

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01378

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞由来神経移植による認知機能回復の試みと神経再生メカニズムの解析

研究課題名（英文）Transplantation of Human iPS cell derived neurons to Dementia model mice

研究代表者

藤原 成芳（Fujiwara, Naruyoshi）

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：50365425

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）：認知症マウス海馬ではReelinとリン酸化Dab1の低下を認め、その結果EphrinB/EphBの低下を認める。認知症海馬に移植された神経幹細胞はReelinを産生し、その下流のDab1とAktをリン酸化させるが、その下流でさらにシナプス形成を活性化させ神経回路を再構築させることを見出した。神経幹細胞移植はReelinとともにEphrinBの産生亢進をもたらしてシナプス形成をもたらす可能性が高い。具体的にはReelin刺激の存在下にEphrinB3はApoER2と複合体を形成してシナプス形成するが認知症海馬ではここに異常があり、シナプス形成不全をもたらす可能性を初めて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内外の多くの研究者は認知症モデル動物を用いて神経細胞移植での根治療法を探っている。ヒトへの臨床応用については免疫拒絶反応の問題が発生し、さらに倫理的な観点からの問題も研究遂行の障壁となる点が存在する。ヒトへの応用を第一に考え、我々は本研究においてhiPS細胞を用いることを提案している。

本研究は認知機能の改善に神経幹細胞移植の効果を認知症マウスで試みる研究として世界的に先頭を走ると考えている。認知症の根治療法の開発は認知症患者のみならず、介護にあたる家族にとっても悲願である。本研究は認知症による経済的損失解決のためにも全世界に貢献できるものと考えている。

研究成果の概要（英文）：In the hippocampus of dementia model mice, Reelin and phosphorylated Dab1 decreased, and as a result, EphrinB/EphB is decreased. We found that neural stem cells transplanted to the hippocampus of dementia mice produce Reelin and phosphorylate Dab1 and Akt downstream thereof, further activate synapse formation and reconstruct neural circuits downstream. Neural stem cell transplantation, together with Reelin, is likely to result in increased production of Ephrin B and synapse formation. Specifically, in the presence of Reelin stimulation, Ephrin B3 forms a complex with ApoER2 to develop synapses in normal mice, and there is the abnormality in the hippocampus of dementia mice, which may lead to synaptic hypoplasia.

