

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19300132

研究課題名（和文）脳内神経幹細胞の分化誘導によるパーキンソン病新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a new regenerative treatment for Parkinson's disease by way of inducing proliferation, migration, and differentiation of neural stem cells in situ

研究代表者

坂口 和成 (SAKAGUCHI KAZUSHIGE)

和歌山県立医科大学 先端医学研究所 教授

研究者番号：60178548

研究成果の概要（和文）：成人脳には側脳室下層および海馬に神経幹細胞が存在し、これらの神経幹細胞は神経細胞、星状グリア細胞、およびオリゴデンドログリア細胞に分化しうる。最近の研究で、側脳室下層の神経幹細胞は側脳室内に突起を出し、生物活性物資の作用を受け得ることが判明してきた。神経変性疾患であるパーキンソン病では、枯渇するドパミンを補う治療法はあるが、これは根本的治療法とはならない。パーキンソン病は黒質線条体路の変性により線条体内のドパミンが欠乏することにより発症する疾患であり、側脳室下層から線条体へは近距離であることから、ここに存在する神経幹細胞の増殖、遊走および分化が首尾よく行われれば、上記の種々の問題はすべて解決されることとなる。この度、Eph/ephrin 系がこのような作用を発揮できないかどうかを調べるために、ラットおよびマーモセットでパーキンソン病モデル動物を作製し、ephrin を側脳室内に注入することによりその効果を調べた。ラットにおいては、神経幹細胞および前駆細胞の増殖、線条体内への遊走、ドパミン作動性神経細胞や星状細胞への分化、および血管新生の亢進が認められ、行動の改善も認められた。これらの組織学および行動上の改善は治療開始後 1 2 週間の時点でも持続して認められた。マーモセットにおいては、脳室が小さく、正確に側脳室に注入することは困難であったが、側脳室近傍への注入により、Supermex により測定した行動の明らかな改善が認められた。ephrin 分子に関しては、Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) の coiled-coil domain に ephrin-A1 分子を融合したのも使用したが、蛋白の沈殿を生じるくらいの多重合の状態となり、ephrin-A1-Fc を anti-IgG(Fc) で重合させたほうがより効果的な結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：

Adult mouse brain has two neurogenic areas that contain neural stem/progenitor cells (NSPC). They can differentiate to nerve cells, astrocytes, and oligodendrocytes. Recent studies demonstrated that neural stem cells in the subventricular zone send extensions to the lateral ventricle and receive signals. Parkinson's disease, a neurodegenerative disorder, can be treated by supplying dopamine to improve symptoms, but this cannot be a curative treatment. Sooner or later, the dopaminergic neurons degenerate and become incapable of produce dopamine, resulting in deterioration of symptoms. Fetal nigral tissue transplantation can be one of the candidates of curative treatment, but is not regarded as a standard method due to ethical problems and difficulty in obtaining enough amount of such tissue. ES cells and iPS cells can be differentiated to dopaminergic cells, but the extent of differentiation and occasional occurrence of tumors must be controlled before applying to human. Immuno-rejective reactions and ethical problems must be controlled. Degeneration of neurons in the nigrostriatal tract deplete striatal dopamine and causes Parkinson's disease. Striatum is located close to the lateral ventricle, suggesting that the subventricular neural stem cells are the good candidates for the treatment of this disease by causing proliferation, migration and differentiation. In the current project, we examined whether Eph/ephrin signaling system can be used to induce these

phenomenon for the treatment of Parkinson's disease in rats and marmosettes. In rats, injection of clustered ephrin-A1 into the lateral ventricle could induce NSPC proliferation, migration and differentiation to dopaminergic neurons, and angiogenesis in the striatum. These effects resulted in behavioral improvement of rats with hemilateral nigrostriatal lesion. The histological and behavioral improvement lasted at least for 12 weeks. Marmosettes have so small a ventricle that it was difficult to inject clustered ephrin-A1 into the lateral ventricle. However, multiple injection of ephrin-A1 in and around the lateral ventricle improved the animal behavior as measured by Supermex. Recombinant ephrin-A1 fused with the coiled-coil domain of cartilage oligomeric matrix protein was produced in *E. coli*, but the product was not soluble and precipitated in water, probably due to formation of large multimers. Because of these results, we used the authentic method of clustering ephrin-A1-Fc by anti-IgG(Fc) antibody.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2008年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：神経再生医学

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：エフリン、パーキンソン病、神経幹細胞、

1. 研究開始当初の背景

(1)神経変性疾患であるパーキンソン病では、枯渇するドパミンを補う治療法はあるが、根本的治療法とはならない。

(2)根本的なパーキンソン病治療法として、胎児黒質細胞の移植が試みられているが倫理問題および移植組織の十分な入手ができないなどのために標準的な治療法とは考えられていない。

