

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20957

研究課題名(和文)長期継代化した成体海馬由来神経幹細胞の機能解析と治療応用

研究課題名(英文)The study of functional analysis and therapeutic application of long-life neural stem cells derived from the adult hippocampus

研究代表者

吉岡 健人 (YOSHIOKA, KENTO)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：50758232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：成体海馬由来の神経幹細胞の機能維持に関する分子基盤情報の取得と長期培養された細胞の治療応用への検討のため、以下の研究を遂行した。(1) p38 活性阻害による神経幹細胞の機能維持を背景に、長期継代培養された神経幹細胞を蛍光タンパク質発現遺伝子でラベルし、大脳皮質傷害マウスへ移植したところ移植細胞は脳に生着し、腫瘍形成することなく神経に分化しうることが確認された。(2) 遺伝学、薬理学的阻害処理を伴わない、独自の神経幹細胞の長期機能維持法を確立した。

研究成果の概要(英文)：To know the molecular mechanism enabling the long-term maintenance of neural stem cells (NSCs) derived from the adult hippocampus and evaluate their possible therapeutic application, we conducted the following studies. (1) Based on the long-term maintenance of NSCs which might be promoted by p38 inhibition, the long-life NSCs labeled with fluorescent protein were transplanted into the cerebral cortex-injured mice. The transplanted cells were able to differentiate into neurons in the lesion area without tumorigenesis. (2) We have established a new method to maintain the activity of NSCs for a long time without either genetic disruption or pharmacological inhibition.

研究分野：医学

キーワード：神経幹細胞 p38 ポリイミド多孔質膜

1. 研究開始当初の背景

海馬・歯状回・顆粒細胞下帯は、成体脳における神経新生に関わる神経幹細胞(NSC)の存在領域として、側脳室周囲と共に認知されている。しかしながら、側脳室周囲由来の NSC が神経分化能を有したまま 10 継代程度の *in vitro* 培養が可能であるのとは異なり、成体海馬由来の NSC は、*in vitro* の環境において数継代以内に自己複製能を失い死滅するとともに、細胞調製直後から神経分化能を著しく減じ、分化誘導時にグリア細胞へ排他的に分化するようになる。そのため神経分化能を有した成体海馬由来 NSC の培養は極めて困難とされる。一方、p38⁻KO マウスを用いた解析によって、成体脳・海馬から調製した NSC の p38 活性を低下させることで NSC の長期継代培養が可能となることを見いだした。

こうした、従来困難とされていた成体海馬由来 NSC の長期培養を可能とする背景に存在する分子基盤情報の構築が必要とされると考え本研究の企画に至った。

2. 研究の目的

本研究は、従来困難とされていた成体海馬由来の神経幹細胞の長期培養を可能とする分子基盤情報の構築の一助を担うと共に長期継代培養された NSC の治療応用への可能性を模索すべく以下の項目について検討することを目的とした。

(1) p38 活性阻害により長期継代が可能となった成体海馬由来 NSC に安定的に蛍光タンパク質発現遺伝子を導入した後、大脳皮質傷害モデルに供し、治療効果の判定と組織構築過程を詳細に検討する。

(2) NSC の長期活性維持を可能とする分子メカニズムを解析し、介在遺伝子の網羅的検索を通してその分子基盤情報を構築する。

3. 研究の方法

(1) 蛍光タンパク質安定発現 NSC の作成

移植 NSC 等の脳内挙動を長期的に観察するために *in vitro* 増幅した NSC に蛍光タンパク質遺伝子を安定的に導入し、clone 化した細胞を作製した。

(2) 移植 NSC の動態観察

(1)にて作成した蛍光標識 NSC を大脳皮質傷害モデルに移植し、移植 NSC の生着性、分化能等を検討した。また、移植後の長期間観察を行い腫瘍形成の有無を確認した。