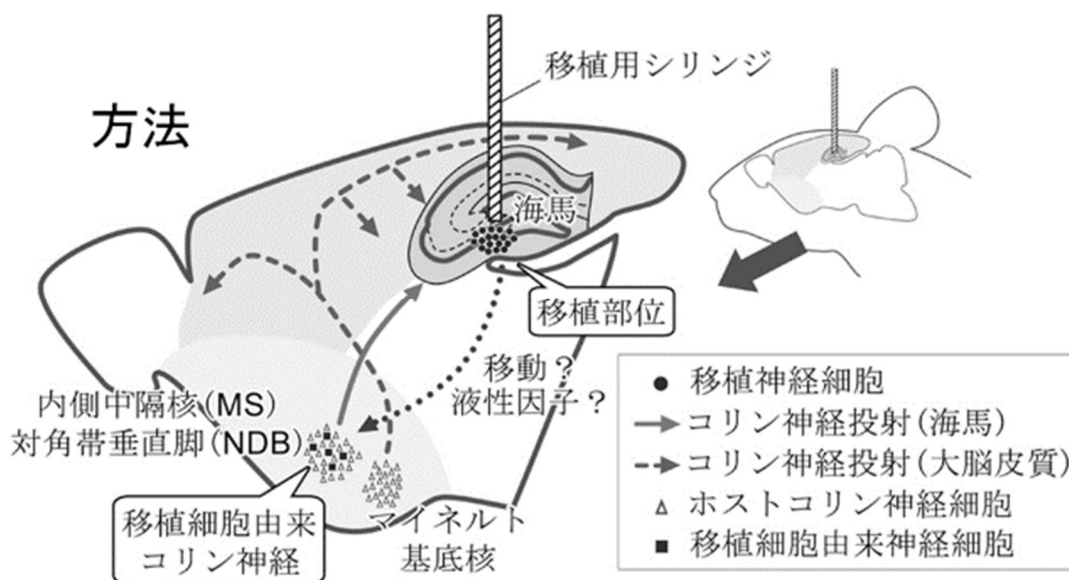
研究分野：再生医学

キーワード：認知症 神経幹細胞 reelin シナプス Disabled1 EphrinB

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

認知症は後天的な脳神経の脱落により起こる記憶、判断、知覚等の機能が低下する病気であり、厚生労働省(2013年)によるとその患者数は2025年には470万人(日常生活自立度II以上)を越えると推計されている。世界推計では2050年には患者数は1億3000万人になると言われており(World Alzheimer Report 2015)既に大問題になっている。現在、我が国(あるいは世界)で用いられている認知症治療薬は対症療法薬のみであり、根治につながる治療薬は未だ存在しない。現在研究されている治療薬のターゲットの多くはアミロイド仮説に基づいたアミロイド(A)であるが、ワクチン、抗A抗体ともに開発は頓挫している。これについてはアミロイド仮説の信憑性を疑う意見や疾患の発症時には既に大量のAが蓄積(蓄積開始から数年~数十年の間があると思われる)しており、治療のタイミングを逸している等の議論がされている。従って研究の方向性は従来の研究に加え、早期発見のための診断方法や、早期治療におけるAを対象にした治療薬の開発等も並行して行われる事が予想されるが、引き続き、中~重度の認知症に対しての根治的治療薬の開発も行っていくかなくてはならないと考えている。最も、根治を目的とした治療薬を研究・創薬する上で必要な疾患原因については、アミロイド仮説及びタウ仮説が議論されている状況もあり、定説が無い事も創薬の対象をどこに持って行くべきなのか確定できない点でもある。これらの状況から我々の研究チームは神経移植に着目し、認知症モデルマウスにヒトiPS細胞から分化誘導した神経細胞を移植し認知機能改善を改善する系を確立し、神経移植療法の有効性について報告してきた(Suzuki, Fujiwara et. al., 2016)。これまでの結果は、神経移植により認知機能が回復する。コリン作動性神経と7nAChR受容体発現細胞、GABA作動性神経とGABAA受容体発現細胞がそれぞれ海馬及び大脳皮質で分化・生着していることが判明しているが、詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多い(Suzuki, Fujiwara et. al., 2016, 2017)。

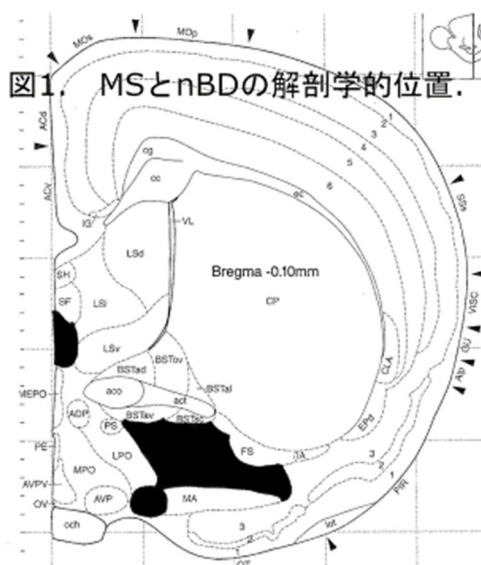


## 2. 研究の目的

これまで多くの研究者がアルツハイマー型認知症モデルを用い、マウス幹/前駆細胞、ヒト神経幹/前駆細胞、マウス/ヒト間葉系幹/前駆細胞、マウス iPS 細胞等を脳に移植し認知機能改善の研究を行ってきた。しかしながら、私は再生医療を将来的にヒトに用いるためには hiPS 細胞を用いる（用いて研究する）のが最適であると考え研究を行ってきた。マウスにヒト由来の神経を適用することは拒絶等の問題があるが、私は免疫抑制剤を用いる移植と移植したヒト由来神経細胞をマウス脳で観察する系をこれまでに確立している（Fujiwara et. al., 2013, 2015）。これまで hiPS 細胞を使った研究や臨床試験は加齢黄斑変性症、パーキンソン病、脊髄損傷に対して行われているが、認知症治療に対しては研究が進んでおらず、私の構築した実験系がヒト iPS 細胞由来神経移植による認知症治療研究において大きく寄与できるものと考えている。ヒト iPS には ES 細胞ほどの倫理的な障壁もなく、また移植される本人から作製されれば拒絶の問題も非常に小さく、これは大きな利点であると考え。それらを考慮した上で、研究代表者のこれまでの研究では、hiPS 細胞から誘導した神経（前駆）細胞を用いた移植療法を行い認知機能改善の可能性を示してきた（Fujiwara et. al., 2013, 2015）。当初は移植部位及び移植細胞に着目し実験を行ってきたが、より詳細に解析するに従い、海馬コリン神経の起始核である内側中隔とブローカの対角帯垂直部におけるコリン神経細胞の再生とコリン神経の軸索伸張（投射）という移植部位とは少し離れた場所での神経再生を示唆するデータを得た。移植により移植細胞のみならず移植脳においてどのような変化が見られるのかについて遺伝子レベル、分子レベルで検討を行うことは移植療法に必要な情報、あるいは副作用を理解するための有益なデータが得られると考えている。特に海馬への神経移植により内側中隔とブローカの対角帯垂直部におけるコリン神経細胞がどのようにして再生し、どのように（どこに）神経投射するのかを明らかにすることは神経移植における神経再生メカニズムの一端を解明するものであり、研究することに大きな意義が有ると考える。

