

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19790822
研究課題名 (和文) 神経幹細胞移植を用いた胎児性アルコール症候群の治療
脳神経回路網の再生の試み
研究課題名 (英文) Neural stem cell transplantation in a model of fetal alcohol effects

研究代表者
吉永 敏弘 (YOSHINAGA TOSHIHIRO)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：70404704

研究成果の概要：胎児性アルコール症候群のモデルラットに対して、ラット胎仔由来の神経幹細胞の経静脈的移植療法を施行した。その結果、胎児性アルコール症候群の主要症状である多動性と衝動性の行動異常が正常ラットと同等の程度まで改善することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：脳・神経 神経科学 再生医学 神経幹細胞 アルコール

1. 研究開始当初の背景

妊娠中に大量に飲酒した母親から生まれた子供に顔貌の異常、発育不全、行動異常の3つの兆候が現れる胎児性アルコール症候群の存在は1960年代末から報告されてきた。最近、アルコール依存症者をはじめとする大酒家の母親を持つ子供の中に、外見上の異常はないものの、家庭や学校における不適応を繰り返すものが多いことが報告され、胎児性アルコール作用 (fetal alcohol effects:FAE) として注目されている。これらの子供では、成長後の知的障害や衝動性、多動性、抑うつ、引きこもり、対人関係の障害が特徴的な症候としてあげられるが、その生物学的基盤は未

だ不明であり、根治的な治療法はない。我々はアルコールによる脳神経ネットワークの異常に関わる細胞・分子変異について、これまでに 1) アルコールにより神経幹細胞の分化が特異的に変化し、神経細胞への分化が抑制され、一方で、グリア細胞への分化が促進されること、2) その機序に神経幹細胞内栄養因子シグナル伝達系の変化が関与することを明らかとし、母体のアルコール摂取によって、胎児の脳内で神経幹細胞の機能に異常が生じ、その後の子供の脳神経ネットワークの形成が重大な影響を受けている可能性を指摘してきた。今回、胎児期にアルコール曝露させたラットに、生後30日目に神経幹細胞

の移植療法を実施して、行動薬理的解析を行い、成長後の問題行動・精神症状の根治的な治療法の可能性を探索した。

2. 研究の目的

本研究は、妊娠期の母親の摂取によって、胎児がアルコールに曝露された場合の、子供の生後の脳機能発達と成長後の認知・行動異常について、ストレス記憶細胞としての神経幹細胞の機能異常が病態に関与しているとの観点から、神経幹細胞移植による治療の可能性について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) FAE モデルの作製

妊娠 10~13 日の母親ラットに 4mg/kg のエタノールを 12 時間毎に計 8 回、経口投与を行い、出生した仔を FAE モデルとし、同時期に同容量の生理食塩水を投与したものを対照群として使用した。

(2) 移植用神経幹細胞の調整

神経幹細胞 (neural stem cell: NSC) は、Gage らの単層培養法を改良した方法で得た。すなわち、胎齢 13.5 日のラット胎仔より脳を摘出し、細胞を分散後、bFGF を含有した NEUROBASAL Medium (NBM)/B27 培地に懸濁し、オルニチンおよびフィブロネクチンでコートした培養ディッシュに播種した。37°C、5% CO₂ 条件下で 7 日間培養し、選択的に増殖させたものを使用した。放射性同位元素 (³⁵S]-methionine)、および生存細胞の追跡用に開発された蛍光色素

(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester: CFSE) にて細胞を二重標識した後、ディッシュから剥離して、細胞濃度 10⁷/ml の細胞浮遊液を作製した。

(3) 神経幹細胞移植

FAE モデルと対照群に対して、日齢 30 日に 1 匹当たり 0.5 ml の神経幹細胞浮遊液あるいは生理食塩水を尾静脈より注射した。移植前日より、シクロスポリン (10 mg/kg) を 1 日 1 回、腹腔内投与した。

