

令和元年6月14日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10743

研究課題名(和文) 幹細胞移植による神経再生時における神経移動とシグナル機構の解明

研究課題名(英文) Neural regeneration and signal pathway after neural stem / progenitor cells transplantation in hemiplegic mice

研究代表者

廣津 千恵子 (Chieko, Hirotsu)

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員

研究者番号：90647174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：片麻痺モデルマウスでは、Beam walking testによる足の踏み外しが損傷後1～3か月(観察期間)起こる。マヒ1週後にhiPS由来神経分化幹・前駆細胞を移植すると移植片マヒマウスは移植後1週間から足の踏み外し割合の低下や、歩行時間が長くなるという運動機能の回復が見られた。一方マヒのみ(PBS移植)のマウスでは回復がみられなかった。移植細胞は損傷部位に主に移動し、そこで成熟神経細胞として定着していた。損傷後から損傷部位を中心として発生期での神経細胞の移動、層構造形成に関わるReelinの発現が増加することから、移植細胞が移動し損傷神経細胞の代わりに機能することが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経障害には現在、対症療法しかなく症状の悪化を緩和させることが治療の中心だが、神経細胞移植で脱落した神経を再生し根治への道が開ける点、発生過程での神経走行構造形成に関わる分泌性因子の関わりに着目した点に独創性がある。見出した因子は移植細胞が目的の部位に適した状態で的確に定着、分化できるよう補える作用を持つことから併用治療などによりさらなる効果が期待できる。さらに今回個体レベルにおける移植前後の生体内での挙動を検証することにより、神経前駆細胞の運命決定機構、定着機構、神経ネットワーク形成機構のより深い理解につながる点に意義がある。

研究成果の概要(英文)：The hemiplegic mice whose motor cortex had been cryoinjured were subject to transplantation with NSPCs derived from human iPS cells. Another set of hemiplegic mice were injected with PBS as controls. This remedy for hemiplegia was evaluated by repeated beam walking tests and rotarod tests whether it was effective for recovery of their motor functions. To detect the grafted cells more clearly, we used human specific antibody staining. The grafts migrated from the striatum and reached to the injured cortex. The transplantation significantly improved their motor functions. The grafted cells distributed widely but appeared to have a tendency to accumulate predominantly near the damaged region at day 28. Reelin which regulated CNS development was expressed 1 day after cryogenic injury of right motor cortex. Our results suggest that neurons or paracrine factor may become applicable for restoring the motor functions of patients suffering from hemiplegia.

研究分野：生物学

キーワード：神経 移動 iPS

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

### 1. 研究開始当初の背景

神経外傷や脳内出血、脳梗塞から引き起こされた脳卒中や、脳神経細胞の変性と組織萎縮や、脳血管障害などで神経細胞が死滅することにより発症する認知症は、後天的に知覚機能が失われ、物忘れといった記憶障害や行動、意識障害、片麻痺を引き起こす。患者本人の日常生活に支障を来すだけにとどまらず、介護の面から治療をサポートする側にも負担がかかり、高齢化がすすむ日本においては認知症患者をはじめとする脳神経変性障害が増加していることから、大きな社会問題になっている。脳神経障害の治療における問題点として、まず、1 点目として、治療法の限界が挙げられる。現時点での治療薬としては神経変性の症状の進行抑制を目的とした薬しか存在せず根治的な治療法は確立されていない。この点で病因の除去という治療は通用しない。また、発症後の細胞消失の進行機構はまだ不明な点が多く、さらに中枢神経組織は有効な神経再生が生じ難いため、治療及び、発症後期に対する有効な治療法は乏しい。2 点目として、他の疾患と異なり、認知症は神経変性に伴い記憶や判断が欠落してしまうため著しく患者個人の QOL の低下と介護者、治療者さらには社会に対しての負担が生じる点である。従って、対症療法ではない治療法の開発が急務である。

