

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24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659168

研究課題名（和文） 幹細胞による脊髄小脳変性症の治療法開発の基礎的研究

研究課題名（英文） Stem cell therapy for spinocerebellar degeneration

研究代表者

水澤 英洋（MIZUSAWA HIDEHIRO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30144091

研究成果の概要（和文）：

小脳プルキンエ細胞が選択的に脱落する脊髄小脳変性症に対する再生治療法を確立することが本研究の目的である。まず、我々が世界で先駆けて報告した手法で、マウス ES 細胞より小脳プルキンエ細胞を分化誘導した。誘導された小脳プルキンエ細胞は、シナプスを形成し電気生理学的にも活性を持ち、成熟した機能する神経細胞であることが確認できた。また、脊髄小脳変性症モデルマウスに同細胞を移植したところ、プルキンエ細胞の形態を保ったまま生存していることが確認された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to establish novel stem cell therapy for spinocerebellar degeneration.

We successfully established a system that induced the maturation of Purkinje cells (PCs) derived from mouse ES cells (ESC). ESC-derived Purkinje cells (EDPCs) showed the morphology of mature PCs and synaptogenesis with other cerebellar neurons. Furthermore, the electrophysiological properties of these EDPCs were compatible with those of native mature PCs *in vitro*, which were assessed by whole-cell patch-clamp recordings. Next, we transplanted these EDPCs into the cerebellum of Purkinje cell degeneration (PCD) mouse. Transplanted EDPCs showed abilities to survive and maintain mature Purkinje cell morphology *in vivo*.

Thus, EDPCs show promise as a powerful source for stem cell therapies aimed at spinocerebellar degeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1800000	0	1800000
2011年度	1100000	330000	1430000
年度			
年度			
年度			
総計	2900000	330000	3230000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：

神経分子病態学、脊髄小脳変性症、ES 細胞、骨髄間葉系幹細胞、プルキンエ細胞、神経新生、再生医療、モデル動物

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症は小脳、脳幹の萎縮が徐々に進行する難治性神経変性疾患で、高齢者の失調症状の原因の中心であるとともに、本邦での発症率は7-10/10万人と少なくない疾患である。近年の分子生物学の発達により中枢神経変性のメカニズムは徐々に解明されているものの、いまだ有効な治療法はなく、効果的な治療法の開発が望まれている。

パーキンソン病では中脳黒質のドーパミン産生神経細胞が選択的に脱落することで発症することから、以前より胎児由来の黒質細胞を移植し補充する治療法が試みられ、実際に効果があることが知られている。同様に、脊髄小脳変性症では、小脳のプルキンエ神経細胞が選択的に変性・脱落するため、それを補充することの可能な細胞移植は有望な治療法と考えられる。近年、韓国から脊髄小脳変性症の一つである多系統萎縮症患者に対し骨髄間葉系細胞を経静脈的に投与し、障害部位である小脳/脳幹部の代謝改善、神経症状の改善効果があったことが報告された。

このように、幹細胞治療は脊髄小脳変性症に対して治療効果があることが期待でき、その応用範囲は非常に高いと考えられるが、現時点では未分化な幹細胞を障害部位に移植するのみで、変性した神経細胞を特異的に作り出し、細胞補充を行う試みはなされていない。

すなわち、様々な難治性疾患において障害部位特異的な細胞を作成し、移植の効果を検証することが来るべき幹細胞治療の時代に備えて非常に重要と考えられる。

2. 研究の目的

我々はマウス胚性幹細胞（以下 ES 細胞）から小脳プルキンエ細胞を選択的に誘導する培養法を初めて確立した。本研究では、まず、ES 細胞由来の小脳プルキンエ細胞 (EDPC) がどのような条件で最も分化能を発揮するかを検討し、さらに形態学的な成熟度とともに、シナプス形成の有無、電気生理学的な活性の有無を検討する。

さらに、Purkinje cell degeneration (PCD) mouse などの脊髄小脳変性症モデル動物に対し、我々の誘導系で得られた ES 細胞由来のプルキンエ細胞を移植し、生存能、分化能を検討することにより難治性神経疾患に対する神経再生治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

