

令和 4 年 8 月 26 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09009

研究課題名(和文) Reelin/Disabled/GSK3経路修復による片麻痺の新規治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel therapy for hemiplegia through repair pathways of Reelin/Disabled/GSK3.

研究代表者

高井 憲治 (Takai, Kenji)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：60121167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本邦脳血管疾患患者数は近年減少しているが100万人を越え、年発症2万人を見る(厚労省2017)。リハビリテーションや介護は本人・社会の負担となり、現下の治療法：急性期神経変性の抑制でも変わらない。そこで、ヒトiPS細胞由来またはマウスニューロスフェア細胞などの神経前駆細胞(NSPCs)の移植で根治的治療を行えないか、マウスの移植実験を行った。実験的に大脳皮質運動野を損傷して片麻痺とし、NSPCsを損傷部下部の線条体に移植すると運動機能が回復した。このメカニズムを探るため、大脳皮質の発生期に重要な役割を果たしているReelinに着目し、これが成体マウスでも神経再生に係わっていることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳血管疾患に対して、ヒトiPS細胞由来あるいはマウスニューロスフェア細胞などの神経前駆細胞(NSPCs)の移植によって根治的治療を行えないか、マウスの移植実験を行った。疾患モデルは、マウスの大脳皮質運動野の凍結損傷とし、移植細胞としてはヒトiPS細胞、あるいはマウスニューロスフェアを用いた。iPS細胞を用いることは、ES細胞を用いることに対する免疫学的・倫理的問題や細胞ソースの問題をクリアできる。マウスニューロスフェア細胞については、移植細胞とした場合、回復過程の起点と考えられるDab1遺伝子knockoutマウスに相当するyot/yotマウスを用いて、これと比較が出来るという理由による。

研究成果の概要(英文)：Although the number of patients with cerebrovascular disease in Japan has been decreasing in recent years, it has exceeded 1 million, and 20,000 new cases are seen every year. It requires rehabilitation and long-term care, which is a burden on the person and society, and the current treatment method: suppression of acute neurodegeneration does not change. Therefore, we conducted a mouse transplantation experiment to see if radical treatment could be performed by transplanting neural stem/progenitor cells (NSPCs) derived from human iPS cells or mouse neurosphere constituent cells. The motor area of the cerebral cortex was experimentally damaged to cause hemiplegia, and when NSPCs were transplanted into the striatum below the injured area, motor function was restored. To explore this mechanism, we focused on Reelin, which plays an important role in the developmental stage of the cerebral cortex, and confirmed that it is also involved in nerve regeneration in adult mice.

研究分野：再生医学

キーワード：大脳皮質運動野損傷 片麻痺 細胞移植治療 ニューロスフェア Reelin Disabled1 yotariマウス 神経再生

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

わが国の脳血管疾患が現下の治療法：急性期神経変性の抑制でもリハビリテーションや介護を免れず本人・社会の大きな負担となっていることに鑑み、根治的治療法の開発を目指したい。1つの方向として細胞移植があり、移植細胞の候補として iPS 細胞があり、少なくとも神経前駆細胞に分化誘導する必要がある。今一つの候補としてニューロスフェア細胞を用いることが考えられた。前者の細胞が臨床応用にはより近いが、ニューロスフェア細胞は神経系の細胞に分化していることは明らかなので、前者の実験のコントロールになると考えられる。以上の細胞移植が治療効果を持つことが明らかになったとして、しかし、大脳皮質への細胞移植は侵襲性が高い。そこで、細胞移植におけるメカニズムを探求し、細胞移植によらない治療法を探りたい。神経系の **regeneration** に関与していると考えられているタンパク質に **Reelin** があり、その細胞内アダプタータンパク質である **Dab1** の遺伝子欠失マウスである **yotari** (理研細胞バンク、自然突然変異系統) を正常マウスと比較する。

### 2. 研究の目的

片麻痺に対して、ヒト iPS 細胞由来あるいはニューロスフェア構成細胞などの神経前駆細胞の移植による治療法を開発する。実験的片麻痺モデルマウスを作製し、これらの細胞移植によって運動機能の回復が行えることは確認できたので、次に、回復過程のメカニズムを探り、薬剤投与など侵襲性の低い治療の可能性を探求する。ヒト iPS 細胞由来あるいはマウスニューロスフェア構成細胞などの神経前駆細胞 (NSPCs) の移植で根治的治療を行えないか、マウスへの移植実験を行った。ヒト iPS 細胞を用いることは、ES 細胞を用いることに対する代替法であるが、ニューロスフェアを用いることについては、移植細胞による回復過程における **Dab1** 遺伝子 **knockout** マウスに相当する **yotari** (**yot/yot**) マウス、これと正常マウスの比較が出来るという理由による。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験的片麻痺モデルマウス

