

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22390188

研究課題名（和文）

中枢性尿崩症の再生治療

研究課題名（英文）

The regenerative therapy for central diabetes insipidus

研究代表者

大磯 ユタカ (Oiso, Yutaka)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40203707

研究成果の概要（和文）：我々はマウス ES 細胞由来視床下部誘導系(ES-hypo)の培養法を改良し、より簡易な方法で高効率にバゾプレシンニューロンを得ることができた。中枢性尿崩症は視床下部の障害によるバゾプレシン合成分泌障害のため、多飲多尿を主徴とする難治性疾患である。疾患モデル動物であるブラットルボローラットのラットの視床下部領域に単離した ES-hypo を細胞移植したところ、6 週間経っても細胞は生着しており、移植治療により 40% 程度の尿量減少が見られた。

研究成果の概要（英文）：It is known mouse embryonic stem cell can be developed into hypothalamic lineage (ES-hypo) in vitro. In this study, we have improved the method to have vasopressin neurons more effectively. Central diabetes insipidus manifests polyuria and polydipsia which results from the deficit in the hypothalamic area that produce vasopressin. We have developed a regenerative therapy using ES-hypo in the model animal, Brattleboro rat. The heterograft of ES-hypo in the brain survived more than six weeks, and recipients reduced urine volume by 40% compared to the negative control group.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2012 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
総計	10,800,000	3,240,000	14,040,000

研究分野：内分泌代謝学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：再生医学、中枢性尿崩症、生理活性

1. 研究開始当初の背景

ここ数年、幹細胞、ES 細胞、iPS 細胞等を用いた再生医療研究が急速な進歩を遂げる中で、昨年末世界に先駆けて、理研の笹井芳樹グループディレクターらが、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) からバゾプレシン分泌ニューロンを分化させることに成功した(以後 ES-AVP 細胞) [wataya,PNAS 2008]。研究グループでは、これまでに開発していた大脳分化誘導のための無血清浮遊培養法 (SFEBq

法) を改良し、視床下部前駆細胞の分化誘導を可能とした (図 1)。さらに、この前駆細胞から、視床下部の背側部の神経内分泌細胞や、視床下部の腹側部の摂食調節ニューロンへ選択的に分化させることにも成功した。特に、視床下部背側部に存在するバゾプレシンを産生するニューロンの分化誘導では、このホルモンを正常成人の血中の数倍の濃度で分泌することも確認した (図 2)。

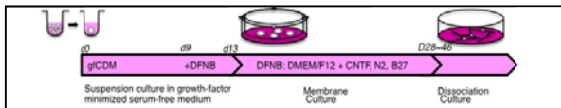
2. 研究の目的

中枢性尿崩症は、抗利尿ホルモンであるバゾプレシン分泌不全により多飲、多尿を主症状とする難治性の疾患であり、視床下部-下垂体に存在するバゾプレシンニューロンの障害に起因する。治療法はホルモン経鼻投与のみであるが、用量調節が難しいため完全な治療法とはいえず、再生医療の開発が切望されている。2008年理化学研究所で、マウスES細胞から無血清培養法を用いたバゾプレシンニューロン分化法が開発された。このES由来バゾプレシン細胞（以下ES-AVP細胞）を利用して、中枢性尿崩症モデル動物における細胞治療法の開発を行ない、再生治療の技術基盤の確立を目指した。

3. 研究の方法

研究はES-AVP細胞それ自体の解析、並びにモデル動物の再生治療、の2段階に大きく分けられる。

- (1) ES-AVP細胞を得るには、まずマウスES細胞から無血清浮遊培養法により視床下部背側ニューロンの細胞塊を分化誘導する（下図）。14日目から細胞塊をTransWellシステムに移し半気相培養をさらに14日程度行なう。得られたES-AVP細胞について、バゾプレシン産生能、各種刺激に対する応答性を解析して基礎的データを得る。