治療の方向性、神経再生治療の可能性としては近年、難治性神経疾患の新規治療法として再生医療が注目されている。これまで成人脳神経細胞は再生能を持たないと考えられてきたが、脳室帯 (VZ) と脳室下帯 (SVZ) 海馬にて神経幹細胞が存在し神経細胞の新生が起きていることが示された。しかし病態を改善するほどではない。そこで失われた神経を細胞移植にて補う再生医療試験 (パーキンソンモデルラット、アルツハイマーモデルマウス、脳障害モデルマウス) が報告され、難治性神経疾患の治療に神経細胞移植が有効であることが示唆された。さらにヒトでの臨床試験で脊髄損傷完全麻痺患者への腸骨 (腰) 骨髄液移植による部分的な回復、加齢性紅斑変性症では iPS 由来細胞シートの臨床試験が報告され、難治性神経疾患の治療に神経細胞移植が有効であると示唆された。

神経細胞移植での治療効果を上げるためには、広範囲に渡る損傷部位に対して、移植した細胞が定着し、元のような複雑な高次構造、神経系ネットワークを適切に再構築することが必要と考えられる。申請者は、大脳皮質損傷による運動機能障害や、認知症モデルトランスジェニックマウス、脊髄損傷モデルに対して幹細胞由来神経細胞移植実験を行う上で、移植する細胞分化状態の検討、細胞形態の検討、移植する場所の検討を行った。その結果、幹細胞からある程度神経分化させた細胞を移植することで一定の損傷治療や認知機能改善効果を見出した。さらに適切な神経に分化した細胞シートが作製できることを報告した。これらの細胞は移植後にマウス脳に生着し、運動機能回復や認知機能改善傾向が見られた。今後ヒトや霊長類への応用を考える上で回復メカニズムに対する *in vivo* や細胞レベルでのさらなる検討が不可欠であり今回の研究課題の着想に至った。(参考文献 1, 2)。

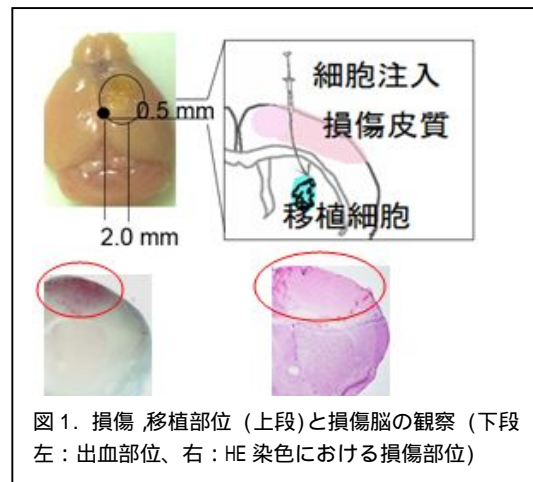
### 2. 研究の目的

神経細胞移植での治療効果を上げるためには、広範囲に渡る損傷部位に対して、移植した細胞が定着し、元のような複雑な高次構造、神経系ネットワークを適切に再構築することが必要と考えられる。そこで、幹細胞由来神経細胞移植実験において移植した細胞が神経損傷部位を再生する際の高次構造形成メカニズムについて解析し、新規再生治療法開発のための基盤となる実験を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞からの神経細胞分化誘導及び神経損傷モデルマウスへの移植と評価

hiPS 細胞は RIKEN Cell Bank ( cell name : 253G1, cell number : HPS0002 ) を用いた。培養方法は RIKEN Cell Bank の方法に従い、フィーダー細胞としてマウス繊維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast : MEF) を用いた。塩基性繊維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF) を添加することで培養を未分化な状態を保持しつつ行っている。hiPS 細胞を培養ディッシュから解離した後、bFGF を除いた培地に懸濁し、4 日間の浮遊培養によって胚様細胞塊 (embryoid body : EB) を作製した。次に EB をフィブロネクチンでコートした培養ディッシュに播種し 24 時間後培地を分化培地に交換し、同時にレチノイン酸 (retinoic acid : RA), ノジン (noggin : NOG), ソニックヘッジホック (sonic hedgehog : SHH) を加えた (1 次刺激)。48 時間培養後、再度 RA, SHH, NOG を加えた (2 次刺激)。24 時間後細胞を回収し、RNA を抽出する。RT 反応の後、PCR を行い神経分化関連遺伝子の mRNA の発現量を検討した。誘導してきた神経細胞の構成細胞比率の変化、遺伝子発現変化による性状解析を行うと同時に、今回着目している層構造形成に機能する因子の発現についても解析し、移植効率との発現の相



