

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500302

研究課題名 (和文)：サル胚性幹細胞由来運動神経細胞の脳内移植における
 錐体路再生の分子メカニズムの解析

研究課題名 (英文)：Analyses of Molecular Mechanisms governing Regeneration of Pyramidal
 Tract by Intra-cerebral Transplantation of Monkey ES cell derived
 Nueral Stem Cells

研究代表者：

吉川 英志 (YOSHIKAWA HIDESHI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号:20252025

研究成果の概要：神経細胞移植は現在有効な治療法がない難治性神経疾患に対する新規治療法として注目されている。

本研究で、サル ES 細胞をレチノイン酸処理することで神経細胞を分化誘導できること、これを片麻痺マウスに移植することで運動機能を回復させることができた。移植した運動神経はケモカイン受容体 CXCR4 を発現しており、損傷部皮質に集積したグリア細胞の産生するケモカイン SDF1 に反応して、損傷部皮質に移動した。脳血流 MRI を用いると、神経細胞移植脳では損傷部皮質の脳血流量が改善した。

神経ネットワークの再生にはケモカインとその受容体が神経細胞の遊走に関わり、損傷組織への定着には神経接着因子が極めて重要な役割を果たすことを示唆された。今回の成績から、近い将来ヒトでの応用が行なわれれば運動障害も持つ多くの患者の QOL の改善に貢献すると期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経細胞移植、片麻痺、運動神経、胚性幹細胞、ケモカイン、神経接着因子、移植・再生医療

1. 研究開始当初の背景
 神経細胞移植は脳血管障害後の片麻痺をはじめとする現在は有効な治療法がない難治

性神経疾患等に対する新規治療法として注目されている。1998 年 Thomson によりヒト

ES 細胞が単離され移植治療の臓器供給源として ES 細胞への期待が高まった。アメリカでは今まさにヒト ES 細胞を用いた臨床研究が行われようとしている。

我々はマウス ES 細胞から神経幹細胞を分化誘導する手技を確立した後、これらを移植して片麻痺モデルマウスや脊髄損傷マウスの運動機能を著明に改善できることを報告した。しかしそこでは神経ネットワークの再生メカニズムの詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では霊長類 ES 細胞由来神経幹・前駆細胞を移植し運動機能回復における神経細胞移植の有用性を明らかにするとともにその分子メカニズムを明らかにする。我々の一連の ES 細胞由来神経細胞移植研究において、本研究はヒトでの臨床応用の前に行なうべき必須の検討課題であり、この成績に基づいて、ヒト ES 細胞の応用が可能になったあかつきには運動障害を持つ多くの患者の QOL の改善に大きく貢献すると期待される。

3. 研究の方法

本研究ではマウス ES 細胞から神経細胞を分化誘導し、大脳損傷により作成した片麻痺マウスに免疫抑制薬投与下で ES 細胞由来の神経細胞を移植しその有用性を評価する。移植した側脳室近傍から損傷部皮質まで、移植神経細胞が移動しながら神経網を再構築するが、その後移動した損傷皮質で残存宿主神経細胞と再接続し、移植部近傍では残存する錐体路と再接続することで、神経細胞移植による運動機能回復がもたらされた。

これら移植細胞は神経幹細胞や比較的若い前駆細胞であり、移植後に局所において運動神経への更なる分化を誘導する必要がある。L1CAM knockout mouse に神経細胞移植を行い神経再生における接着因子の役割を明らかにする。

4. 研究成果

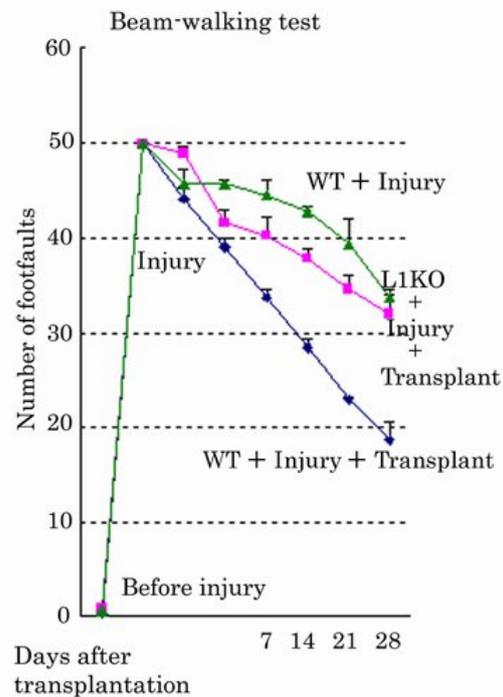
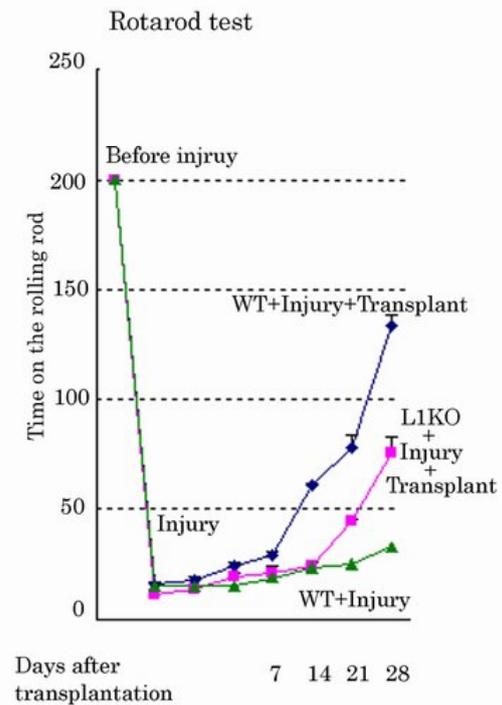