金属棒を液体窒素で凍結し、C57BL/6 マウスの大脳皮質運動野を覆う右頭頂骨に穿頭孔を開けて金属棒を当て大脳皮質を損傷して作製。

#### (2) **yotari** (**yot/yot**) マウス

理研バイオリソースセンターより入手。C57BL/6Jc1 バックグラウンドをもつ。Dab1 の自然突然変異マウス。Dab1 遺伝子領域に欠失および DNA fragment の挿入があり、Dab1 機能は欠損。ホモ個体には、振戦、震え歩行などが見られ、誕生後 2~3 週で死亡。yotari マウスは以下の実験スキームで使用した。

- ① **yot/yot** マウスからニューロスフェアを作製してもその細胞には Dab1 機能が欠損していることから、片麻痺マウスに移植しても運動機能の回復は見られないことが予想される。
- ② **yot/yot** マウスから作製されたニューロスフェアの構成細胞に Dab1 DNA を transfect し、さらに神経細胞への分化刺激を与えて運動神経マーカーが出現するかどうか。
- ③ Dab1 欠損の効果は海馬にいかなる結果を起しているか、組織学的および免疫組織学的な観察結果を示した。

#### (3) ヒト iPS 細胞から神経前駆細胞 (NSPCs : neural stem/progenitor cells) への分化誘導

理研細胞バンク、HPS0002 : 253G1 株。Oct3/4、Sox2、Klf4 導入。培養未分化 hiPS コロニーを浮遊培養によって EB 化 (胚様体 embryoid 形成) し、fibronectin コートしたウェルプレートに付着培養 4 日、この間に retinoic acid、sonic hedgehog、noggin を 2 回添加して、得られた細胞群を NSPCs とした。

#### (4) ニューロスフェア

**yot/yot** マウスおよび正常マウスの大脳組織の細胞からニューロスフェアを形成させ、得られた細胞群を NSPCs とした。

#### (5) 片麻痺マウスへの NSPCs の移植

ヒト iPS 由来、あるいはニューロスフェア構成細胞を片麻痺マウスの脳損傷部下部、線条体領域に注入移植した。

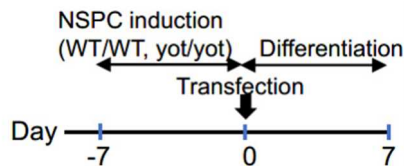
#### (6) 片麻痺マウスの運動機能評価

回転棒 rotarod test と平均台歩行 beam wakening test を課して運動機能評価スコアを得た。

#### (7) **yot/yot** マウスニューロスフェア細胞への Dab1 遺伝子導入による運動神経への分化

expression vector による Dab1 DNA の yot/yot マウスニューロスフェア細胞への transfect 後、運動神経への分化刺激を与えて運動神経への分化が行われるか調べた (図 1)。

図 1. yot/yot マウスニューロスフェア細胞と分化。



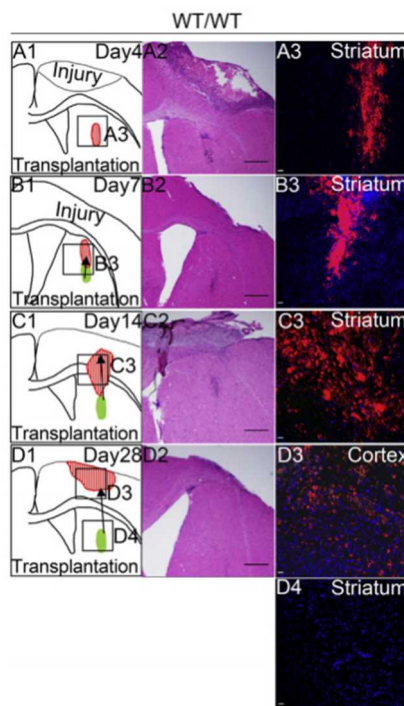
(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験の際には「カルタヘナ法」を厳格に遵守する。また国の定める遺伝子組み換え生物等の規制による生物の多様性の確保に関する法律、研究開発等にかかる遺伝子組み換え生物等の第2種使用等に当たってしかなるべき拡散防止措置等を定める省令に従う。