(3)ES細胞のドパミン作動性神経細胞への分化誘導およびその分化した細胞の移植が考案されているが、分化制御および移植細胞の腫瘍化等も考慮に入れて人間に対する応用には慎重を要する。また、免疫学的拒絶反応や倫理問題も生ずる。

(4)成人の脳内脳室下層および海馬に存在する神経幹細胞を刺激することにより損傷または変性した中枢神経を再生する試みもある。

2. 研究の目的

ephrinの脳室内注入による新規のパーキンソン治療法の確立

3. 研究の方法

計画[1] ephrin-A1の持続注入の効果に関する

る研究

①本研究期間内には、脳室内持続注入ポンプを用いてパーキンソンモデルラットの脳室内に ephrin-A1を1週間持続注入し、その効果を1回注入時の効果と比較する。

②注入終了後6週間目に、(1)パーキンソン症状の改善を行動分析により調べ、(2)脳線条体内での神経幹細胞の増殖・分化を組織学的に調べる。

計画[2] 強力な生物活性をもつ組み換え ephrinの開発

①ephrin-COMP 組み換えタンパク発現ベクターの作製および真核細胞でのタンパクの発現・精製

②ephrin-COMP 組み換えタンパクの生物活性の検定

計画[3] パーキンソンモデルサルにおける効果の検定

① MPTP 皮下または腹腔内注入によるパーキ

ンゾンモデルサルの作製

- ② ephrin およびコントロール薬剤の側脳室内および線条体内への注入前後のパーキンソンモデルサルの行動解析
- ③ ephrin およびコントロール薬剤の側脳室内および線条体内への注入後の組織学的変化の解析

4. 研究成果

- (1) 脳室下層細胞は EphA1-8, EphA10, ephrin-A2, A3, A5 を発現しており、clustered ephrin-A1 の側脳室内注入により18時間後にも EphA4 のリン酸化が持続している。
- (2) Clustered ephrin-A1 の側脳室内注入により、tyrosine hydroxylase 陽性の神経細胞が多数の島状に出現した。
- (3) Parkinson's Disease モデルラットに Clustered ephrin-A1 の注入により動物の行動が改善した。
- (4) Pulse-Chase 実験により、BrdU(+)細胞が側脳室側から線条体に向けて分布が広がることを発見した。
- (5) CM-DiI の側脳室内注入により、側脳室下層に存在して脳室内に突起を出している BrdU(+)神経幹細胞が、嗅球および線条体に遊走しているのが判明した。
- (6) この際に脳室下 Niche 細胞の変化をみると、GFAP(+)BrdU(+)の細胞が脳室下層および線条体内で増加していることが判明した。
- (7) また、線条体内で TH(+) BrdU(+)神経細胞が著明に増加していることも判明した。
- (8) Clustered ephrin-A1 注入側線条体内で血管内皮細胞が著明に増加しており、BrdU(+)CM-DiI(+)の細胞がこの中に組み込まれていた。これは、神経幹細胞が血管内皮に分化した可能性の示唆するものである。
- (9) ephrin-COMP 組み換えタンパクは強力な生物活性効果を持つと考えられたが、重合効果が強すぎて沈殿物を形成する結果となり、ephrin-A1-Fc を anti-IgG(Fc)で重合させたほうがより効果的な結果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- ① Masayuki Kawahara, Yasumasa Iwasaki, Kazushige Sakaguchi, Takafumi Taguchi, Mitsuru Nishiyama, Takeshi Nigawara, Machiko Kambayashi, Takahiro Sawada, Xuefeng Jing, Masayasu Miyajima, Yoshio Terada, Kozo Hashimoto, and Toshihoro Suda. Involvement of GCMB in the transcriptional regulation of the human parathyroid hormone gene in a parathyroid-derived cell line, PT-r: Effects of

calcium and 1,25(OH)₂D₃. **Bone**, 47:534-541, 2010, 査読有

- ② Takahiro Sawada, Xuefeng Jing, Yueqiang Zhang, Emi Shimada, Hideyuki Yokote, Masayasu Miyajima, and Kazushige Sakaguchi Ternary complex formation of EphA4, FGFR and FRS2α plays an important role in the proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells **Genes Cells** 15: 297-311, 2010, 査読有

- ③ Masayuki Kawahara, Yasumasa Iwasaki, Kazushige Sakaguchi, Takafumi Taguchi, Mitsuru Nishiyama, Takeshi Nigawara, Makoto Tsugita, Machiko Kambayashi, Toshihoro Suda, and Kozo Hashimoto Predominant role of 25OHD in the negative regulation of PTH expression: clinical relevance for hypovitaminosis D **Life Science** 82:677-683, 2008, 査読有