実験には以下の 4 群を使用した。

- 1) 対照群 (n=5) : 非アルコール曝露, 非移植群
- 2) FAE 群 (n=8) : 胎児期アルコール曝露, 非移植群
- 3) FAE 移植群 (n=8) : 胎児期アルコール曝露, NSC 移植群
- 4) 対照移植群 (n=6) : 非アルコール曝露, NSC 移植群

(4) 行動評価

移植後 40 日目に高架式十字迷路にて行動評価を行った。Open arm および closed arm からなる迷路上の 5 分間のラットの行動について、行動量や各 arm での滞在時間等を、赤外線感知装置を用いて自動計測した。

(5) 経静脈的に移植した神経幹細胞の脳内移行性の解析

十字迷路による行動評価の後、ラットの脳を摘出、皮質、海馬、線条体、側脳室下帯に分離し、それぞれの組織毎に液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。脳組織の一部は蛍光顕微鏡で鏡検するためにスライスを作成した。さらに脳スライスを免疫染色して、移植した細胞が脳に移行した後の分化動態を観察した。

4. 研究成果

(1) FAE モデルラットの特徴

本研究において作製した FAE モデルラットの生後の体重増加は、コントロール群とほぼ同程度に推移し (生後 30 日の時点でコントロール群の約 99%)、脳重量についても有意な差異を認めなかった (生後 70 日目の解析でコントロール群の約 95%)。行動面では、生後 30 日目での目視による観察において、FAE モデル群に、飼育ケージの天井部の網に頻繁にぶらさがるなどの異常行動と、移所運動量の増加を認めた。

(2) 経静脈的に移植した神経幹細胞の脳内移行性の解析

移植に用いる神経幹細胞を、放射性同位元素 (³⁵S]-methionine)、および蛍光色素 (CFSE) にて二重標識し、経静脈的移植後の脳内への移植細胞の移行性と脳内分布について調べた。移植 40 日後に脳組織を取り出し、皮質 (Cor)・海馬 (Hip)・線条体 (Str)・側脳室下帯 (SVZ) に分割後、各脳領域のホモジネートサンプルに含まれる放射活性を測定した (図 1)。その結果、皮質・海馬・線条体・側脳室下帯の 4 領域のすべてで、コントロール群に比べ、FAE モデル群で放射活性がより高い傾向を認めた (側脳室下帯については統計学的に有意な差異を検出した)。FAE モデルラットにおいては、脳の神経回路に異常が生じており、移植した神経幹細胞が障害を受けた脳内により積極的に移行する可能性が推察された。

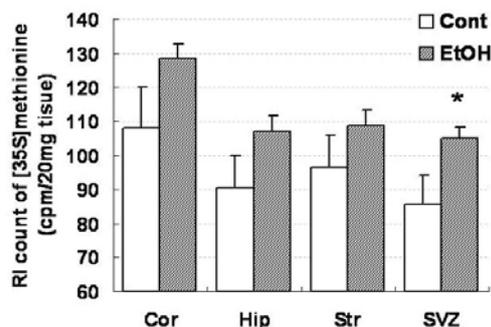


図 1 脳部位毎の放射活性

FAE モデルラットの脳スライス切片を用いた解析で、蛍光色素標識した細胞が脳内の広い範囲に分布していることを観察した。また、脳の特 に帯状回、海馬、および側脳室下帯については、標識細胞が高密度に存在していた。脳内で検出された標識細胞の一部は軸索形成と考えられる形態変化を示していた (図 2)。