関を調べた。神経損傷モデルマウスと運動機能解析としては、大脳皮質形成：凍結損傷による片マヒモデルマウスを用い(図1)、運動機能の評価系として、Rota-rod法、beam walking試験を行った。実験解析スケジュールは図2に示した。

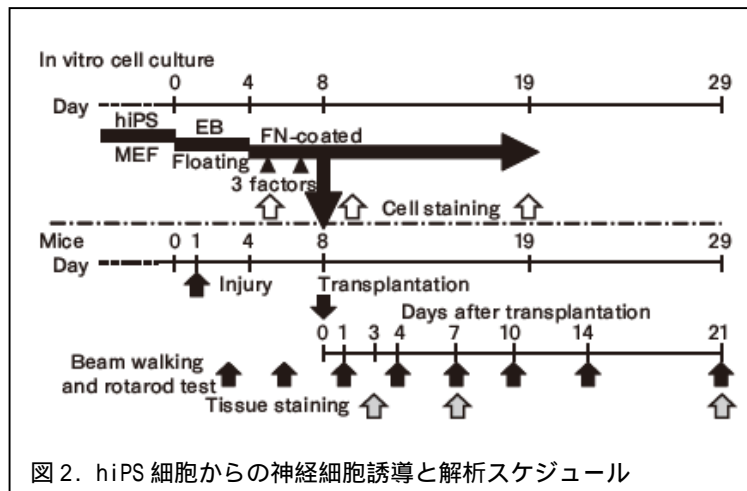


図2. hiPS細胞からの神経細胞誘導と解析スケジュール

モデルマウスに移植した移植細胞による再生における神経回路構築  
 移植した細胞がレシピエント内でどのような分子を発現し移植環境と神経ネットワークを形成しているのかについて移植後マウスは経時的に、ペントバルビタール大量投与により安楽死させたマウスをPBS, 4% パラフォルムアルデヒドの心臓還流によって固定した。さらにクリオスタットにより30 μmの切片を作成し、移植神経細胞の局在と分化させた細胞の性質を組織免疫染色により経時的に確認した。このとき、マウスとヒトの特異的神経マーカーを使い分け、マウス脳においてヒト由来の移植細胞が神経回路に組み込まれているかを確認した。皮質損傷モデルでの損傷部位における神経細胞の分布割合の変化、神経再生に関わる分泌性因子の候補としてのReelinの発現変動を解析した。

#### 4. 研究成果

RA, SHH, NOGを添加しhiPS細胞からの神経細胞分化を行い、神経の分化誘導に成功した(図3)。移植細胞は神経系分化系統の細胞が約80%を占めるが、細胞種類としてはヘテロである。移植後、運動機能改善したマウスが存在することから、移植治療研究としては許容範囲であると考えている(図4)。しかし、今後治療を視野に、改善に際して中心的な働きを持つ細胞の純化や、回復機構に影響する因子の同定を行う必要がある。

