

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12766

研究課題名(和文) 神経移植による認知機能回復におけるコリン作動性神経の再生とその役割の解明

研究課題名(英文) The effect of neural cell transplantation on the regeneration of cholinergic neurons

研究代表者

岡田 容子 (Okada, Yoko)

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員

研究者番号：20793219

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)：認知症モデルマウスにヒトiPS細胞由来神経細胞の移植を行うと、皮質と海馬にヒト核蛋白陽性のコリン作動性神経とGABA作動性神経が生着し、海馬コリン神経の起始核である内側中隔(MS)とブローカの対角帯垂直部(nBD)にマウス由来の内因性のコリン作動性神経細胞の出現とヒト核蛋白陽性のコリン作動性神経が混在して出現することを見出した。さらに認知機能の改善が見られた。このMSとnBDに出現したヒト各タンパク陽性コリン作動性神経の出現が移植マウスにおける認知機能の改善に関わることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病(AD)は加齢に伴う認知症の一種であり後天的に知覚機能が失われ、物忘れといった記憶障害や行動、心理症状(徘徊、攻撃的言動、抑うつ、妄想)といった周辺精神神経症状をはじめとする症状によって日常生活に支障を来し社会的に問題となっている。発症後の細胞消失の進行機構はまだ不明な点が多く、さらに中枢神経組織は有効な神経再生が生じ難いため、治療及び、発症後期に対する有効な治療法は乏しい。私たちの報告は、神経細胞移植が認知症の新しい治療方針につながる点で意義深い。

研究成果の概要(英文)：We found that transplantation of human iPS cell-derived neurons into a mouse model of dementia resulted in the engraftment of human nucleoprotein-positive cholinergic and GABAergic neurons in the cortex and hippocampus, and the appearance of mouse-derived endogenous cholinergic neurons in the medial septum (MS) and vertical part of Broca's diagonal band (nBD), the nuclei of origin of the hippocampal cholinergic neurons. The researchers found a mixture of mouse-derived endogenous cholinergic neurons and human nucleoprotein-positive cholinergic neurons in the nucleus accumbens (nBD). In addition, cognitive function was improved. It is expected that the appearance of human protein-positive cholinergic neurons in MS and nBD may be related to the improvement of cognitive function in transplanted mice.

研究分野：神経科学

キーワード：認知症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は加齢に伴う認知症の一種であり、コリン作動性ニューロンの喪失は AD 症状の発症と密接に関係している。脳神経細胞の変性と組織萎縮 (アルツハイマー型) や、脳血管障害などにより死滅することにより、発症し、後天的に知覚機能が失われ、物忘れといった記憶障害や行動、心理症状 (徘徊、攻撃的言動、抑うつ、妄想) といった周辺精神神経症状をはじめとするいくつかの症状によって日常生活に支障を来す状態をいう。認知症では特に、記憶に関係している海馬の萎縮が早期から起こる。また、発症後の細胞消失の進行機構はまだ不明な点が多く、さらに中枢神経組織は有効な神経再生が生じ難いため、治療及び、発症後期に対する有効な治療法は乏しい。私たちはこれまで、難治性神経疾患の新規治療法として再生医療に着目し、神経細胞移植が AD モデルマウスの認知機能障害を改善することを報告した。しかし、移植された神経がどのように AD モデルマウスの認知機能障害を改善するかどうか、また、認知機能障害や不安・抑うつなどの精神神経症状を改善できるのかは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、神経細胞移植の前後で、NPS が認知機能障害と相関しているかどうか、AD モデルマウスの神経細胞移植前後の認知機能障害との相関を検証した。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞誘導神経 (前駆) 細胞の性状解析と分化誘導因子同定