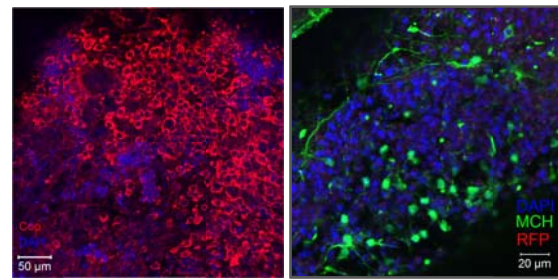


- (2) ES-AVP細胞を疾患モデル動物に移植し、尿量減少効果などを指標に治療効果を判定する。疾患モデル動物として、Brattleboro ratを用いる。これは自然発生系統で、バゾプレシン遺伝子ニューロフィジン領域の1塩基欠損によるフレームシフトにより前駆体蛋白異常が起こるため、バゾプレシン合成障害によりホモ変異体で多飲多尿を呈する。長期的な生着率、効果の持続期間および安全性、自律的分泌調節性についても検討を行う。

4. 研究成果

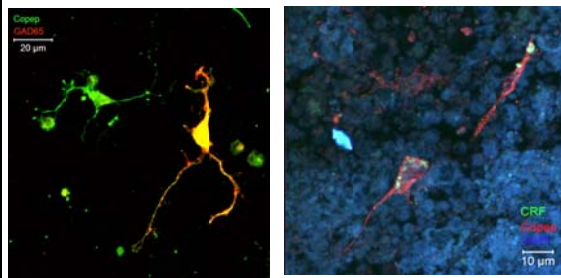
(1) ES-AVP細胞の性質

- ① ペプチド産生ニューロンの共存：分化後28日目程度の細胞塊は、バゾプレシンを始め（メラニン凝集ホルモン：MCH）、オレキシン、TH、CRHなど種々のペプチド産生ニューロンが混在している（下図）。



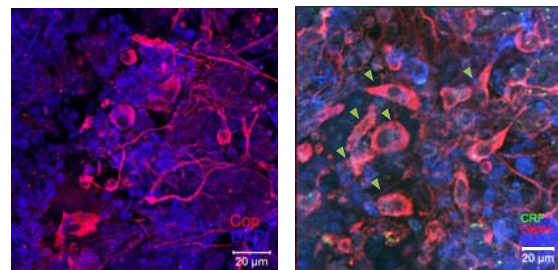
バゾプレシン(赤) MCH(緑)

- ② バゾプレシンと各種生理活性物質の共発現：バゾプレシンニューロン自体も、GABA、CRHなどの生理活性物質を共発現していることを明らかにした（下図）。



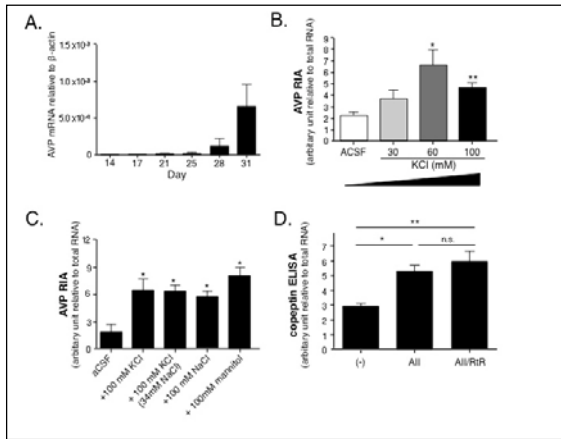
GAD65(赤)・バゾプレシン(緑) CRH(緑)・バゾプレシン(赤)

- ③ 細胞成熟と視床下部器官形成：細胞塊を分化誘導後46日程度までさらに培養を続けると、バゾプレシンニューロンの細胞体が20μmを超える大きなCRH陰性の細胞が多数集簇して出現した（下図、矢印）。これは視床下部視索上核および室傍核に存在する、大細胞と呼ばれるバゾプレシンニューロンに形状がよく似ており、視床下部への器官形成が行なわれていることの一つの証拠と考えられる。



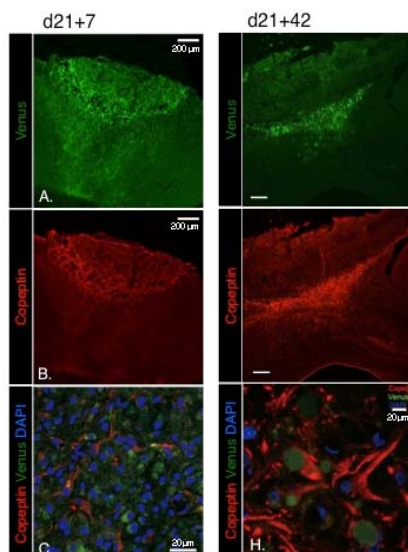
バゾプレシン(赤) CRH(緑)