(3) 各 NSC の RNA の調製

通常培養条件下における成体海馬由来 NSC の機能消失が、p38 阻害により抑制される分子メカニズムを明らかにすべく、野生群(2 継代目)と長期維持された p38⁻KO 群(60 継代目)、p38 阻害剤群(60 継代目)の成体海馬由来

NSC から total RNA の調製を行い microarray に供することを検討していた。

(3)での RNA 調製に際し、野生型由来 NSC の調製方法を検討する中で、遺伝学的、薬理学的阻害処理を用いずに p38 活性阻害と同様に成体海馬由来 NSC を、長期にわたってその幹細胞性を維持することが可能となる 3D 培養法を樹立した。p38 の活性阻害による NSC の長期機能維持は成体海馬由来の NSC の機能解析や、治療への応用に対して重要な情報をもたらすことが考えられるが、さらに望むべき形としては、外来遺伝子導入や化合物添加なしに、成体海馬由来 NSC の機能維持を提供出来る培養系の樹立であると考えられる。そこで、当初の計画を一部変更し、以下研究計画を追加した。

(4) 野生型 NSC の新規長期継代培養法の樹立

野生型成体マウス海馬より調製した第一継代目の NSC を特殊な足場素材上に播種し、培地中で培養を行った。培養液は従来の NSC 培養に用いていたものと同じものを使用し、適宜新しい培地と交換を行い、培養を長期にわたり行った。その後、足場素材上で増殖した細胞の性質を免疫染色等を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 蛍光タンパク質発現標識された NSC の傷害モデルへの適用

In vitro 増殖された NSC に対し、蛍光タンパク質遺伝子を安定導入し、clone 化した構成的に蛍光タンパク質を発現する NSC を作成した。これら NSC は *in vitro* においては分化能を失っていないことが確認されているものの、生体内における振る舞いは不明であった。そこで、まず、すでに p38 活性阻害を用いた方法で大量培養された NSC を移植することで移植された NSC が生着、分化することが確認されている大脳障害モデルマウスに蛍光タンパク質発現標識した NSC の移植実験を行った。その結果標識された NSC の一部は傷害部位に生着し、神経細胞に分化することが見いだされた。一方で、その他の細胞種であるアストロサイトやオリゴデンドロサイトに分化した細胞を確認することはできなかった。これは、すでに我々が報告しているように、p38 活性阻害による長期継代培養によって NSC の神経分化能が亢進しているとともに、遺伝子導入から clone 化の過程で *in vivo* での分化能に対して何らかの影響があったためではないかと考えられる。そこで、新たに入手した構成的に全身緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するマウスより NSC を調製し、再度 *in vivo* での分化能等を検討する予定である。一方で、作成した蛍光タンパク質発現標識 NSC を移植後の長期間観察では移植 NSC による腫瘍形成は認められなかった。

(2) 各 NSC の RNA の調製

p38 活性阻害に基づき長期機能維持が可能

となった NSC および、後述の(3)の新たな手法による長期継代化野生型 NSC から、すでに total RNA を調製しており、対照群と併せて今後転写因子を中心に解析を進める。