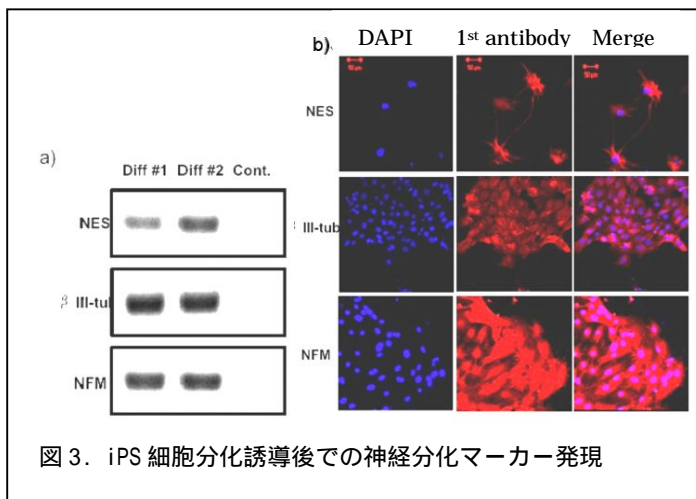


図3. iPS細胞分化誘導後での神経分化マーカー発現

移植群及びVehicle(PBS)注入マウスの脳凍結切片を各種抗体で免疫染色した。hiPS細胞由来神経細胞移植した切片についてはヒト特異的抗体hNuc, hNCAMにより移植細胞の定着を確認した(図5)。移植後3、7、14日頃までは移植マウスが移植部位である線条体に局在しているのがほとんどであったが、移植後21日以降において、移植部位とは異なる損傷皮質部位にヒトiPS由来神経細胞が存在しているのが確認された。運動機能回復が見られたマウスでは運動神経マーカー陽性細胞に分化し定着している事が確認された。