- ④ Yueqiang Zhang, Takahiro Sawada, Xuefeng Jing, Hideyuki Yokote, Xiaomei Yan, and Kazushige Sakaguchi Regulation of Ephexin1, a Guanine Nucleotide Exchange Factor of Rho Family GTPases, by Fibroblast Growth Factor Receptor-mediated Tyrosine Phosphorylation **J. Biol. Chem.** 282:31103-31112, 2007, 査読有

〔学会発表〕(計11件)
国際学会

- ① Kazushige Sakaguchi, Takahiro Sawada, Xuefeng Jing, Emiko Shimada, and Masayasu Miyajima: Functional and structural analysis of Eph-FGFR and Eph-GHR interactions. Eph/ephrins and cancer meeting (oral presentation). Washington-Salem, NC, June 21-22, 2010

- ② Takahiro Sawada, Xuefeng Jing, Masayasu Miyajima, Emi Shimada and Kazushige Sakaguchi: Signaling through the ternary complex of EphA4, FGFR, and FRS2. Eph/ephrins and cancer meeting (poster). Washington-Salem, NC, June 21-22, 2010

- ③ Xuefeng Jing, Hideto Miwa, Takahiro Sawada, Ichiro Nakanishi, Tomoyoshi Kondo, Masayasu Miyajima and Kazushige Sakaguchi: Ephrin-A1-mediated transformation of subventricular neural stem niche leading to dopaminergic neurogenesis in the dopamine-depleted striatum. Eph/ephrins and cancer meeting (poster). Washington-Salem, NC, June 21-22, 2010

④Masayasu Miyajima, Xuefeng Jing, Takahiro Sawada, Keiji Iida, Yasuteru Muragaki, Emi Shimada, Kazuo Chihara, Kazushige Sakaguchi: Dwarfism caused by a defect in a novel growth hormone signaling pathway. Endocrine Society's 90th Annual Meeting (USA) June 18, 2008

⑤FGF23 Function of Reducing the Phosphate (Pi) Uptake is Mediated by Receptors Other Than the FGFR-Klotho Complex in OK-E cells : T. Sawada, X. Jing, Y. Zhang, X. Yan, and K. Sakaguchi Annual Meeting of the American Society of Bone and Mineral Research September 18, 2007

全国学会

⑥宮嶋正康、岡田由香、雑賀司珠也、坂口和成 早期開眼ラット (early open eye lid, eoel) の研究 眼創傷治癒研究会 2010年8月29日 和歌山市

⑦京 雪楓 三輪英人 澤田貴宏 横手秀行 村垣泰光 中西一郎 近藤智善 宮嶋正康 坂口和成 Ephrin-A1-mediated transformation of the subventricular neural stem cell niche leading to dopaminergic neurogenesis in the dopamine-depleted striatum. 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月7日 横浜

⑧宮嶋正康、京雪楓、澤田貴宏、島田栄美、飯田啓二、村垣泰光、千原和夫、坂口和成、新規成長ホルモン不応性成長障害の発症機序 第27回日本骨代謝学会学術集会 2009年7月21日 大阪

⑨澤田貴宏、京 雪楓、横手秀行、張 月強、島田栄美、坂口和成: Eph-FGFR-FRS2 α の複合体を介するシグナル伝達 第81回 日本生化学会大会合同大会 (BMB2008) 平成20年12月1日 神戸

⑩京 雪楓 三輪英人 澤田貴宏 横手秀行 村垣泰光 中西一郎 近藤智善 宮嶋正康 坂口和成 パーキンソン病モデルラットにおける多量化 ephrin-A1 の脳室内注入の効果について 第二回 Movement Disorder Society, Japan (MDSJ) 2008年10月18日 国立京都国際会館

⑪宮嶋正康、京 雪楓、村垣泰光、飯田啓二、千原和夫、澤田貴宏、張 月強、坂口和成 GHシグナル伝達不全に基づく小人症モデルとしてのEphA4 ノックアウトマウス 第24回日本疾患モデル学会総会 2007年8月29日 (茨城県つくば市)

[産業財産権]
○出願状況 (計1件)

名称: 中枢神経障害治療剤及び中枢神経障害の治療方法

発明者: 坂口和成、京 雪楓、三輪英人、澤田貴宏

権利者: 坂口和成

種類: 国際特許

番号: PCT0711601

出願年月日: 平成20年2月1日

国内外の別: 両方

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂口 和成 (SAKAGUCHI KAZUSHIGE)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・教授

研究者番号: 60178548

(2) 研究分担者

三輪 英人 (MIWA HIDETO)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 50231626

宮嶋 正康 (MIYAJIMA MASAYASU)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80137257

澤田 貴宏 (SAWADA TAKAHIRO)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・助教

研究者番号: 00382325

京 雪楓 (JING SHUEFENG)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・助教

研究者番号: 70316123