

令和元年6月8日現在

機関番号：32304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K17328

研究課題名(和文) 老化・アルツハイマー病モデル動物における認知機能低下に対する幹細胞移植の効果

研究課題名(英文) Effects of mesenchymal stem cells on cognitive dysfunction of aging, Alzheimer's disease model rats

研究代表者

末永 叔子 (Suenaga, Toshiko)

東京福祉大学・心理学部・講師

研究者番号：80431667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：海馬または大脳基底核大細胞部を損傷した老化・アルツハイマー病モデルラットを用い、それらの認知機能を検討したところ、空間記憶障害がみられた。大脳基底核損傷群に幹細胞を移植した1ヶ月後、記憶課題の成績が回復傾向を示し、幹細胞による認知機能改善が期待された。海馬損傷群には脳組織の萎縮と細胞体の欠損がみられ、この形態変化が認知機能の低下を導いている可能性が考えられた。一方で大脳基底核損傷群には明確な形態変化は観察できなかった。今後詳細な形態分析を行い、認知機能障害をもたらすメカニズムについて検討を行う予定である。また、幹細胞を移植した動物の脳形態観察を行うに至っておらず、今後の課題として残される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本では急激な高齢化がすすんでおり、高齢者の認知機能の低下をいかに防ぐかが喫緊の課題として挙げられる。老化やアルツハイマー病に伴う認知機能の低下に対する有効な治療法は確立されていないが、脳の機能不全を幹細胞によって改善させる試みが行われ始めている。本研究ではアルツハイマー病モデル動物の認知機能低下に対する幹細胞移植の効果を検討した。これまでに認知機能に障害があるモデル動物に幹細胞を投与することで機能障害に回復傾向がみられることが明らかとなった。本研究で得られた基礎的データをもとに、老化やアルツハイマー病に起因する認知機能低下に対する有効なアプローチを提案することができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Rats injected neurotoxin into their hippocampus or nucleus basalis magnocellularis (NBM) were used as Alzheimer's disease model rats. These rats showed spatial memory deficit. One month after implantation of mesenchymal stem cells for NBM rats, they showed a tendency to recover their memory deficit. The results give us an expectation that stem cells could recover cognitive dysfunction of Alzheimer's disease patients. Hippocampal lesion rats showed neural cells loss and atrophy of their brain, and it might induce cognitive dysfunction. On the other hand, we could not find any obvious degeneration of the brains of NBM lesion rats. We intend to analyze the NBM rat's brain in detail to elucidate the mechanisms induce cognitive dysfunction seen in these rats. We could not analyze the brains of rats that implanted stem cells to date, because of the trouble in electric system of laboratory. Thus, histological analysis is a forthcoming task; we intend to conduct the analysis in the future.

研究分野：生理心理学、神経科学

キーワード：アルツハイマー病 認知機能障害 間葉系幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年の医療技術の発達により、平均寿命は伸びる傾向にある。少子化も相まって、日本において65歳以上の高齢者は全人口の約25%を超え、これからも増加することが予想されている。この高齢化社会の中で、高齢者が健康で自立した生活を送ることがますます重要となってくる。高齢者の生活の質(Quality of Life: QOL)を維持する上で、身体的健康だけでなく、認知機能の低下をいかに防ぐかが問題となる。我々が人間らしい生活を送る上で重要な役割を担う認知機能は、脳内において神経細胞のネットワークによって展開されている。これらのネットワークは誕生後、さまざまな経験を通じて形成される。我々の身体は歳をとるにつれ変化していくが、脳の神経ネットワークも老化に伴って変化する。高齢者にみられる認知機能の低下は、神経ネットワークを構築している脳細胞が脱落、または構造が変化するためであると考えられている。

老年認知症のなかでも、アルツハイマー病者の割合は最も多く、65歳以上の人口の約8分の1が罹患する。アルツハイマー病が進行すると寝たきりの状態となり、患者本人のQOLの低下だけでなく、介護者の確保など、公衆衛生上にも大きな問題となる。従って、その治療法の確立が喫緊の課題である。老化やアルツハイマー病に共通する脳の神経変性は、大脳基底核の神経脱落であると考えられている。大脳基底核から海馬や大脳皮質などに投射するアセチルコリン神経系の機能不全が、認知機能障害を生じさせていると推測されているが、現在のところ、この機能不全に対する有効な治療法はない。

しかし近年、幹細胞を用いることで、さまざまな脳の機能不全が改善出来る可能性が示唆されてきた(Yamasaki, et al., 2007; Lee, et al., 2010 など)。幹細胞とは、自己複製能力と他種の細胞へと分化する能力を持つ細胞をさす。幹細胞を採取(または作成)する方法はいくつかあるが、骨髄や脂肪、真皮などの間葉系組織から採取される間葉系幹細胞は、移植された際の腫瘍化が少ないという安全性の高さと、採取しやすいという特徴から再生医療の分野において注目を浴びている。間葉系幹細胞はその採取部位である骨や脂肪の細胞に分化するだけでなく、神経系細胞にも分化することが明らかとなった。研究代表者と親交のあるセビリア大学のアヤラ博士は、脳の黒質を損傷した動物に間葉系幹細胞を投与することで、脳組織損傷に回復効果が見られ、行動障害が改善することを予備的実験で見いだしている。しかし、間葉系幹細胞投与による細胞組織や行動障害の改善効果が、認知機能にも及ぶかは明らかではなく、今後の検討が期待された。