hiPS 細胞は RIKEN Cell Bank から既に購入している (cell name : 253G1, cell number : HPS0002)。培養方法は RIKEN Cell Bank の方法に従い、フィーダー細胞としてマウス繊維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast : MEF) を用いる。塩基性繊維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF) を添加することで未分化な状態を保持しつつ培養を行っている。hiPS 細胞を培養ディッシュから解離した後、bFGF を除いた培地に懸濁し、4 日間の浮遊培養によって胚様細胞塊 (embryoid body : EB) を作製する。bFGF の除去が分化への引き金となる。次に EB をフィブロネクチンでコートした培養ディッシュに播種する。24 時間後培地を分化培地に交換し、同時にレチノイン酸 (retinoic acid : RA), ノジン (noggin : NOG), ソニックヘッジホック (sonic hedgehock : SHH) を加える (1 次刺激)。48 時間培養後、再度 RA, SHH, NOG を加える (2 次刺激)。24 時間後細胞を回収し、RNA を抽出する。RT 反応の後、PCR を行い神経分化関連遺伝子の mRNA の発現量を検討する。細胞の分化誘導及び移植のスケジュールについては以下参照。細胞はトリプシン、コラゲナーゼで消化した後にシングル化し、PBS に濃度 $1.0 \times 10^5 / \mu\text{l}$ 懸濁して $2 \mu\text{l}$ 移植した (図 1)。

(2) 神経細胞移植

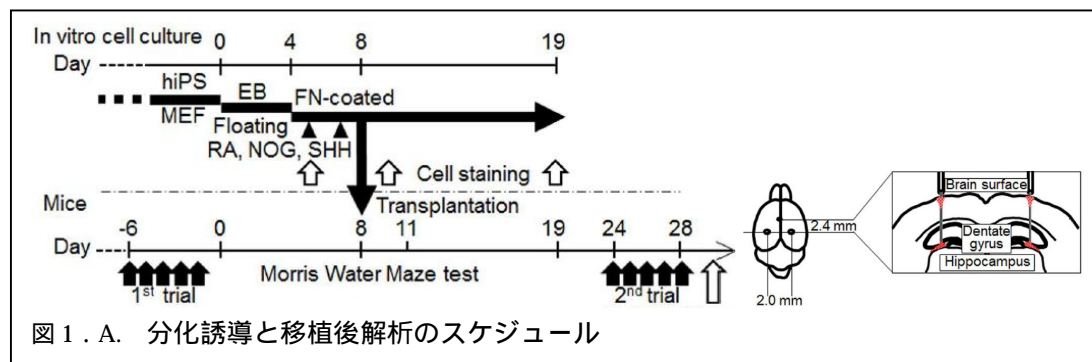
PDAPP マウスはマウスの飼育維持は聖マリアンナ医科大学動物指針に従って行った。移植前にデキサメタゾン ($2\text{mg} / \text{kg}$) を投与し、シクロスポリン ($3\text{-}8\text{mg} / \text{kg}$) を毎日投与した。麻酔下にて bregma から両側 2.4mm posterior, 2.0mm lateral, 1.25mm depth に移植した。

(3) Morris water maze test

Morris water maze test は Chen et al. 2000 に従って行った。具体的には不透明な色で満たした 1m プールにプラスチック製の大出プラットフォームを水中に配置し最大 90 秒間自由に泳がせ、プラットフォームへの到達時間を測定した。初日にはプラットフォームが水面上に見えるように配置し、またプールの周り四方に空間的な手がかりになるものを配置した状態にて訓練を行う。翌日から 4 日プラットフォームを見えなくして到達時間を測定し、最終日にはプラットフォームをなくし、プラットフォームの存在していた領域を横切る回数を計測した。動物の動きは Image J を元にしたソフトを用いて解析した (図 1.B-F)。

(4) 脳組織解析

マウスは麻酔後 4% パラホルムアルデヒドを用いて還流固定を行い、脳組織を取り出し厚さ $30\ \mu\text{m}$ の冠状凍結切片を作成し、各神経マーカーに対する免疫組織化学染色を行った。