(3)野生型 NSC の新規長期継代培養法の樹立

(2)における野生型成体海馬由来 NSC の機能維持に対する検討の中で、細胞培養に用いる細胞の足場がその機能維持に重要な役割を果たしていることを見だし、野生型由来であるにもかかわらず、長期培養が可能となる可能性を見いだした。培養方法の検討の結果、ポリイミド多孔質膜を細胞培養の足場素材として用い成体海馬由来 NSC を培養することにより、少なくとも数ヶ月は細胞培養が可能であることが観察された。ポリイミド多孔質膜を用いて培養された NSC は増殖を継続し、ポリイミド多孔質膜上で細胞塊を形成した。この細胞塊はある程度の大きさに成長するとポリイミド多孔質膜より遊離し、培養液中に放出されることが観察された。従って、ポリイミド多孔質膜内外で細胞増殖可能な空間が適宜確保されることとなる。ポリイミド多孔質膜上で NSC がどのように増殖しているか DNA 合成を指標に EdU ラベルを用いて検討した結果、NSC はポリイミド多孔質膜上だけでなく、多孔質膜内部でも増殖を行っていることが観察された。また、ポリイミド多孔質膜上で培養された NSC が幹細胞性を維持しているか否かを経時的に確認した。その結果、少なくとも数ヶ月間は幹細胞性を維持していることが確認された。具体的には長期間培養されたにもかかわらず、NSC は幹細胞マーカーである SOX2, nestin 陽性であり、また、分化能についても神経、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、それぞれのマーカー分子 (MAP2, GFAP, O4)陽性細胞に分化しうることが確認された。また、この幹細胞性の維持は細胞塊がポリイミド多孔質膜から遊離した後であっても少なくとも数日は保持されていることも確認された。また、このポリイミド多孔質膜を用いることによって多分化能を失った NSC が幼若性を取り戻すことが可能か否か検討したところ、一度多分化能を失った細胞はポリイミド多孔質膜上での培養を続けても、神経分化能を回復しないことが観察された。従って、ポリイミド多孔質膜を用いた NSC の培養では、幹細胞性の維持は可能であるが、幹細胞性の回復は困難であると考えられた。

このポリイミド多孔質膜を使用した培養方法を用いることによって、p38 の活性阻害と同等もしくはそれ以上に NSC の幹細胞性を維持しうることが示唆された。これらの結果を受け、今後 p38 阻害培養法によって維持された NSC と今回見いだされた新規長期継代培養法を用いて維持された NSC、二つの異なるアプローチによって同様の結果を得た二種類の NSC を比較することにより、NSC の機能維持に対するより中心的な情報が得られることが期待される。

また、すでに NSC で満たされているポリイミド多孔質膜に対し同じポリイミド多孔質膜を重ねることにより、NSC をポリイミド多孔質膜間で移

動させうることも見いだされた。この転移した細胞もまた NSC としての機能を維持しており、増殖能、分化能、ともに元のポリイミド多孔質膜上の NSC と同程度有していることが確認された。これらは、このポリイミド多孔質膜を用いた NSC の省スペースでの大量培養の可能性を示唆するものと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 1 件)

Umezawa H, Naito Y, Tanaka K, Yoshioka K, Suzuki K, Sudo T, Hagihara M, Hatano M, Tatsumi K, Kasuya Y. (2017) Genetic and pharmacological inhibition of p38 improves locomotor recovery after spinal cord injury. *Front Pharmacol.* 2017 Feb 17;8:72. (査読有) DOI: 10.3389/fphar.2017.00072

(学会発表) (計 1 件)

吉岡健人、並木香奈、須藤龍彦、幡野雅彦、粕谷善俊 成体海馬由来の神経幹細胞の大量培養法 第 90 回日本薬理学会年会 2017 年 03 月 15 日 長崎

(産業財産権)

出願状況 (計 2 件)

名称:神経幹細胞の分化を抑制する方法、神経幹細胞を調整する方法、及び神経幹細胞を分化誘導する方法

発明者:粕谷善俊、吉岡健人、萩原昌彦

権利者:千葉大学/宇部興産株式会社 (50/50)

種類:特許

番号:特願 2017-057635

出願年月日:2017 年 3 月 23 日

国内外の別: 国内

名称:神経幹細胞の分化を抑制する方法、神経幹細胞を調整する方法、及び神経幹細胞を分化誘導する方法

発明者:粕谷善俊、吉岡健人、萩原昌彦

権利者:千葉大学/宇部興産株式会社 (50/50)

種類:特許

番号:PCT/JP2018/11492

出願年月日:2018 年 3 月 22 日

国内外の別: 国外

(その他)

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.jp/dept/shikkanseimei/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉岡 健人 (kento, yoshioka)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号:50758232

- (2)研究分担者
()
- (3)連携研究者
()
- (4)研究協力者
()