図 1. 運動神経移植マウスの運動機能回復。正常マウス (WT) 或いは神経接着因子 L1-CAM ノックアウト (L1KO) マウスに神経細胞移植を行った。その後、運動機能を経時的に評価

した。

本研究を含む一連の研究の成果として、霊長類 ES 細胞由来の神経幹細胞を移植することで、片麻痺モデル動物の運動機能回復をもたらすことを示した。

具体的にはサル ES 細胞をレチノイン酸処理することで神経細胞を分化誘導できることを示し、これを片麻痺マウスに移植することで運動機能を回復させる (図 1) ことを見出した。

そこでは移植した運動神経はケモカインレセプターCXCR4 を発現しており、損傷部皮質に集簇したグリア細胞の産生するケモカイン SDF-1 に反応して、損傷部皮質に移動することを見出した (間ら、投稿中)。

脳血流を測定する functional MRI を用いると、神経細胞移植脳では損傷部皮質の脳血流量が改善することが明らかになった (間ら、投稿中)。

その再生機構の詳細を明らかにする目的で神経細胞接着因子の L1-CAM ノックアウトマウスに片麻痺を作成し、その後移植を行った。L1-CAM ノックアウトでは移植後に、運動細胞の損傷部皮質への移動は起こらず、運動機能の回復も認められなかった (図 1)。

即ち、神経ネットワークの再生にはケモカインである SDF-1 と CXCR4 が神経細胞の遊走に関わり、損傷組織への定着にはNCAMやL1-CAM等の神経接着因子が極めて重要な役割を果たすことを示唆された。今後、この成績に基づき、L1-CAM ノックアウトへの L1-CAM の遺伝子導入が神経ネットワークの再生をもたらすのかを明らかにする必要がある。

今回の成績に基づいて、近い将来ヒトでの応用が行なわれれば運動障害も持つ多くの患者の QOL の改善に大きく貢献すると期待される。

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 15 件)

1. Kayama M, Kurokawa M.S, Ueda Y, Ueno H, Kumagai Y, Chiba S, Takada E, Ueno S, Tadokoro M, Suzuki N. Transfection with pax6 gene of mouse ES cells and subsequent cell cloning induced retinal neuron progenitors, including retinal ganglion cell-like cell, in vitro. *Ophthalmic Research* in press 2009. 査読有

2. Shimizu J, Inatsu A, Oshima S, Shimizu E, Kubota T, Suzuki N. A clinicopathologic evaluation of renal artery stenosis with abdominal aortic aneurysm. *Inflammation and Regeneration* 28(6) : 543 - 547, 2008. 査読有

3. Nara K, Kurokawa M.S, Chiba S, Yoshikawa H, Tsukikawa S, Matsuda T, Suzuki N. Involvement of innate immunity in the pathogenesis of intestinal Behcet's disease *Clinical and Experimental Immunology* 152 : 245 - 251, 2008. 査読有

4. Maruyama T, Nara K, Yoshikawa H, Suzuki N. Txk, a member of non-receptor tyrosine kinase of Tec family, forms a complex with poly (ADP-ribose) polymerase 1 and elongation factor1a and regulates IFN γ gene transcription in Th1 cells. *Clinical and Experimental Immunology* 147(1) : 164 - 175, 2007. 査読有

5. Kayama M, Kurokawa M.S, Ueno H, Suzuki N. Recent advances of corneal regeneration and possible application of embryonic stem (ES) cell derived corneal epithelial cells. *Clinical Ophthalmology* 1(4) : 373 - 382, 2007. 査読有

6. Mihara S, Suzuki N. Role of Txk, a member of Tec family tyrosine kinases, in immune-inflammatory diseases. *International Reviews of Immunology* (26) : 1 - 15, 2007. 査読有

7. Ueno H, Kurokawa MS, Kayama M, Homma R, Kumagai Y, Masuda C, Takada E, Tsubota K, Ueno S, Suzuki N. Experimental transplantation of corneal epithelium-like cells induced by PAX6 gene transfection of mouse embryonic stem cells. *Cornea* 26(10) : 1220 - 1227, 2007. 査読有

8. Takenaga M, Ohta Y, Tokura Y, Hamaguchi A, Suzuki N, Nakamura M, Okano H, Igarashi R. Plasma as a scaffold for regeneration of neural precursor cells after transplantation into rats with spinal cord injury. *Cell Transplantation* 16(1) : 57 - 65, 2007. 査読有