マウスやラットなどの動物を用いた実験は、実験前の飼育、実験中、実験後にいたるまで、科学的かつ倫理的に対処し、動物の苦痛を排除するための麻酔による安楽死などの手法を用いる。本学動物実験審査委員会の承認はすでに得ている。組換え DNA 分子および組換え DNA 導入動物は、適当と判断される物理的封じ込め方法を採用する。組換え DNA 実験に関しても本学遺伝子組換え実験安全委員会の審査を受け承認されている。

この研究計画は既に樹立され理研より購入したヒト iPS 細胞を用いており、倫理的な対応は既に済んでいる。人権の保護、個人情報の取り扱いについて、聖マリアンナ医科大学の生命倫理委員会による審査及び承認を受け、ヘルシンキ宣言、個人情報保護法、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に適正に従う。人権保護や、安全の徹底を行い、生命の尊厳及び人権を尊重して行う。

図 2. ニューロスフェア細胞群の損傷部への遊走  
赤楕円形で示される移植細胞が脳損傷部へ遊走している。



#### 4. 研究成果

##### (1) 片麻痺モデルマウスへの NSPCs の移植

片麻痺モデルマウスの大脳皮質損傷部下部の線条体に WT/WT 由来ニューロスフェア細胞を移植すると、移植細胞の損傷部への遊走が見られたが、yot/yot 由来ニューロスフェア細胞を移植した場合には、移植細胞の損傷部への遊走が見られなかった。(図 2. Arimitsu ら (2019) より引用) マウス片麻痺に対する、サル ES 細胞由来の神経前駆細胞の移植で、損傷部のグリア細胞から分泌される stromal cell derived factor (SDF) 1 による移植細胞の遊走が見られた (Hazama ら 2010)。移植細胞はケモカイン SDF1 のレセプター CXCR4 を備え、LICAM 等の接着因子の発現を増強し遊走に関与したと考えられる。ここでは yot/yot マウスは Dab1 を欠いているので、移植細胞の Dab1 は損傷部への遊走に関与し、さらに Dab1 自体は Reelin のアダプタータンパク質であるので、Reelin には、損傷部への遊走機能を含んだ Dab1 から始まる応答系が備わっていると考えられる。

移植細胞は、さらに、運動機能の回復をもたらした (図 3. Arimitsu ら (2019) より引用)。ここには運動ニューロンへの分化発現が、樹状突起の発達や軸索伸長などを伴って続いたことが推定される。

##### (2) Dab1 knockout マウスとしての yotari マウス (yot/yot) の特徴

yot/yot マウスは Dab1 遺伝子に欠失があり、かつ同遺伝子領域に、Dab1 に無関係な DNA fragment の挿入があり、Dab1 機能が欠損した自然突然変異マウスである。このマウスで発現されていないことは、逆に Dab1 の機能を示していることになる。1つは上記(4.1)で述べたように、yot/yot マウスからニューロスフェアを作製して片麻痺マウスの線条体に移植しても、その細胞には Dab1 機能が欠損していることから、正常マウスのニューロスフェア細胞を移植した場合に見られた損傷部への遊走が見られない。つまり、Dab1 には、それを発現する神経前駆細胞に、神経損傷部への遊走機能を持たせる働きがあると言える。

また、Dab1 が Reelin のアダプタータンパク質であることと、Reelin の機能として、大脳皮質形成の発生期に層状構造の形成機能があることから、これは Dab1 の機能とも見なされる。ま

図3. ニューロスフェア細胞移植による片麻痺マウスの運動機能の回復

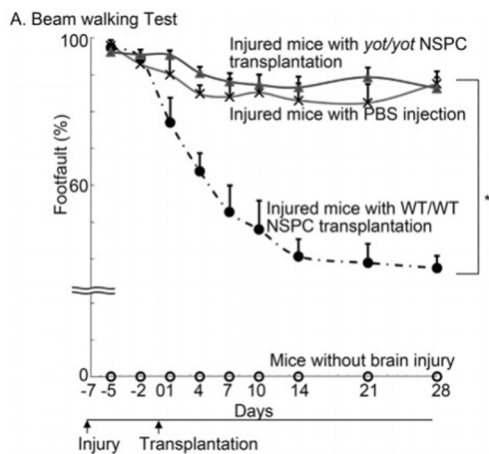
た Dab1 には大脳皮質のみならず、層構造を形成する海馬、小脳、あるいは核構造を形成する脳幹、脊髄等の神経細胞の配置を正常に行う機能があることが知られている。ここでは *yot/yot* マウスの海馬に注目し、その組織学的な特徴を postnatal day 14 を中心とした時期で調べた (図4.

