, Toews A, Morrison JP, et al. The inflammasome sensor, NLRP3, regulates CNS inflammation and demyelination via caspase-1 and interleukin-18. *J Neurosci.* 2010; 30, 15811-15820.
- 8) Kassis I, Grigoriadis N, Gowda-Kurkalli B, Mizrachi-Kol R, Ben-Hur T, Slavin S. et al. Neuroprotection and immunomodulation with mesenchymal stem cells in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arch Neurol.* 2008; 65(6):753-61.
- 9) Bai L, Lennon DP, Eaton V, Maier K, Caplan AI, Miller SD, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia.* 2009; 57, 1192-1203.

7.成果発表

無し