また、神経再生に関わる分泌性因子の候補として神経保護作用が示唆される分泌性因子であるReelinの発現を見ると損傷脳において損傷後7日まで発現上昇がみられ、損傷

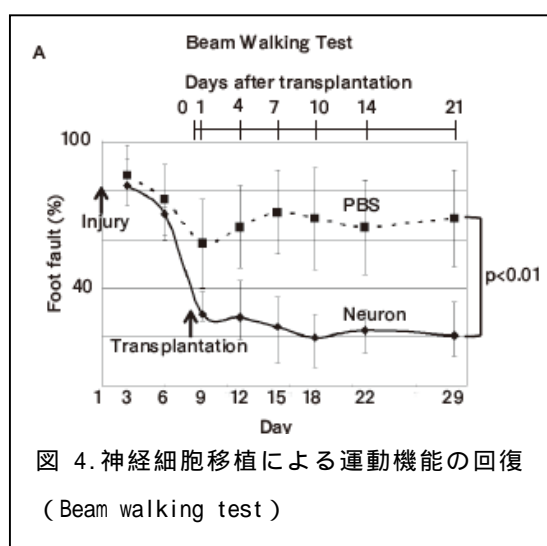
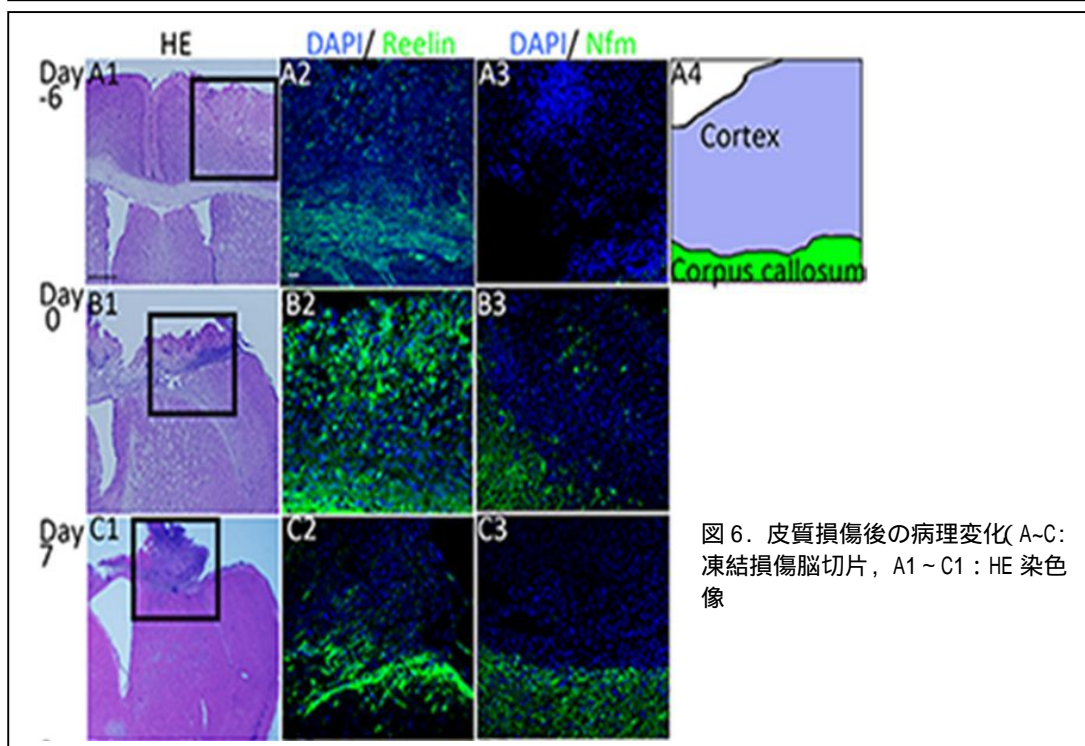
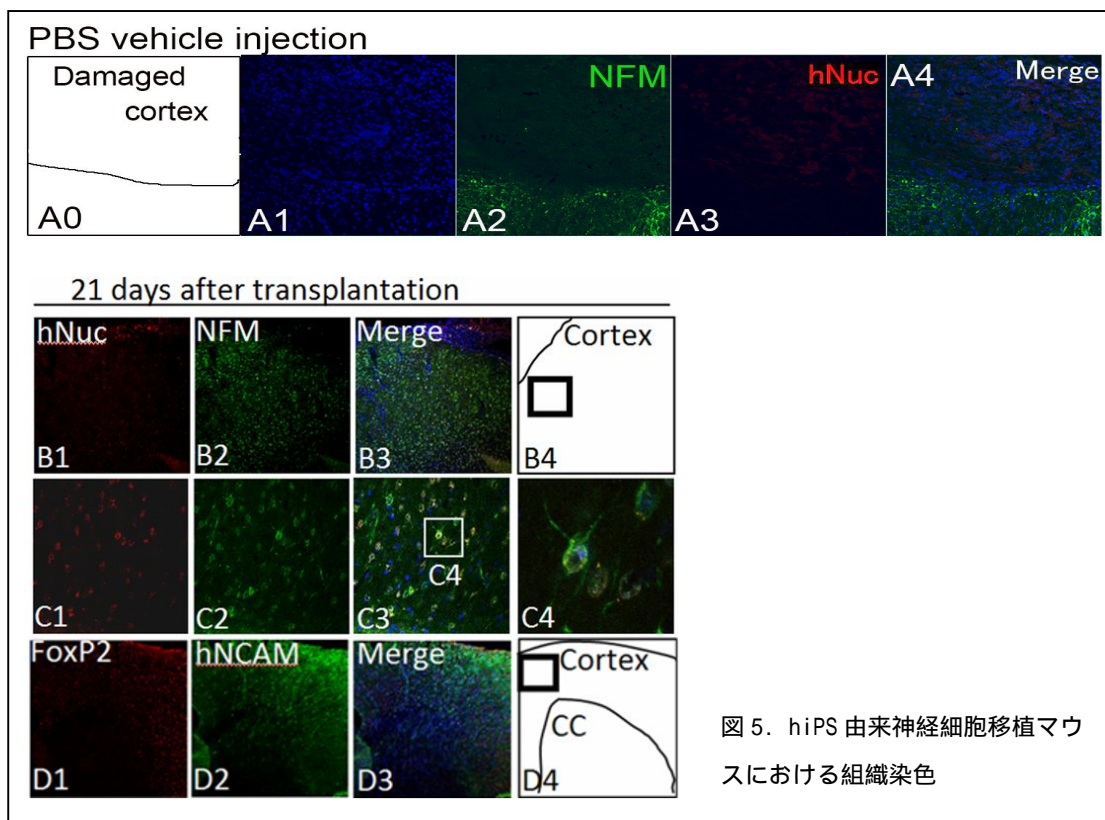


図4. 神経細胞移植による運動機能の回復 (Beam walking test)

なしに比べて発現量が多いものの、7日目のピーク後徐々に減少した。そのとき、NFM 陽性反応により同定されるニューロンの数は、凍結損傷翌日から著しく減少し、病変は縮小するものの一ヵ月以上減少した。



#### 参考文献

1. Hazama Y, Kurokawa MS, Chiba S et al. SDF1/CXCR4 contributes to neural regeneration in hemiplegic mice with a monkey ES-cell-derived neural graft. *Inflamm Regen* 2010;30:193–205.
2. Fujiwara N, Shimizu J, Takai K, Arimitsu N, Saito A, Kono T, Umehara T, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Restoration of spatial memory dysfunction of human APP transgenic mice by transplantation of neurons derived from human iPS cells. *Neurosci Lett*. 2013; 557: 129-134.