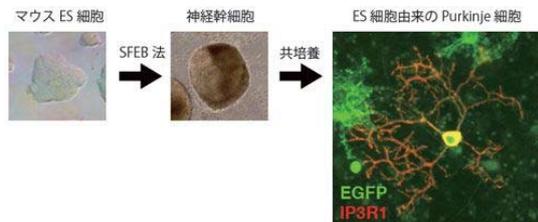
1. 我々が開発した方法により、マウス ES 細胞より、プルキンエ細胞を分化誘導する（原著論文 1 参照）
2. 共培養する小脳初代培養系の条件による

生存能、分化能の変化を *in vitro* で評価する

3. 誘導された小脳プルキンエ細胞に対して、免疫染色及び、パッチクランプ法によりシナプス形成能、電気生理学的機能を確認する
4. 脊髄小脳変性症のモデル動物 (PCD マウス) 小脳に、ES 細胞由来のプルキンエ細胞 (EDPC) を定位的に移植し、生存能、分化能を確認する
5. その他、脳梗塞モデルや虚血性末梢神経障害モデルなどで障害を受ける細胞を補充する治療法の効果を確認する。

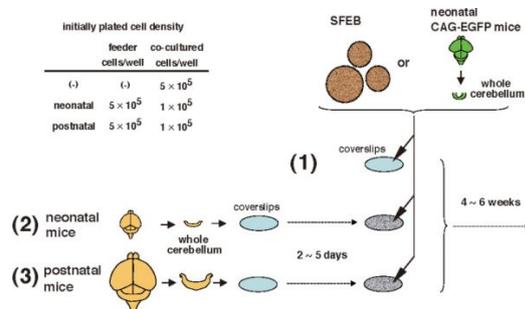
4. 研究成果

1. マウス ES 細胞からプルキンエ細胞 (EDPCs) を分化誘導する



マウス ES 細胞（上図左）を無血清下で浮遊培養すること (SFEB 法) により神経幹細胞が誘導される（上図中央）が、この過程で適切な誘導因子 (BMP4/Fgf8b/Wnt3a) を作用させると小脳ニューロン前駆細胞を含む細胞塊が得られる。これを小脳初代培養系と共培養することにより、ES 細胞由来の小脳プルキンエ細胞が得られる（上図右）。誘導された細胞はプルキンエ細胞特異的のマーカである IP3R1 陽性であることが確認出来る。

2. 小脳初代培養系の違いによる分化能の検討

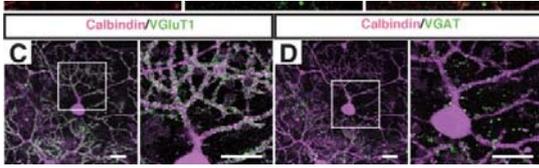


SFEB 法により誘導された神経幹細胞を、新生マウス (neonatal mice; P0) あるいは、出生終日後のマウス (postnatal mice; P6-8) から得られた小脳初代培養系と共培養し、生存能、分化能を比較した。

Postnatal mice では、neonatal mice と比

較して、良好な生存能と分化能が確認され、移植療法の際にも脳内微小環境 (niche) の違いが、治療効果に大きな影響を与える可能性が考えられた。

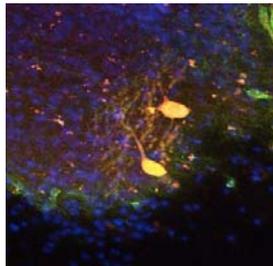
3. EDPCs のシナプス形成能の検討



免疫染色では、EDPCs の樹状突起周辺に多くのシナプス関連蛋白が検出され、形態学的にシナプスを形成していると考えられる (上図)。

パッチクランプ法による解析では、EDPC は電気生理学的に active であることが確認出来た (原著論文 1 参照)

4. 定位的に障害部位の小脳に移植した、EDPCs の生存能、分化能の検討



脊髄小脳変性症モデルマウスへ、EDPC を移植すると、生着するとともに成熟したプルキンエ細胞のマーカである IP3R1 の発現も保持されている。

5. 脳梗塞モデルへの骨髄間葉系幹細胞から分化誘導した神経細胞の移植療法の効果

脳梗塞で障害を受ける神経細胞を骨髄間葉系幹細胞から分化誘導し、虚血病変に移植したところ、虚血脳内で生存し、神経症状を改善させる効果を確認した (原著論文 2 参照)。また、虚血性末梢神経障害においても、障害後の p75 陽性 Schwann 細胞が、末梢神経の再生に強く関与していることを確認した (原著論文 4 参照)。