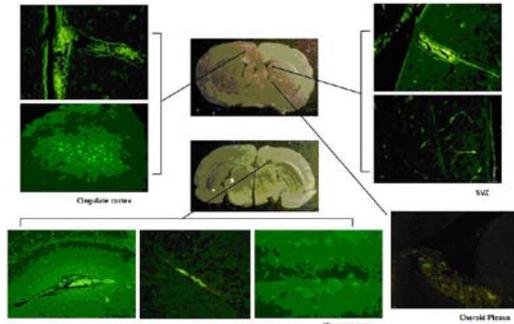


図 2 移植神経幹細胞の脳内分布

さらに脳スライスの免疫染色により、移植した神経幹細胞が脳の諸領域で神経細胞 (MAP2 陽性)、およびアストロサイト (GFAP 陽性) の細胞に分化していることを観察した。神経細胞に分化した移植細胞は 5-HT 陽性のセロトニン作動性ニューロン、GAD 陽性の GABA 作動性ニューロン、ChAT 陽性のアセチルコリン作動性ニューロンとさまざまなフェノタイプの神経細胞に分化していることも確認された (図 3)。

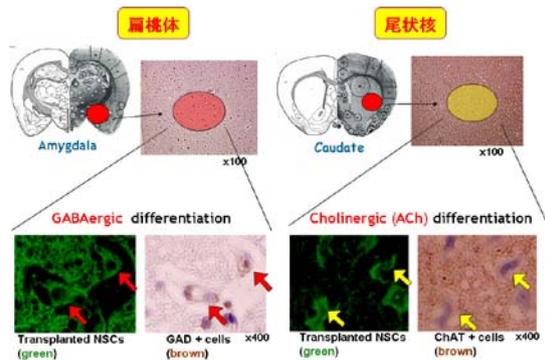
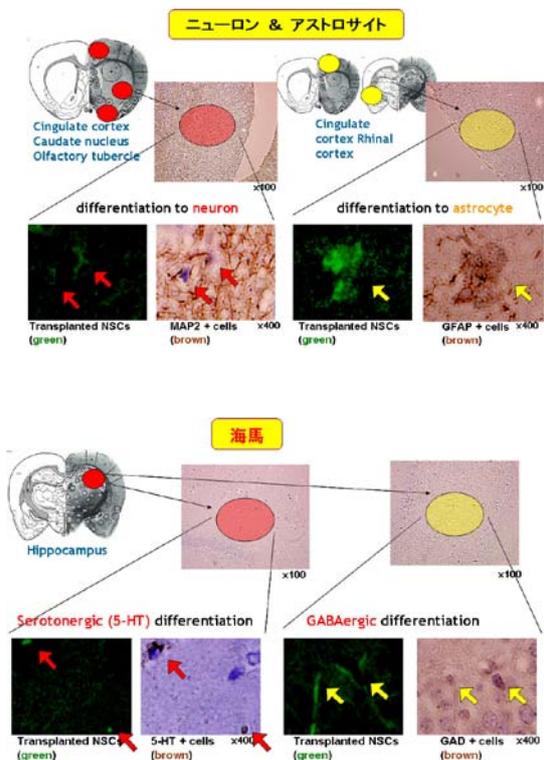


図 3 移植神経幹細胞の脳内分化・機能化

(3) 行動評価

日齢 70 日 (移植後 40 日) にすべてのラットに対して高架式十字迷路を用い行動評価を施行した (図 4)。高架式十字迷路では open arm への侵入回数と open arm での滞在時間は不安の欠如 (衝動性) を表し、すべての arm への侵入回数は活動性を反映すると考えられている。

対照群に比較し FAE 群で、すべての arm への侵入回数と open arm での滞在時間が、有意差をもって増加しており、FAE モデルラットが多動性と衝動性の行動異常を有することが確認された。

さらに、FAE 移植群では open arm での滞在時間とすべての arm への侵入回数が FAE 群と比較して有意に減少しており、経静脈的神経幹細胞移植が、FAE モデルラットの精神症状の改善に有効性を示す可能性が示唆された。また、有意差を認めなかったが、不安感の欠如と関連する open arm への侵入回数でも同様の傾向を認めた。

対照移植群では open arm での滞在時間と arm への侵入回数、すべての arm への侵入回数のいずれの指標も対照 (非移植) 群と有意差を認めず、神経幹細胞移植自体による行動の変化は観察されなかった。

