

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008 年度～2009 年度  
 課題番号：20790850  
 研究課題名 (和文) 統合失調症に対する自己細胞移植療法の可能性  
 —有効性に関する事前体外診断法の確立—  
 研究課題名 (英文) Possibility of autologous cell transplantation therapy  
 研究代表者  
 小野 貴文 (ONO TAKAFUMI)  
 札幌医科大学・医学部・研究員  
 研究者番号：50438024

## 研究成果の概要 (和文)：

経静脈の神経幹細胞移植は、統合失調症モデル動物の陰性症状・認知機能障害と考えられる行動異常を抑制することが示された。また、外来性神経幹細胞には、統合失調症モデル神経細胞障害に対する神経保護効果および神経新生促進効果が認められ、神経保護効果のメカニズムには、統合失調症との関連が指摘されている細胞内シグナル蛋白である Akt および ERK の活性化が関与している可能性が示唆された。

## 研究成果の概要 (英文)：

We have suggested that the intravenous transplantation of neural stem cells could recover the negative symptom and cognitive dysfunction in the schizophrenic animal model. The exogenous neural stem cells have shown the neuroprotective effect and the promotive effect of neurogenesis, and the change of Akt and ERK activation may be concerned with the mechanism of the neuroprotective effect.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

## 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：精神薬理学

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症は 10 代後半から 20 代にかけて大きな発症ピークを持つ慢性精神疾患で、生涯罹患率は約 1%とされている。治療の中心は薬物療法であるが、従来からあるいわゆる定型抗精神病薬では、幻覚・妄想・精神運

動興奮などのいわゆる陽性症状は改善するものの、無為・自閉・感情の平板化などのいわゆる陰性症状が残遺したり、振戦・歩行障害などの副作用により社会生活上大きな支障を残すことが多くみられてきた。近年の非定型抗精神病薬の登場により、陰性症状や副

作用の問題は幾分改善されてはきたが十分とは言えず、薬物療法のみでは治療が困難であったり、また、電気けいれん療法など他の治療法を併用しても反応性に乏しい難治性のケースがいまだ多いのが現状である。

従来より、統合失調症の病因・病態を探る試みは、神経病理学的研究、画像学的研究、神経心理学的研究、遺伝学的研究など様々な角度から検討がされてきたが、いまだその実体の詳細な把握はなされておらず、根本的な治療法開発への道筋は定まっていない。しかしながら、神経病理学的研究における大脳皮質・海馬の神経細胞の体積減少、および画像学的研究における脳実質の委縮、脳室の拡大の所見は、統合失調症の病態基盤に、シナプティックな成熟神経細胞の機能変化にとどまらない、脳神経回路網の形成・維持・修復の異常が深く関わる可能性を示唆していると考えられる。

我々はこれまでに、ヒト死後脳、モデル動物・細胞を用いて、統合失調症治療薬の処置によって、神経幹細胞から神経細胞への分化が促進されること、また、この神経幹細胞の機能変化に、栄養因子シグナル伝達系と細胞内小器官、小胞体の機能変化が関わっていることを見出し、統合失調症治療薬が神経幹細胞の機能に影響を及ぼすことで脳神経回路の発達・再生を促進させ、そのことが治療薬の臨床効果発現と深く結びついている可能性を明らかにしてきた。また、妊娠期の母親のアルコール摂取により子供の生後の脳機能発達と成長後の認知・行動異常を引き起こす疾患で、統合失調症同様に脳の神経回路網の異常との関わりが指摘されている胎児性アルコール症候群(FAS)に対する神経幹細胞移植療法の可能性について解析・検討を進め、FASモデルラットの認知・行動異常が神経幹細胞移植により改善することを *in vivo* 検討で示してきた。

## 2. 研究の目的

これらの背景・知見をふまえて、本研究は、統合失調症の病態基盤と考えられる脳神経回路網の異常に対する新たな治療的アプローチを検討・解析するという観点から、統合失調症モデル障害に対する神経幹細胞移植の有効性について *in vivo*、*in vitro* 両面から探索し、臨床応用にむけて移植予定細胞の治療能力(神経保護能、神経新生促進能など)の有無に関する事前解析法の確立をすすめていくことを目的とする。具体的には、神経幹細胞移植による統合失調症の症状改善効果を *in vivo* においてモデルラットを用いて解析し、また、*in vitro* の評価系を用いて、移植細胞の脳内での役割に関する解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 神経幹細胞移植療法の有効性に関するモデル動物を用いた行動学的解析