9. Maruyama T, Nara K, Yoshikawa H, Suzuki N. Txk, a member of the non-receptor

tyrosine kinase of the Tec family, forms a complex with poly(ADP-ribose) polymerase 1 and elongation factor 1a and regulates interferon-gamma gene transcription in Th1 cells. *Clinical and Experimental Immunology* 147(1) : 164 - 175, 2007. 査読有

10. Atoh K, Kurokawa MS, Yoshikawa H, Masuda C, Takada E, Kumagai N, Suzuki N. Induction of melanocyte precursors from neural crest cells surrounding the neural tube like-structures developed in vitro using mouse ES cell culture. *Inflammation and Regeneration* 27(1) : 45 - 52, 2007. 査読有

11. 吉川英志、鈴木登 : ニコチンによる炎症メディエーターの産生抑制臨床免疫・アレルギー科(48) : 2182 - 188, 2007. 査読無

12. 黒川真奈絵、尾崎志雲、吉川英志、鈴木登 : 阻血再灌流後の腎組織障害に対する Fas 依存性アポトーシス抑制による治療効果. *Inflammation and Regeneration* 27(2) : 124-129, 2007. 査読有

13. 黒川真奈絵、田子玲子、高田えりか、奈良和彦、鈴木登 : マウス胚性幹細胞由来血管内皮細胞および壁細胞の分化誘導. *聖マリアンナ医科大学雑誌*(35) : 143 - 149, 2007. 査読有

14. 鈴木登、高井憲治 : 基礎医学教育の現状と課題. *聖マリアンナ医科大学雑誌* 35(増刊号) : S45 - S47, 2007. 査読無

15. 熊谷悠太、上野宏樹、鈴木登 : 角膜再生治療の現状とカニクイザル胚性幹細胞を用いた角膜上皮細胞移植研究. *聖マリアンナ医科大学雑誌* 35(2) : 109 - 117, 2007. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

1. Suzuki N, Nara K, Kurokawa M. S, Chiba S, Matsuda T, Yoshikawa H, Shimizu J : Innate immunity and Th1 cell responses in the pathogenesis of intestinal Behcet's disease. *MEDICAL-EXPO 2008 in APLAR's World* 23 September 2008.

2. Kumagai Y, Kurokawa M. S, Ueno H, Kayama M, Tsubota K, Nakatsuji N, Kondo Y, Ueno S, Suzuki N : Induction of Corneal Epithelium-Like Cells From Non Human Primate Embryonic Stem Cells and Their Experimental Transplantation to Damaged Cornea. *The Association for Research in vision and Ophthalmology*, USA 27 April 2008.

3. Kayama M, Kurokawa M. S, Ueda Y, Ueno H, Kumagai Y, Masuda C, Takada E, Tago R, Ueno S, Suzuki N : Subretinal Transplantation of Embryonic Stem Cell Derived Neuroretinal Cells to Mice With

Optic Nerve Injury. *The Association for Research in vision and Ophthalmology*, USA 27 April 2008.

4. Ueno H, Kurokawa M. S, Kumagai Y, Kayama M, Homma R, Masuda C, Takada E, Tsubota K, Ueno S, Suzuki N : Development of corneal epithelial cell sheets derived from mouse embryonic stem (ES) cells transfected with pax6 gene. *The Association for Research in vision and Ophthalmology*, USA 27 April 2008.

5. Nara K, Kurokawa M, Matsuda T, Suzuki N : microglia/macrophage may be responsible for the development of neuro-Behcet's disease. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会第 17 回国際リウマチシンポジウム 20 April 2008.

6. Kayama M, Kurokawa MS, Ueda Y, Ueno H, Kumagai Y, Masuda C, Takada E, Ueno S, Tadokoro M, Suzuki N : Induction of Differentiation Into Retinal Ganglion Cells of Mouse ES Cells by Pax6 Gene Transfection. *The Association for Research in vision and Ophthalmology* 2007. USA 6 May 2007.

7. Kumagai Y, Kurokawa MS, Ueno H, Kayama M, Tsubota K, Nakatsuji N, Nito S, Ueno S, Suzuki N : Induction of Corneal Epithelium-Like Cells From Cynomorgus Monkey Embrionic Stem Cells and Their Experimental Transplantation to Damaged Cornea. *The Association for Research in vision and Ophthalmology* 2007. USA 6 May 2007.

8. Ueno H, Kurokawa MS, Kumagai Y, Kayama M, Homma R, Masuda C, Takada E, Tsubota K, Ueno S, Suzuki N : Characterization of Corneal Epithelium Like Cells Induced by Pax6 Gene Transfection of Mouse Embryonic Stem Cells. *The Association for Research in vision and Ophthalmology* 2007. USA 6 May 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 英志 (YOSHIKAWA HIDESHI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号:20252025

(2) 研究分担者

鈴木 登 (SUZUKI NOBORU)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号:40235982

(3) 連携研究者

なし