Treatment	n	Mean	SE	*p-Value vs Control	#p-Value vs FAE
Total entries					
Control	6	6.00	0.68	0	#0.024
FAE	8	13.38	2.33	*0.024	0
FAE+T	8	6.88	1.42	0.982	#0.033
Control+T	5	4.80	0.80	0.969	#0.032
% Entries in open arms					
Control	6	2.33	0.21	0	0.078
FAE	8	4.13	0.72	0.078	0
FAE+T	8	2.38	0.38	1.000	0.059
Control+T	5	2.20	0.20	0.998	0.071
% Time in open arms					
Control	6	2.06	0.05	0	#0.018
FAE	8	3.20	0.34	*0.018	0
FAE+T	8	2.25	0.25	0.954	#0.036
Control+T	5	2.07	0.07	1.000	#0.026

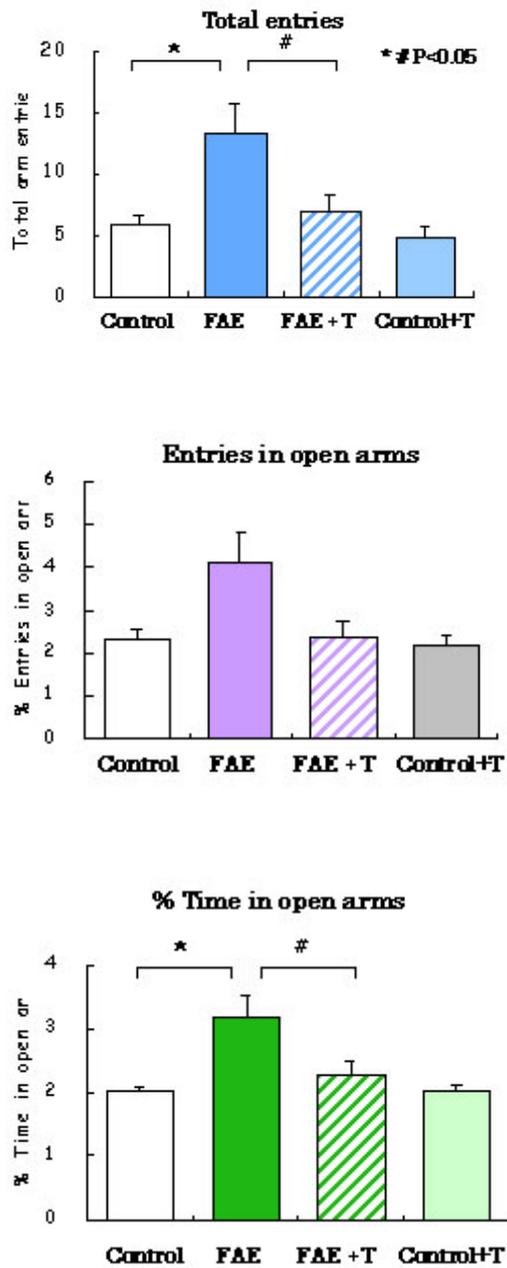


図4 高架式十字迷路による行動評価

本研究では、新たな FAE の治療法開発の試みとして、障害された神経ネットワークの修復を目的とした神経幹細胞移植の可能性を検討した。神経幹細胞の移植方法としては、侵襲性の少ない経静脈的投与を選択した。

まず、経静脈的に投与した神経幹細胞が脳内へ移行することを確認するために、神経幹細胞を蛍光色素と RI で標識して移植した。その結果、対照群でも移植細胞の脳内への移行を認めたが、FAE 群ではより多くの細胞が脳内へ移行することが観察された。脳梗塞モデルにおいて梗塞病変の対側半球に幹細胞を移植した研究で、移植細胞が病変周囲に集