## 3. 研究の方法

これまで構築した実験系に従い、認知症モデルマウスへの移植を行った。移植後、モリスの水迷路（Morris water maze: MWM）による認知機能の改善状況の確認の後、各マウスから脳サンプルを複数得た。



脳サンプルを移植部位中心(海馬近傍)に解析した。認知機能の回復したマウス及びコントロールマウス(PBS投与群)の脳サンプルを回収した後、免疫組織染色を中心に移植神経(特にChAT陽性コリン神経)がどのように軸索を伸張させているか検討した。認知機能回復マウス脳内における神経再生の状態を明らかにする。

具体的には、ホストの神経と移植神経の神経回路形成について検討した。抗マウス抗体と抗ヒト特異的抗体(抗ヒトニューロフィラメント(hNFM)抗体、抗ヒト核(hNuc)抗体等)を使い分け、移植神経とホストの神経を観察した。神経終末のシナプシンあるいはシナプトフィジンに対する抗体と併せて免疫染色を行うことで、シナプス結合について確認できた。移植神経細胞が移植神経細胞間でシナプスを形成し全く新しい神経回路を形成している可能性と、移植神経細胞がホストの神経細胞とシナプスを形成してホストの神経回路を再生している可能性について検討した。これまで、1)内側中隔とブローカの前角対角帯垂直部におけるコリン神経細胞が海馬あるいは大脳皮質への投射が認知機能と関連していること、2)認知機能における嗅内皮質-海馬経路の神経伝達が認知機能の維持に重要であることが報告されている。我々の移植は海馬・歯状回hilus部位へ行っており、これまでの観察も移植部位である海馬近傍を中心に行っているが、認知機能が回復したマウスの中に移植部位とは遠くに位置する内側中隔とブローカの前角対角帯垂直部に移植細胞由来神経細胞の局在が見られる脳サンプルが存在する。そこで内側中隔とブローカの前角対角帯垂直部の免疫組織染色データ(コリン神経を中心に)を収集し認知機能回復との関連性を検討した。

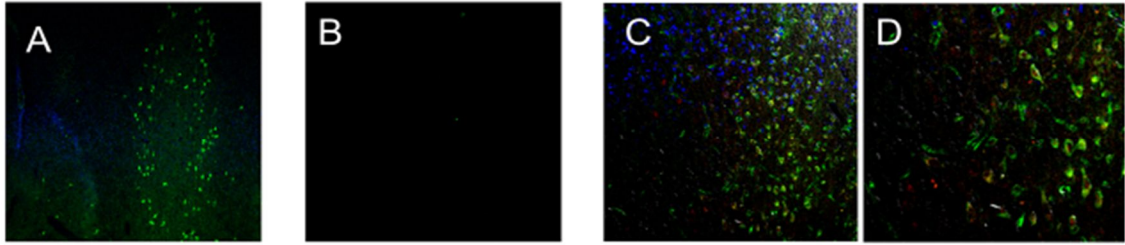
#### 4. 研究成果

本研究では認知症マウスへの神経幹・前駆細胞移植を行い、モリスの水迷路試験を用いて認知機能の改善状況を評価したうえで神経細胞移植による神経再生機構の解明を行った。コリン作動性神経細胞が顕著に減少している認知症マウスへのヒトiPS細胞から分化誘導した神経幹・前駆細胞の移植を行った。これらはコリン作動性神経に分化することが再現された。認知機能の改善が認められたマウスの移植後の脳は、海馬コリン神経の起始核である内側中隔とブローカの前角対角帯垂直部においてヒト核蛋白陽性とヒト核蛋白陰性の両者のコリン神経細胞の再生を認めた。