- ④ バゾプレシン分泌能：細胞塊を100mM KCl（次頁図B）、100mM NaCl、100mM マンニトール（次頁図C）10nM アンギオテンシンII（次頁図D）で刺激した所、いずれもバゾプレシン分泌は3倍以上に増加した。



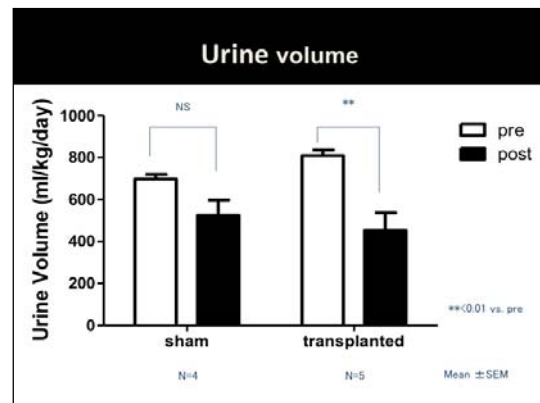
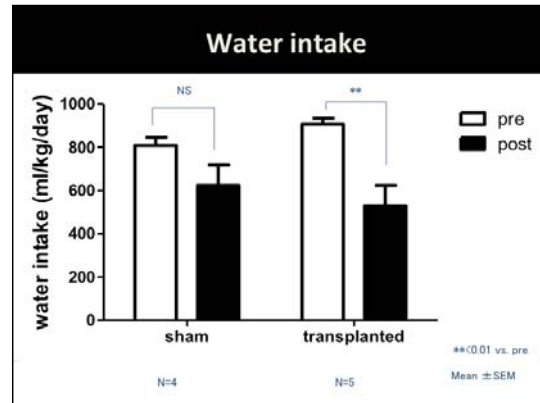
(2) モデル動物への移植治療

- ① 細胞移植：ES-AVP 細胞を分化誘導後 21 日でパパイインにより分散し、ステレオ固定装置を用いて細胞浮遊液を尿崩症モデル動物である Brattleboro rat の右視床下部視索上核近傍に片側性に 2000～4000/匹個移植した。
- ② 細胞の生着：マウス脳切片における移植組織を移植後 1 週 (下図左) 及び 6 週 (下図右) で採取した。移植細胞の中に AVP 陽性細胞を多数確認できた。6 週後の標本ではバゾプレシン細胞体の増大、神経突起の増加、バゾプレシン発現量の増加など、神経の成熟が見られた。
- ③ 治療効果：移植ラットを代謝ケージで 8 週間飼育して尿量, 飲水量, 体重, 尿中 AVP 量などの生理的パ



ラメータをモニターした。尿量及び飲水量は 4 週目から有意な減少

傾向を示し、8 週目では 40% 程度の有意な減少が見られた。4 週から 8 週の飲水量及び尿量の平均を示す (下図)。また、8 週目において、12 時間脱水負荷を行ったが、特に移植細胞からの調節性 AVP 分泌は見られなかった。



- ④ 安全性：今回は 8 週まで観察したが、細胞のがん化や奇形種をはじめとするいかなる腫瘍性病変も発生しなかった。

結語：マウス ES 由来視床下部細胞を、中枢性尿崩症モデル動物の中枢神経系に移植した。移植後 4 週目から飲水量及び尿量は有意に減少し、尿量は対照群に比べて 40% 程度減少するという治療効果を得た。移植後 1 週と 6 週で、移植組織を比較した所、6 週でバゾプレシン陽性細胞体の増大、及び神経突起の増加など、成熟したニューロンへの変化が見られた。本研究により、中枢性尿崩症の再生治療の可能性が動物レベルで示された。

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 10 件)