Arimitsu ら (2021) より)。歯状回を形成する顆粒細胞の層状構造は乱れ、また錐体細胞の層状構造も乱れていた。歯状回門の *synapsin1* の発現は正常マウスに比べて著しく落ちており、この部位におけるシナプス形成がほとんどなされていないことを示していた。錐体細胞における Akt および pAkt (リン酸化 Akt) の発現も正常マウスに比べて低下が顕著であった。1次運動ニューロンのマーカーの一つである *Foxp1* を発現した錐体細胞について正常マウスでの整然とした密な配置に対し、*yot/yot* マウスではやや散漫とした疎な配置にとどまっていた。

cAMP 応答配列結合タンパク質 CREB は神経細胞をはじめとした多くの細胞における転写制御因子であり、哺乳類の神経系での共活性因子として2量体形成やDNA結合に係わる CRTC1 がある。*yot/yot* マウス海馬においてこの発現は歯状回門および錐体細胞層を取り巻く細胞層で正常マウスと変わらない強度を示していたが、*yot/yot* マウスでは錐体細胞層自体が層をなさない散逸構造を示していた。

図4. 海馬の HE 染色像

正常マウスの歯状回や錐体細胞層の明瞭な濃染層に比べ、*yot/yot* マウスでは、境界が不鮮明であった。



### (3) *yot/yot* ニューロスフェア細胞への Dab1 遺伝子導入による 1次運動ニューロンへの分化

*yot/yot* ニューロスフェア細胞への遺伝子治療に相当する Dab1 遺伝子導入は細胞への救済効果を持ちうるか、1次運動ニューロンへの分化刺激も与えて、*yot/yot* ニューロスフェア細胞を培養して運動神経への分化が行われるか調べた。

## 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 6件）

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 J Neurosci Neurosurg	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Arimitsu N, Takai K, Fujiwara N, Shimizu J, Ueda Y, Wakisaka S, Hirotsu C, Murayama M A, Suzuki T, Suzuki N	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 Exp Neurol	6. 最初と最後の頁 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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu J, Suzuki T, Hirotsu C, Ueno H, Takada E, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki N	4. 巻 14
2. 論文標題 Interaction between SDF1 and CXCR4 Promotes Photoreceptor Differentiation via Upregulation of NF B Pathway Signaling Activity in Pax6 Gene-Transfected Photoreceptor Precursors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ophthalmic Res	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000503929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Murayama MA, Arimitsu N, Shimizu J, Fujiwara N, Takai K, Okada Y, Hirotsu C, Takada E, Suzuki T, Suzuki N	4. 巻 70
2. 論文標題 Dementia model mice exhibited improvements of neuropsychiatric symptoms as well as cognitive dysfunctions with neural cell transplantation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp Anim	6. 最初と最後の頁 387-397
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.21-0008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Murayama MA, Arimitsu N, Shimizu J, Fujiwara N, Takai K, Ikeda Y, Okada Y, Hirotsu C, Takada E, Suzuki T, Suzuki N	4. 巻 70
2. 論文標題 Female dominance of both spatial cognitive dysfunction and neuropsychiatric symptoms in a mouse model of Alzheimer's disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp Anim	6. 最初と最後の頁 398-405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.21-0009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arimitsu N, Mizukami Y, Shimizu J, Takai K, Suzuki T, Suzuki N	4. 巻 112
2. 論文標題 Defective Reelin/Dab1 signaling pathways associated with disturbed hippocampus development of homozygous yotari mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Cell Neurosci	6. 最初と最後の頁 103614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mcn.2021.103614	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Arimitsu N, Shimizu J, Takai K, Fujiwara N, Hirotsu C, Okada Y, Suzuki N
2. 発表標題 Neural regeneration mechanisms in transplantation of neuronal cells derived from human induced pluripotent stem cells with the effect of their paracrine secretion.
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research 14th Annual Meeting Melbourne Australia 20-23 June 2018. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Arimitsu-Nakata N, Hirotsu C, Takai K, Shimizu J, Fujiwara N, Okada Y, Suzuki N
2. 発表標題 Neural regeneration after transplantation of neuronal cell sheet of cortical motor neuron phenotype.
3. 学会等名 The 5th TERMIS-WC 2018. Kyoto Japan 4-7 September 2018. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Arimitsu N, Takai K, Hirotsu C, Shimizu J, Suzuki N
2. 発表標題 Motor function recovery in hemiplegic mice after neural stem/progenitor cells transplantation.
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research 2019 Annual Meeting Los Angeles, California, USA (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	鈴木 登  (Suzuki Noboru)  (40235982)	聖マリアンナ医科大学・医学部・教授   (32713)	

	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
研究協力者	廣津 千恵子  (Hirotsu Chieko)  (90647174)	聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員   (32713)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------