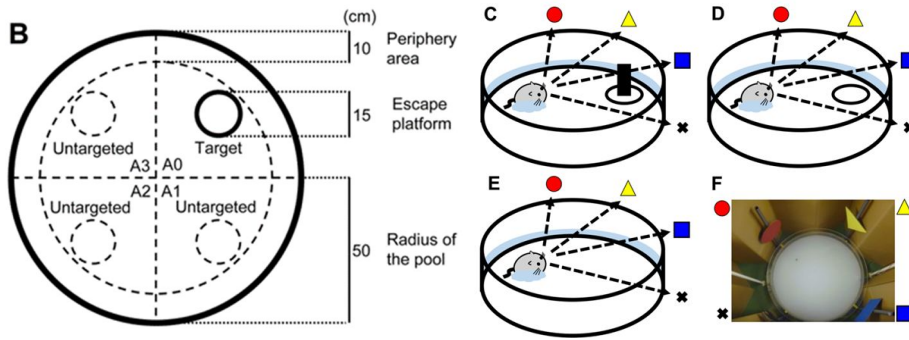


図 1. B ~ F モリス水迷路試験による機能評価

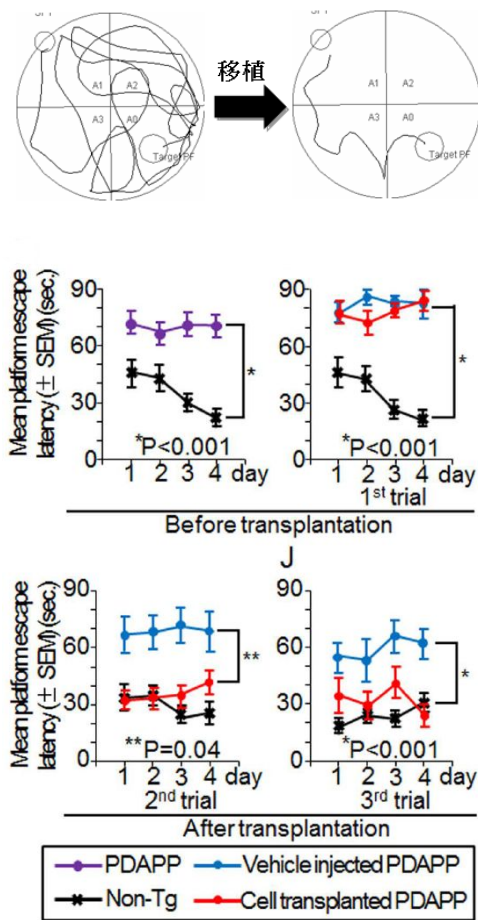


図 2 . 移植前、後マウスにおけるモリス水迷路試験の改善

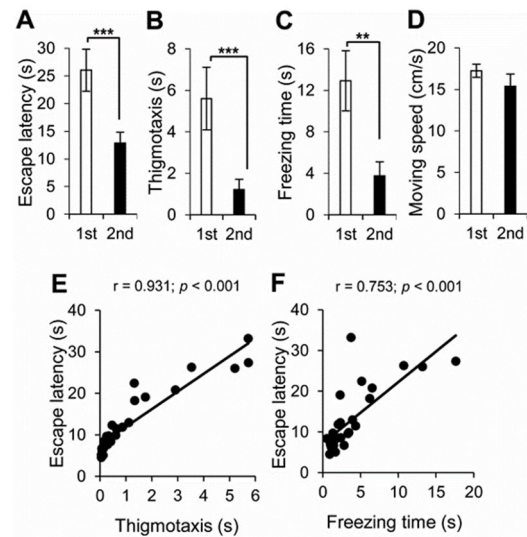


図 3. 神経細胞移植後の APP tg マウスの行動・精神神経症状

(A) escape latency for motivation to escape the water, (B) thigmotaxis for anxiety, (C) freezing time for depression, and (d) moving speed for locomotion activity. Average and sEM values are shown.