モデル動物種としてラットを用いた。コントロール群に対し、胎生期に Poly I:C(ウイルス感染を mimic させる薬剤)を投与した病態モデル群、及び、生後1カ月目に神経幹細胞を経静脈的に移植した治療群をそれぞれ作成し、生後7カ月目に、各群のモデルラットについて、オープンフィールド試験、ソーシャルインターアクション試験、新奇物質探索試験による行動評価を行った。

### (2) 神経細胞・神経幹細胞の培養

神経細胞は、妊娠18日のラット胎仔脳から摘出した皮質を、トリプシン処理後、DMEM培地に懸濁し、ポリリジンコーティングした培養プレートに播種し、10-14日間培養した。

神経幹細胞は、妊娠13.5日のラット胎仔脳から摘出した終脳を、ピペッティング分散後、FGF-2を含むNBM培地に懸濁し、オルニチン及びフィブロネクチンでコーティングした培養ディッシュに播種し、5-7日間培養し神経幹細胞を選択的に増殖させた。

### (3) 外来性神経幹細胞による神経保護効果の解析

#### ① 神経細胞生存能の評価

統合失調症モデル神経細胞障害として、NMDA受容体拮抗薬であるMK-801の処置、および栄養因子であるB27サプリメントの細胞培養液からの除去という2通りの障害を用いた。培養神経細胞に対して、障害と同時に、ケモタキシンチャンバーを介して、神経幹細胞を処置した。これらの処置の48時間後、神経細胞の生存能についてMTT assay法を用いて解析した。

#### ② 細胞内シグナル蛋白の活性変化の評価

外来性神経幹細胞による神経細胞保護における、細胞内シグナル蛋白の活性変化について、Western blot法を用いて解析した。細胞内シグナル蛋白としては、統合失調症との関連が指摘されているAktおよびERKに着目した。

#### ③ 細胞内シグナル伝達経路阻害薬を用いた神経細胞生存能の変化の評価

Akt及びERKの活性変化が、外来性神経幹細胞による神経細胞保護に関連しているかどうかについて解析するために、障害および外来性神経幹細胞と同時に、PI3キナーゼ/Akt経路の阻害薬であるLY294002およびMAPキナーゼ/ERK経路の阻害薬であるU0126を処置し、神経細胞生存能の変化を解析した。

#### (4) 外来性神経幹細胞の神経新生促進能に関する解析

統合失調症モデル神経新生障害として、NMDA受容体拮抗薬であるMK-801の処置、および細胞培養液中のB27サプリメントの減量という2通りの障害を用いた。培養神経幹細胞

胞に対して、障害と同時に、ケモタキシスチャンパーを介して、別に準備した外来性神経幹細胞を処置した。これらの処置の72時間後、神経新生促進能について Tuj-1 ELISA 法を用いて解析した。

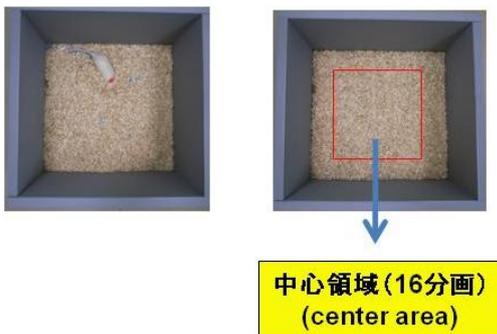
#### 4. 研究成果

(1) 神経幹細胞移植療法の有効性に関する行動学的解析

##### ① オープンフィールド試験

まず、積極性・常同性を評価するために、オープンフィールド内で10分間ラットを自由に行動させ、フィールドを36分画したうちの中心領域16分画にラットが滞在した時間を測定するというオープンフィールド試験を行った(図1)。病態モデル群ではコントロール群と比較し、有意に中心領域での滞在期間が短くなり、積極性の低下、常同性の亢進を示唆する結果となった。対して、経静脈的神経幹細胞移植を行った群では、それらの変化が有意に抑制された。