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3件)

1. Arimitsu N, Takai K, Fujiwara N, Fujiwara N, Ueda Y, Wakisaka S, Hirotsu C, Murayama MA, Suzuki T, Suzuki N. Roles of Reelin/Disabled1 pathway on functional recovery of hemiplegic mice after neural cell transplantation; Reelin promotes migration toward motor cortex and maturation to motoneurons of neural grafts. *Exp Neurology*, accepted. doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.112970, 査読有り
2. Suzuki N, Arimitsu N, Shimizu J, Takai K, Hirotsu C, Takada E, Ueda Y, Wakisaka S, Fujiwara N, Suzuki T. Neuronal cell sheet of cortical motor neuron phenotype derived from human iPS cells. *Cell Transplant*. 2017; 26:1355-1364. doi: 10.1177/0963689717720280, 査読有り
3. Arimitsu N, Shimizu J, Iinuma M, Umehara T, Fujiwara N, Takai K, Wakisaka S, Hirotsu C, Suzuki T, Beppu M, Niki H, Suzuki N. Human iPS cell derived neural cell sheets exhibit mature neural and extendable scaffold functions and promote recovery in injured mouse spinal cords. *J Stem Cell Res Med*. 2016; 1:41-47. doi: 10.15761/JSCRM.1000106, 査読有り

[学会発表](計 7件)

1. Nagisa Arimitsu-Nakata, Chieko Hirotsu, Kenji Takai, Jun Shimizu, Naruyoshi Fujiwara, Yoko Okada, Noboru Suzuki. Neural regeneration after transplantation of Neuronal cell sheet of cortical motor neuron phenotype. the 5th TERMIS-WC 2018.
2. Nagisa Arimitsu, Jun Shimizu, Kenji Takai, Naruyoshi Fujiwara, Chieko Hirotsu, Yoko Okada and Noboru Suzuki. NEURAL REGENERATION MECHANISMS IN TRANSPLANTATION OF NEURONAL CELLS DERIVED FROM HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS WITH THE EFFECT OF THEIR PARACRINE SECRETION. International society for stem cell research 14th annual meeting 2018.
3. 藤原成芳、岡田容子、高井憲治、廣津千恵子、高田えりか、有光なぎさ、清水潤、鈴木登. ヒト iPS 由来神経細胞移植による認知機能改善における改善メカニズムの解明, 第 17 回日本再生医療学会総会 2018.
4. Nagisa Arimitsu, Jun Shimizu, Kenji Takai, Naruyoshi Fujiwara, Chieko Hirotsu, Yoko Okada, and Noboru Suzuki. Reelin Signal Activation is Associated With Motor Function Recovery in the Neuron Transplantation of Hemiplegic Mice. the 51st Winter Conference on Brain Research (WCBR) . 2018.
5. 藤原成芳、岡田容子、高井憲治、廣津千恵子、有光なぎさ、高田えりか、清水潤、鈴木登. ヒト iPS 由来神経細胞移植による認知機能改善と改善メカニズムについての検討 第 16 回日本再生医療学会総会 2017.
6. 有光なぎさ, 廣津千恵子, 高井憲治, 藤原成芳, 岡田容子、清水潤, 鈴木登. 幹細胞由来神経細胞移植による脳損傷マウスにおける神経再生. 第 16 回日本再生医療学会総会 2017.
7. 有光なぎさ, 廣津千恵子, 高井憲治, 藤原成芳, 清水潤, 鈴木登. 脳損傷マウスに対する幹細胞由来神経細胞移植による神経再生. 第 39 回日本分子生物学会 2016.

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：有光 なぎさ

ローマ字氏名：Nagisa, Arimitsu

所属研究機関名：聖マリアンナ医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：40408688

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：