P<0.01; *P<0.001. (E, F) A correlation analysis

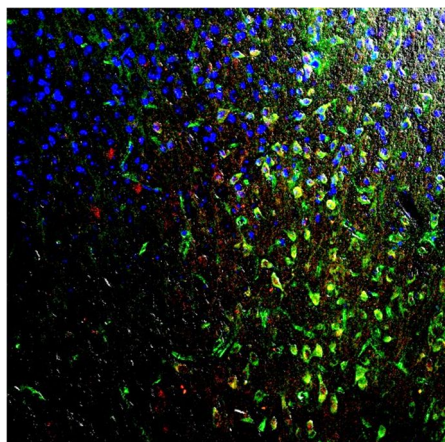


図 4. ヒト iPS 細胞由来の神経細胞の MS への局在
赤 : ラベル移植細胞
緑 : choline acetyltransferase 陽性

4 . 研究成果

hiPS 細胞からレチノイン酸 (RA)、ソニックヘッジホック (SHH)、ノジン (NOG) の 3 因子を用いて、神経細胞の分化誘導に成功した。分化誘導した細胞は移植時には神経細胞マーカーを発現しており、コリン作動性神経及びまた非常に少ない割合ではあったが VGAT 陽性細胞も分化誘導されていた。神経細胞移植により、AD マウスの不安と抑うつが有意に改善され、運動量もわずかに改善されることがわかった。また、相関分析により AD マウスの空間学習機能は、細胞移植の前後で NPS スコアと同様の相関があることがわかった。一方、細胞移植を行ったマウスでは、野生型と同様な空間参照記憶機能を示し、NPS スコアと相関がなかった (図 2, 3)。これらの結果は、AD モデルマウスへの神経細胞移植は、認知機能障害と同程度に NPS を有意に改善することが示唆された。ヒト iPS 細胞由来神経幹・前駆細胞の移植を行った結果、移植細胞は移植個所においてコリン作動性神経に分化することができた。移植後の認知機能の改善が見られたマウス脳において針刺し部海馬と針刺し部周囲の大脳皮質周囲にヒト核蛋白陽性のコリン作動性神経と GABA 作動性神経が生着して、シナプス形成を行うことを見出した。これらの結果は、コリン作動性系と GABA 作動性系などの異なるメカニズムを介していることが示唆された。移植細胞の軸索伸長(投射)する場所を調べる目的で、認知機能の改善が認められたマウスの移植後の脳での移植細胞の局在を詳細に調べた。その結果、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。また、海馬コリン神経の起始核である内側中隔(MS)とブローカの前角帯垂直部(nBD)にマウス由来の内因性のコリン作動性神経細胞の出現とヒト核蛋白陽性のコリン作動性神経が混在して出現することを見出した (図 4)。

すなわち、この神経細胞移植は、移植されたヒト神経細胞だけでなく、内因性のマウス由来のコリン神経細胞の再生・分化をもたらし、コリン神経は軸索伸長(投射)すると考えられる。この MS と nBD に出現したヒト各タンパク陽性コリン作動性神経の出現と移植マウスにおける認知機能の改善に関わることが期待される。

1. Murayama MA, Arimitsu N, Shimizu J, Fujiwara N, Takai K, Okada Y, Hirotsu C, Takada E, Suzuki T, Suzuki N. Dementia model mice exhibited improvements of neuropsychiatric symptoms as well as cognitive dysfunctions with neural cell transplantation. *Exp. Anim.* 2021; 70(3): 387–397
2. Murayama MA, Arimitsu N, Shimizu J, Fujiwara N, Takai K, Okada Y, Hirotsu C, Takada E, Suzuki T, Suzuki N. Female dominance of both spatial cognitive dysfunction and neuropsychiatric symptoms in a mouse model of Alzheimer's disease. *Exp. Anim.* 2021; 70(3): 398–405

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

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(3)
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, Okada Y, Hirotsu C, Takada E, Suzuki T, Suzuki N.	4. 巻 70(3)
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	藤原 成芳 (Fujiwara Naruyoshi) (50365425)	聖マリアンナ医科大学・医学部・講師 (32713)	
研究分担者	村山 正承 (Murayama Masanori) (60737675)	関西医科大学・医学部・講師 (34417)	

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
---------	---------