積することが報告されており、脳組織に障害がある場合に、より移植細胞が脳内へ移行し易いと考えられる。しかしながら、FAE モデルにおいて、経静脈的に投与された神経幹細胞が脳内へ移行する詳細な機序については、今後明らかにする必要があると思われる。脳梗塞モデル動物での研究では、病変部の血液脳関門 (blood brain barrier:BBB) が破壊された部位から移植細胞が脳内へ侵入する、あるいはサイトカインや細胞表面抗原が移植細胞の脳内移行に関与しているといわれている。エタノールの BBB への影響に関しては、生理的濃度のエタノールで BBB は障害されるが、アルコールの曝露から解除されると数時間で障害された BBB は正常な状態に回復することが、毛細血管内皮細胞の単層培養を用いた研究で示されており、生後ラットを用いた本研究においては、移植細胞の脳内移行に関してエタノールによる BBB 障害の関与は否定的と考えられる。

高架式十字迷路を用いた行動評価では、FAE モデルラットが、ヒトの FAE で特徴的な症状である、衝動性と多動性を示すことが確認された。さらに、神経幹細胞移植を施行することにより、これら精神症状が対照群と同等な程度まで改善することが示され、FAE に対する幹細胞移植療法の有用性が示唆された。

FAE の中枢神経障害のメカニズムとして、酸化ストレスを介したアポトーシスの誘導や、insulin-like growth factor (IGF) の細胞の増殖・生存促進作用の抑制、L1 細胞接着因子の阻害などが挙げられており、アルコール曝露の時期や濃度により、これら複数の機序が重複して起こると考えられている。セロトニン作動薬が、胎児期アルコール曝露によるセロトニン再取り込み阻害やセロトニン作動性細胞数減少を改善するとの報告や、神経保護作用を有する蛋白質である ADNF (activity dependent neuroprotective factor) が、虚血や酸化ストレスによる神経細胞障害に保護的に働き、胎児期アルコール曝露による胎仔死亡を予防するとの報告が、それぞれ動物実験にもとづいてなされているが、これらは予防的な治療であり、妊娠中の母親ラットのアルコール曝露と平行して薬剤が投与される必要がある。胎児期アルコール曝露の出生仔に対する介入として報告されているのは、飼育環境や運動タスクなどリハビリテーションを主体としたもののみである。

近年、成体の中枢神経系においても、自己複製能と神経系の細胞への多分化能を有する未分化な細胞集団である神経幹細胞が存在することが明らかとなったことで、神経幹細胞を使用することにより、損傷された中枢神経系を再生し、その機能を修復する再生医

療が現実味を帯びつつあり、すでに脳梗塞や脳外傷、パーキンソン病などの領域で幹細胞を利用した治療の研究が行われている。幹細胞移植による機能改善の機序についても、移植細胞の分泌する神経栄養因子による神経保護作用、神経新生促進作用が想定されており、また、移植した細胞が脳内に生着し、神経回路の再構築を示唆するシナプス形成を認めたとする報告もある。

F AE に幹細胞を移植した研究はこれまでなく、さらに本研究では生後 30 日の FAE モデルラットに経静脈的に神経幹細胞移植を施行し、FAE の主要な症状である衝動性と多動性に関し対照群と同等の程度までの改善を得たことで、FAE に対する神経幹細胞移植療法の可能性を示すことができたと考えている。

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 5 件)

① Ishii T, Hashimoto E, Ukai W, Tateno M, Yoshinaga T, Saito S, Sohma H, Saito T. Lithium-induced suppression of transcription repressor NRSF/REST: effects on the dysfunction of neuronal differentiation by ethanol. *European Journal of Pharmacology.* 593 巻, 36-43, 2008 年, 査読有

② 鶴飼渉, 石井貴男, 吉永敏弘, 館農勝, 橋本恵理, 小野貴文, 渡邊公彦, 渡邊一平, 白坂智彦, 齋藤利和, アルコールによる脳神経回路障害のメカニズムとその修復法の探索 神経細胞・神経幹細胞を用いた in vitro, in vivo 解析, 日本アルコール・薬物医学会雑誌, 43 巻, 763-769, 2008 年, 査読有