移植後マウス脳では内側中隔核とブローカの前角対角帯垂直部で移植神経細胞由来のコリン作動性神経のみでなく、マウス由来の内因性のコリン作動性神経が再生・分化していたが、その細胞数はかなりの幅を持っている。すなわち、ヒトiPS細胞由来のコリン作動性神経が多数を占めるマウス脳とほとんどがマウス由来の内因性のコリン作動性神経であるマウス脳がある。これらの成績からは、神経細胞移植は、移植細胞の分化・生着をもたらすことを示している。そして、おそらくは神経の再生・分化を促進するメカニズムを併せ持っており、内因性のマウスのコリン作動性神経の出現をもたらした。

これらはコリン神経はその投射先は現時点では明らかではないが、軸索伸長(投射)していた。今後は、神経細胞に浸透する蛍光プローブである神経トレーサーを用いて、移植細胞のみならず、再生したマウス由来の内因性のコリン作動性神経がどのように軸索を伸張させているのか、投射するかを評価する。

図 2. 正常マウス MS(A) 認知症マウス(移植なし)MS(B) 神経細胞移植後 MS(C)と  
その強拡大(D)  
CAT 抗体 (緑色) とヒト核蛋白抗体 (赤色) で二重染色



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimizu J, Kubota T, Takada E, Takai K, Fujiwara N, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N.	4. 巻 38
2. 論文標題 Relative abundance of Megamonas hypermegale and Butyrivibrio species decreased in the intestine and its possible association with the T cell aberration by metabolite alteration in patients with Behcet's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Rheumatol	6. 最初と最後の頁 1437-1445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10067-018-04419-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Arimitsu Nagisa, Takai Kenji, Fujiwara Naruyoshi, Shimizu Jun, Ueda Yuji, Wakisaka Sueshige, Hirotsu Chieko, Murayama Masanori A., Suzuki Tomoko, Suzuki Noboru	4. 巻 320
2. 論文標題 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	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 112970 ~ 112970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2019.112970	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki N, Shimizu J, Takai K, Arimitsu N, Suzuki T, Fujiwara N.	4. 巻 1
2. 論文標題 Cellular and Molecular Mechanisms Governing Functional Recovery of Dementia Mice after Neuronal cell Transplantation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience and Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31021/jnn.20181103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu J, Kubota T, Takada E, Takai K, Fujiwara N, Arimitsu N, Murayama MA, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N	4. 巻 20
2. 論文標題 Propionate-producing bacteria in the intestine may associate with skewed responses of IL10-producing regulatory T cells in patients with relapsing polychondritis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0203657
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0203657	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki N, Arimitsu N, Shimizu J, Takai K, Hirotsu C, Takada E, Ueda Y, Wakisaka S, Fujiwara N, Suzuki T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Neuronal cell sheets of cortical motor neuron phenotype derived from human iPSCs.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Transplant.	6. 最初と最後の頁 1355-1364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0963689717720280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki N, Shimizu J, Takai K, Arimitsu N, Suzuki T, Fujiwara N.	4. 巻 1(2)
2. 論文標題 Cellular and Molecular Mechanisms Governing Functional Recovery of Dementia Mice after Neuronal cell Transplantation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience and Neurosurgery.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Fujiwara Naruyoshi, Takai Kenji, Shimizu Jun and Suzuki Noboru
2. 発表標題 A STUDY ON THE IMPORTANCE OF REGENERATION OF GABAERGIC NEURONS IN RESTORING COGNITIVE FUNCTION BY HIPS DERIVED NEURAL CELL TRANSPLANTATION TO DEMENTIA MODEL MICE.
3. 学会等名 International society for stem cell research 14th annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原 成芳, 村山 正承, 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
2. 発表標題 神経移植による認知機能回復における神経再生及び回復メカニズムの解明
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujiwara Naruyoshi, Takai Kenji, Shimizu Jun and Suzuki Noboru.
2. 発表標題 RESTORATION OF REELIN/APOER2 INTERACTION RESTORE COGNITIVE DYSFUNCTION OF DEMENTIA MODER MICE AFTER TRANSPLANTATIOB OF HUMAN IPS CELL-DERIVED NEURAL STEM/PRECURSOR CELLS.
3. 学会等名 International society for stem cell research 13th annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----