<図1>



##### ② ソーシャルインターアクション試験

次に、社会性を評価するために、2匹のラットを同時にフィールド内に入れ、10分間行動を観察し、能動的な社会的行動をとる時間と接触回数を測定するというソーシャルインターアクション試験を行った(図2)。病態モデル群ではコントロール群と比較し、時間・回数ともに有意に能動的な社会的行動は減少し社会性の低下が示唆された。対して、経静脈的神経幹細胞移植を行った群では、それらの変化が有意に抑制された。

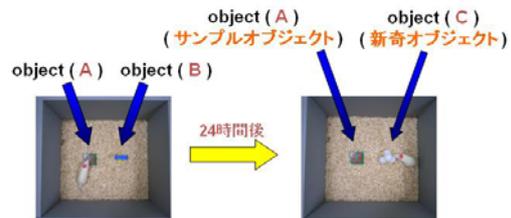
<図2>



##### ③ 新奇物質探索試験

最後に、認知・記憶の評価を行うために、2つのオブジェクトを置いたフィールド内で10分間ラットを自由に探索させ、24時間後に、一方を新奇オブジェクトと置換したフィールド内で5分間ラットを自由に探索させるという新奇物質探索試験を行った(図3)。24時間後の試験において、コントロール群では新奇オブジェクトへの探索時間が有意に長かったが、病態モデル群では、有意な差が認められず、認知・記憶の障害が示唆された。対して、経静脈的神経幹細胞移植を行った群では、それらの変化が有意に抑制された。

<図3>

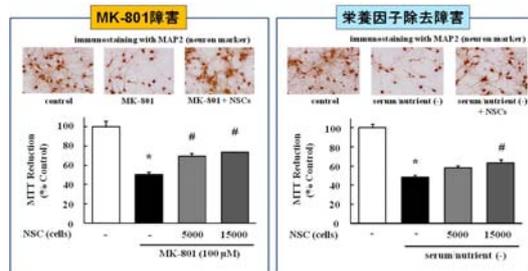


これらの結果から、統合失調症の陰性症状・認知機能障害に対して、経静脈的神経幹細胞移植が有効である可能性が示された。

(2) 神経細胞障害に対する外来性神経幹細胞の効果

MK-801 障害および栄養因子除去障害に対する外来性神経幹細胞の効果について検討を行ったところ、どちらの障害においても、外来性神経幹細胞は保護効果を呈する結果となった(図1)。

<図1>



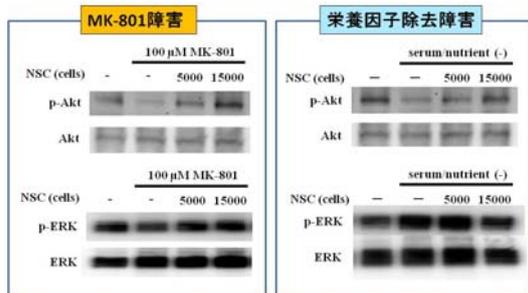
(3) 外来性神経幹細胞処置による Akt および ERK の活性変化

外来性神経幹細胞が統合失調症モデル神経細胞障害に対して保護効果を発揮するメカニズムを解析するために、統合失調症との関連が指摘されている代表的な細胞内シグナル蛋白である Akt と ERK の活性変化をウェスタンブロット法で調べた。MK-801 障害においては、Akt、ERK ともに障害により活性が低

下し、神経幹細胞処置により活性が増加する結果となった(図2)。

対して、栄養因子除去障害では、障害により Akt の活性は低下したが ERK の活性は逆に増加し、神経幹細胞処置はそれらの活性変化を抑制する結果となった(図2)。この結果から、栄養因子除去障害では、障害により Akt の活性が低下し、その変化に呼応する形で相補的に ERK の活性が高くなり、神経幹細胞処置はそれらの変化を抑制する方向に働いた可能性が推察された。