③ 石井貴男, 橋本恵理, 鶴飼渉, 館農勝, 吉永敏弘, 小野貴文, 渡邊公彦, 齋藤諭, 齋藤利和, アルコールによる脳障害とエピジェネティクス制御機構, 日本アルコール・薬物医学会雑誌, 43 巻, 705-713, 2008, 査読有

④ 鶴飼渉, 橋本恵理, 吉永敏弘, 石井貴男, 館農勝, 小野貴文, 渡邊公彦, 齋藤諭, 齋藤利和, アルコールによる脳神経回路網の異常 神経幹細胞を用いた修復の試み, 日本神経精神薬理学雑誌, 28 巻, 69-73, 2008 年, 査読有

⑤ Yoshinaga T, Hashimoto E, Ukai W, Toki S, Saito S, Saito T. Neural stem cell transplantation in a model of fetal alcohol effects. *Journal of Neural Transmission* 72 巻, 331-337, 2007 年, 査読有

[学会発表] (計 7 件)

① 吉永敏弘, 石井貴男, 館農勝, 小野貴文, 渡邊公彦, 渡邊一平, 白坂知彦, 齋藤諭, 橋本恵理, 齋藤利和, 胎児期アルコール曝露モデルに対する神経幹細胞移植の試み, 第 38 回日本神経精神薬理学会, 2008 年 10 月 1 日

② 鶴飼渉, 吉永敏弘, 石井貴男, 橋本恵理, 小野貴文, 館農勝, 渡邊公彦, 渡邊一平, 白坂知彦, 向裕加, 齋藤諭, 齋藤利和, 精神疾患に対する幹細胞移植療法の可能性に関する研究, 第 51 回日本神経化学会, 2008 年 9 月 12 日

③ Saito T, Hashimoto E, Ukai W, Yoshinaga T, Ishii T, Tateno M, Saito S. New potential therapy of neural stem cell transplantation for repairing alcohol induced brain damage, 16th Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum, 2008 年 7 月 13-17 日

④ Tateno M, Ukai W, Yoshinaga T, Ishii T, Saito S, Hashimoto E, Saito T. The common aspects of pathophysiology of alcoholism and depression, Joint Congress of 31th Annual Scientific Meeting of the Research Society on Alcoholism/14th Annual Meeting of the International Society for Biomedical Research on Alcoholism, 2008 年 6 月 28 日-7 月 2 日

⑤ Hashimoto E, Yoshinaga T, Ishii T, Saito S, Ukai W, Saito T. Translational research of repairing therapy for damaged brain, Joint Congress of 31th Annual Scientific Meeting of the Research Society on Alcoholism/14th Annual Meeting of the International Society for Biomedical Research on Alcoholism, 2008 年 6 月 28 日-7 月 2 日

⑥ Ukai W, Ishii T, Yoshinaga T, Tateno M, Ono T, Watanabe K, Hashimoto E, Saito S, Mukai Y, Saito T. The alteration of CREB/NRSF regulation in the neural stem cell dysfunction by ethanol, Joint Congress of 31th Annual Scientific Meeting of the Research Society on Alcoholism/14th Annual Meeting of the International Society for Biomedical Research on Alcoholism, 2008 年 6 月 28 日-7 月 2 日

⑦ Ishii T, Ukai W, Tateno M, Yoshinaga T, Ono T, Saito S, Hashimoto E, Saito T. The effect of lithium on ethanol inhibition of neuronal differentiation: role for transcription repressor NRSF, The 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2007 年 11 月 3-7 日

○取得状況（計 1 件）

名 称 : Pharmaceutical compounds
containing atelocollagen and stem cells for
treatment of psychiatric or neurological
diseases

発明者 : 吉永敏弘

権利者 : 同上

番号 : 60/932753

取得年月日 : 2007 年

国内外の別 : 米国

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉永 敏弘 (YOSHINAGA TOSHIHIRO)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 70404704