- ① Lesion of area postrema attenuated hyperphagic responses to glucoprivation,

- but not transcriptional activation of the neuropeptide Y gene in rats.
Ozawa Y, Arima H, Banno R, Ito Y, Goto M, Morishita Y, Sugimura Y, Ozaki N, Nagasaki H, Oiso Y.
Neuroreport. 査読有, 2012 Aug 1;23(11):673-5.
- ② BiP mRNA expression is upregulated by dehydration in vasopressin neurons in the hypothalamus in mice.
Hagiwara D, Arima H, Morishita Y, Goto M, Banno R, Sugimura Y, Oiso Y.
Peptides. 査読有, 2012 Feb;33(2):346-50. 2012 Jan 2. [Epub ahead of print]
- ③ TNF α increases hypothalamic PTP1B activity via the NF κ B pathway in rat hypothalamic organotypic cultures.
Ito Y, Banno R, Hagimoto S, Ozawa Y, Arima H, Oiso Y.
Regul Pept. 査読有, 2012 Feb 10;174(1-3):58-64.
- ④ Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture.
Suga H, Kadoshima T, Minaguchi M, Ohgushi M, Soen M, Nakano T, Takata N, Wataya T, Muguruma K, Miyoshi H, Yonemura S, Oiso Y, Sasai Y.
Nature 査読有, 2011 Nov 9;480(7375):57-62.
- ⑤ Poly(A) tail length of neurohypophysial hormones is shortened under endoplasmic reticulum stress.
Morishita Y, Arima H, Hiroi M, Hayashi M, Hagiwara D, Asai N, Ozaki N, Sugimura Y, Nagasaki H, Shiota A, Takahashi M, Oiso Y.
Endocrinology. 査読有, 2011,Dec;152(12): 4846-55. Epub 2011
- ⑥ Repeated glucoprivation delayed hyperphagic responses while activating neuropeptide Y neurons in rats.
Ozawa Y, Arima H, Watanabe M, Shimizu H, Ito Y, Banno R, Sugimura Y, Ozaki N, Nagasaki H, Oiso Y.
Peptides. 査読有, 2011 Apr;32(4):763-9. Epub 2010 Dec 22.
- ⑦ Time-dependent changes in proinflammatory and neurotrophic responses of microglia and astrocytes in a rat model of osmotic demyelination syndrome.
Iwama S, Sugimura Y, Suzuki H, Suzuki H, Murase T, Ozaki N, Nagasaki H, Arima H, Murata Y, Sawada M, Oiso Y.
Glia 査読有, 2011; 59(3):452-62.
- ⑧ Minocycline Prevents Osmotic Demyelination Syndrome by Inhibiting the Activation of Microglia.
Suzuki H, Sugimura Y, Iwama S, Suzuki H, Nobuaki O, Nagasaki H, Arima H, Sawada M, Oiso Y.
J Am Soc Nephrol. 査読有, 2010、 21(12):2090-8.
- ⑨ Mechanisms Underlying Progressive Polyuria in Familial Neurohypophysial Diabetes Insipidus.
Arima H, Oiso Y.
J Neuroendocrinol. 査読有, 2010 Jul;22(7):754-7.
- ⑩ Activation of vasopressin neurons leads to phenotype progression in a mouse model for familial neurohypophysial diabetes insipidus.
Hiroi M, Morishita Y, Hayashi M, Ozaki N, Sugimura Y, Nagasaki H, Shiota A, Oiso Y,

Arima H.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.

査読有, 2010 ;298 (2):R486-93.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 長崎 弘, 福岡一貴, 小谷 侑, 須賀英隆,
笹井芳樹、金子葉子、中島 顕, 大磯ユタカ
丸、太田 明, マウス ES 細胞由来視床下
部誘導系におけるバゾプレシン細胞の解
析. 第 59 回中部日本生理学会 平成 24
年 11 月 17 日 自然科学研究機構岡崎コ
ンファレンスセンター
- ② 福岡一貴、長崎 弘、須賀英隆、清田篤志、
梶村益久、有馬寛、笹井芳樹、大磯ユタカ.
マウス ES 細胞由来視床下部細胞系によ
る中枢性尿崩症治療. 第 35 回日本神経
科学大会 平成 24 年 9 月 18 日 名古屋
国際会議場
- ③ 長崎 弘 (1 番目) 大磯ユタカ (9 番目)
(全 9 名). マウス ES 細胞由来—視床下
部培養系における視床下部ニューロンの
発生. 第 85 回日本内分泌学会学術総会
平成 24 年 4 月 20 日 名古屋国際会議場
- ④ 福岡一貴, 長崎 弘 (2 番目)、大磯ユタカ
(9 番目) (全 9 名). 再生医療による中
枢性尿崩症治療法の開発. 第 85 回日本内
分泌学会学術総会 平成 24 年 4 月 20 日
名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大磯 ユタカ (OISO YUTAKA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40203707

(2) 研究分担者

長崎 弘 (NAGASAKI HIROSHI)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：30420384

(3) 連携研究者

須賀 英隆 (SUGA HIDETAKA)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：20569818