### 2. 研究の目的

本研究では海馬または大脳基底核大細胞部(Nucleus Basalis Magnocellularis: NBM)を破壊した老化・アルツハイマー病モデル動物に間葉系幹細胞を移植し、認知機能の改善効果を検討することを目的とする。また、その改善効果がどのようなメカニズムによって引き起こされたのかを検討することで、アルツハイマー病を始めとする老化に伴う認知機能低下に対する有効なアプローチを提案するための基礎データを収集する。

### 3. 研究の方法

被験体はWistar系雄ラットを用いた。飼育室は24~26度に維持され、7時から19時を明期とする明暗サイクル下で飼育された。実験は全て明期に行った。

認知機能課題として空間的作業記憶を測定する8方向高架式放射状迷路課題、非空間的記憶を測定する物体再認課題、空間的記憶を測定する位置再認課題を用いた。海馬損傷群はあらかじめ放射状迷路課題訓練を行い、課題習得後に損傷術を行う群と、始めに海馬損傷術を施したのちに放射状迷路課題訓練を行う2群を設けた。NBM損傷群は損傷術によるダメージが大きく、十分な被験体数を確保することが困難であったため、放射状迷路課題習得後に損傷術を行う群のみで実験を行なった。海馬損傷群、NBM損傷群とも、放射状迷路課題を行ったのちに物体再認課題および位置再認課題を行った。

本研究で用いた放射状迷路課題は中央のプラットフォームとそこから放射状に伸びた8本のアームからなり、アームの先端には報酬の餌ペレットを置くためのくぼみが設けられた。プラットフォームとアームの間にはギロチン式のドアがあり、実験者によって開閉可能であった。学習訓練実施前にハンドリングと装置馴化を行った。装置馴化では初めに複数のラットを同時に装置に投入し、自由に装置内を探索させた。この際、報酬として用いる餌ペレットを装置内に撒き、摂取させた。その後個別に装置馴化を行なった。その後の学習訓練では8本全てのアーム先端の報酬受け皿に餌ペレットを1つずつ置き、全てのドアを閉じた状態で中央プラットフォームにラットを投入した。その後、全てのドアを解放し、ラットにアームを選択させた。ラットの四肢の全てがアームに入ることを1選択とした。ラットがアームからプラットフォームに戻ると、全てのドアを閉め、5秒後に再び全てのドアを解放し、アームを選択させた。ラットがまだ報酬を取っていないアームに侵入し、餌ペレットを摂取することを正選択とし、それ以外の反応(すでに餌ペレットを摂取したアームに再侵入する。アームに侵入しても餌ペレットを摂取しない、等)は誤選択とした。ラットが全ての報酬を取り終える。16選択する。試行開始から10分が経過する。のいずれかで試行を終了し、一日1試行行なった。最初の8選択中の7選択以上が正選択である試行が5連続することを学習基準とした。最初の8選択中の正選択数、誤選択数、課題遂行時間を測定し、正選択数および誤選択数は記憶機能の

指標として用いた。課題遂行時間は課題への動機付けや運動機能など、記憶機能以外で課題遂行に影響を及ぼすと考えられる要因を検出するための指標として用いた。この課題は餌ペレットを報酬とするため、報酬に対する動機付けを高めるために課題実施中には餌制限を行い、体重を餌自由摂取時の80~85%に保った。水は実験期間中を通じて自由摂取とした。

物体再認課題および位置再認課題は、ラットがあらかじめ探索したことがある物体や物体が置かれた場所よりも、新奇な物体や、探索したことがない位置に置かれている物体に対してより長く探索行動を示すという自発的な行動傾向を利用した記憶課題であり、事前訓練を必要としない。両課題とも見本期とテスト期から成り、その間に10分または1時間の遅延時間を挟むことで、短期記憶と長期記憶の両者を測定した。課題実施に先んじて、物体を提示するオープンフィールドへの装置馴化を行なった。使用する物体は、陶器製の動物の置物、陶器製の白い円柱、鉄製のメガネケース、シリコン製の動物のおもちゃ、ガラス製の砂時計、陶器製の徳利、陶器製の貯金箱など、色や質感、形状が異なるものを複数用いた。ラットは短期および長期の物体再認課題、短期および長期の位置再認課題の全てを経験した。それぞれの課題は2日以上の間隔をおいて行ったが、4種の課題において、記憶の混濁を避けるため、同一の物体を2回用いることはなかった。また、匂いが記憶の手がかりとなることを避けるため、見本期とテスト期の間に70%エタノールで物体およびオープンフィールド内を清掃した。物体再認課題では、見本期において任意の2箇所に同一の物体を1つずつ置いた。ラットに両物体を探索させ、遅延期間を挟んだ。遅延期間後にテスト期を行った。テスト期では見本期と同じ位置に物体を置くが、1つは見本期と同一の物体、もう一方には新奇物体を置いた。それぞれの物体に対する探索時間を測定し、総探索時間における、新奇物体に対する探索時間を記憶の指標とした。位置再認課題では、見本期に任意の2箇所に同一の物体を1つずつ置き、それぞれの物体を探索させた。テスト期には見本期と同じ物体を用いるが、一方は見本期と同じ位置に、もう一方は見本期とは異なる位置(新奇位置)に置き、総探索時間における、新奇位置に置かれた物体に対する探索時間を記憶の指標とした。