<図2>

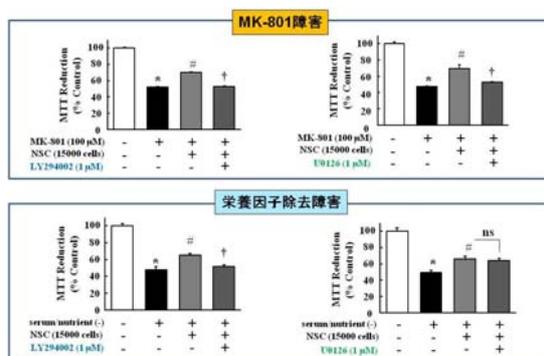


(4) Akt・ERK シグナル経路阻害薬による外来性神経幹細胞の神経保護効果の変化

前述の Akt、ERK の活性変化が外来性神経幹細胞の神経保護効果と関連しているかどうかについて解析するため、それぞれのシグナル伝達経路の阻害薬である LY294002 および U0126 を処置した時の外来性神経幹細胞による神経保護効果の変化を検討した。

MK-801 障害では、両方の阻害薬で神経幹細胞による神経保護効果が抑制されたが、栄養因子除去障害では、LY294002 では抑制されたが U0126 では抑制されないという、ウェスタンブロット法で示された Akt、ERK の活性変化と相関する結果となり、Akt、ERK の活性変化が外来性神経幹細胞の神経保護効果に関与するメカニズムの一つである可能性が示唆された(図3)。

<図3>

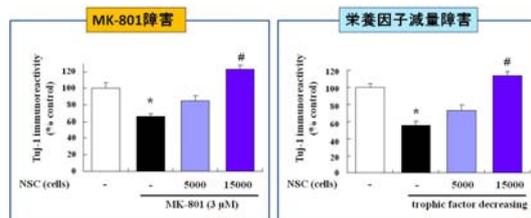


(5) 外来性神経幹細胞の神経新生促進能に

関する解析

MK-801 および栄養因子減量による神経新生障害に対する外来性神経幹細胞の効果について検討を行ったところ、どちらの障害においても、外来性神経幹細胞は神経新生促進効果を呈する結果となった(図4)。

<図4>



本研究により、in vivo の解析結果からは、神経幹細胞移植が統合失調症の陰性症状・認知記憶障害といったいわゆる慢性期に多くみられる症状に対して効果的であることが示された。また、in vitro の解析結果からは、in vivo で示された効果が、神経保護、神経新生促進といった機序を介して発揮されている可能性、および、その神経保護のメカニズムには、統合失調症との関連が指摘されている細胞内シグナル蛋白である Akt、ERK が関与している可能性が示唆された。

また、in vitro 実験で用いた手法は、細胞の治療能力に関する事前体外診断に応用できる可能性を有しており、本研究結果は、統合失調症に対する細胞移植療法、および、有効性に関する事前体外診断法の確立に大きく近づく結果と考えられる。

### 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3件)

- ① Ono T, Hashimoto E, Ukai W, Ishii T, Saito T: The role of neural stem cells for in vitro models of schizophrenia: neuroprotection via Akt/ERK signal regulation. Schizophrenia Research, 査読有, in press.
- ② 橋本恵理, 鵜飼渉, 小野貴文, 齋藤利和: 非定型抗精神病薬の神経新生作用. 脳21, 査読有, 12 巻, 2009 年, 195-199.
- ③ 鵜飼渉, 橋本恵理, 石井貴男, 吉永敏弘, 渡邊公彦, 小野貴文, 館農勝, 渡邊一平, 白坂智彦, 齋藤利和: 気分障害における神経回路網の修復再生と認知機能. 臨床精神医学, 査読有, 38 巻, 2009 年, 421-428.

[学会発表] (計5件)

- ① Ukai W: Stem cell therapy as a new

treatment strategy for schizophrenia. Neuroscience 2009, 2009年10月18日, Chicago.

- ② 小野貴文：神経幹細胞移植は統合失調症の慢性期症状を抑制する. 第31回日本生物学的精神医学会, 2009年4月25日, 京都.
- ③ Ono T: Altered trophic factor signaling in the mechanism of neuroprotection by exogenous neural stem cells. Neuroscience 2008, 2008年11月19日, Washington, DC.
- ④ 小野貴文：アルコール性精神障害に対する神経幹細胞移植療法の可能性に関する検討. 第20回日本アルコール精神医学会 第11回ニコチン・薬物依存研究フォーラム 平成20年度合同学術総会, 2008年9月16日, 横浜.
- ⑤ 小野貴文：The effect of exogenous neural stem cell against the damaged neurons and neural stem cells. 第51回日本神経化学会, 2008年9月12日, 富山.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小野 貴文 (Ono Takafumi)  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：50438024