間葉系幹細胞はラット腹部の皮下脂肪細胞より採取、培養した。骨髄や脂肪、真皮などから採取される間葉系幹細胞の中でも、脂肪由来の幹細胞は採取が簡便であり、かつ他分化能をもつ細胞の割合が高いことが知られており、再生医療の分野でも注目を浴びている幹細胞の一種である。まず、麻酔下のラットから脂肪細胞を切除し、血液等を洗浄した後に酵素処理を行って、脂肪細胞から間質血管細胞群を採取した。間質血管細胞群には間葉系幹細胞のほか、血管内皮細胞等も含むため、ここからさらに間葉系幹細胞を分離し、最終的に得られた間葉系幹細胞を培養し、移植に十分な量を確保した。

H28、H29年度にはNBM損傷群に対し、間葉系幹細胞の移植を行なった。放射状迷路課題習得後にNBM損傷術を行い、回復期間の後、放射状迷路課題および物体再認、位置再認課題を行なった。その後幹細胞移植を行なった。移植から約1週間後、1ヶ月後、2ヶ月後、3ヶ月後に行動課題を行なった。ただし、H29年度は実験施設の電気系統の故障により実験計画に大幅な遅れが発生し、移植約1ヶ月後のみ行動課題を行なった。また、H28年度には脳内に幹細胞を複数回微小投与するためのガイドカニューレ留置による幹細胞移植を試みたが、カニューレや投与用チューブの詰まり、破損などの問題がみられたため、H29年度にはNBM損傷術後の行動課題において記憶機能を測定した後、再度開頭して幹細胞の移植を行なった。

#### 4. 研究成果

海馬損傷群では放射状迷路を用いた空間的記憶課題の習得に障害がみられ、またすでに習得した空間記憶課題の遂行にも障害がみられた。物体再認課題を用いた非空間的な短期記憶および長期記憶は統制群との差がみられなかった。NBM損傷群では放射状迷路課題において空間記憶に障害がみられたが、物体再認課題において、非空間的な短期記憶および長期記憶に障害はみられなかった。H28年度に行なった幹細胞移植実験において、移植約1ヶ月後に幹細胞を移植されたNBM損傷群の空間記憶障害に回復傾向がみられ、幹細胞による機能回復の可能性が示唆された。しかし、移植2ヶ月、および3ヶ月後には統制群とNBM損傷群の課題成績に有意な差がみられ、本研究で用いた手続きによって移植した幹細胞による認知機能回復効果は永続的なものではない可能性が示唆された。またH29年度の実験では、幹細胞を移植するための再開頭手術後の回復に問題がみられる被験体が複数出現し、幹細胞移植による認知機能回復効果が検出できなかった。これらの結果を踏まえ、今後幹細胞の投与ルートを考慮する必要があると考えられた。また、移植した幹細胞の効果を持続させるために、移植する細胞数や移植のタイミング、回数等にも改善が必要であることが示唆された。

組織学的検索の結果、海馬損傷群において脳組織の萎縮と細胞体の明瞭な欠損がみられ、この形態変化が本研究にみられた認知機能の低下を導いている可能性が考えられた。一方でNBM損傷群には海馬損傷群のような明確な形態変化は観察できなかった。今後、細胞体数のカウントなど、より詳細な形態分析を行い、どのようなメカニズムで認知機能の低下が生じたのか検討を行う予定である。また、実験施設の故障により当初の予定より大幅に実験計画に遅れが生じたため、現段階までに幹細胞を移植したラットの脳形態観察を行うに至っておらず、今後の課題として残される。

<引用文献>

Lee et al., 2010, Stem cells, 28, 329-343.

Yamasaki et al., 2007, Journal of Neuroscience, 27, 11925-11933.

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計4件)

Suenaga et al., 2018, Effects of prenatal stress on neuronal morphology of the medial prefrontal cortex in rats. The 78<sup>th</sup> meeting of the Japanese Society for Animal Psychology.

未永ら, 2017, 空間記憶および非空間記憶における海馬 CA3 イボテン酸損傷の効果. 第77回日本動物心理学会大会

Suenaga et al., 2016, Developing brain, adolescence, and vulnerability to nicotine: an animal study. The 31th International Congress of Psychology.

Suenaga et al., 2015, Effects of adolescent nicotine exposure on intracranial self-stimulation behavior in rats. Society for Neuroscience, Neuroscience 2015.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。