以上の結果から、ES 細胞から成熟した機能するプルキンエ細胞が誘導可能であり、疾患モデルへ移植後も成熟度を維持したまま生存することが可能であり、今回の治療戦略は脊髄小脳変性症症例に応用可能と考えられる。

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 6 件)

1. Tao O, Shimazaki T, Okada Y, Naka H, Kohda K, Yuzaki M, Mizusawa H, Okano H. Efficient generation of mature cerebellar Purkinje cells from mouse embryonic stem cells. *J Neurosci Res*. 2010;88:234-47. 査読有り

2. Xu H, Miki K, Ishibashi S, Inoue J, Sun L, Endo S, Sekiya I, Muneta T, Inazawa J, Dezawa M, Mizusawa H. Transplantation of neuronal cells induced from human mesenchymal stem cells improves neurological functions after stroke without cell fusion. *J Neurosci Res*. 2010;88:3598-609. 査読有り

3. Yamane J, Ishibashi S, Sakaguchi M, Kuroiwa T, Kanemura Y, Nakamura M, Miyoshi H, Sawamoto K, Toyama Y, Mizusawa H, Okano H. Transplantation of human neural stem/progenitor cells overexpressing galectin-1 improves functional recovery from focal brain ischemia in the Mongolian gerbil. *Mol Brain*. 2011;4:35. 査読有り
[first 3 authors equally contributed]

4. Kobayashi M, Ishibashi S, Tomimitu H, Yokota T, Mizusawa H. Proliferating immature Schwann cells contribute to nerve regeneration after ischemic peripheral nerve injury. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2012 May 14 [in press] 査読有り

5. 石橋哲. 脳梗塞後の炎症制御と神経再生. *臨床神経* 2010;50:882-882.

6. 石橋哲, 水澤英洋. 脳梗塞の急性期治療. *PTM 治療マニュアル*. 2011;1(6). 2pages

[学会発表] (計 7 件)

1. 田尾修, 島崎琢也, 岡田洋平, 仲勇人, 幸田和久, 柚崎通介, 岡野栄之, 水澤英洋. マウス ES 細胞由来小脳 Purkinje 細胞の *in vitro* での生存と成熟にかかわるニッチの検討. 第 51 回日本神経学会総会. 2010. 5. 21. 東京

2. 徐海雁, 三木一徳, 石橋哲, 孫 宗元, 関矢一郎, 宗田大, 出澤真理, 水澤英洋. スナネズミ虚血脳に移植したヒト骨髄間質細胞由来神経細胞の細胞癒合能力の検討. 第 51 回日本神経学会総会. 2010. 5. 22. 東京

3. 石橋哲. 脳血管障害治療の次のブレーク

スルーを目指して: Immunomodulation by inducing tolerance to E-selectin and adult neurogenesis after stroke. 第51回日本神経学会総会 (招待講演). 2010. 5. 21. 東京

4. 石橋哲, 水澤英洋, John Hallenbeck. 脳虚血後の制御性T細胞誘導による活性型ミクログリアに対する効果の検討. 第51回日本神経学会総会. 2010. 5. 22. 東京

5. 石橋哲, 小林正樹, 水澤英洋. マウス慢性脳低灌流モデルにおける軟膜動脈の血管内皮細胞分裂能の検討. 第52回日本神経学会総会. 2010. 5. 19. 名古屋

6. 小林正樹, 石橋哲, 富満弘之, 横田隆徳, 水澤英洋. ラット虚血性ニューロパチーモデルにおける脱髄性変化の検討. 第52回日本神経学会総会. 2010. 5. 19. 名古屋

7. Kobayashi M, Ishibashi S, Tomimitsu H, Yokota T, Mizusawa H. Myelinated fiber density correlaters with demyelinating injuries in vasculitic neuropathy associated with Churg-Strauss syndrome. The Second Congress of Asian Society of Neuropathology. 2011.11.6. Beijing, China

[図書] (計 件)

1. 石橋哲. 学会印象記 第19回 European Stroke Conference (ESC) 2010. Brain & Nerve. 2011; 63:86-87.

[その他]

ホームページ等

東京医科歯科大学神経内科 website

<http://www.tmd.ac.jp/med/nuro/study.html#5>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水澤英洋 (MIZUSAWA HIDEHIRO)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30144091

(2) 研究分担者

石橋 哲 (ISHIBASHI SATORU)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30533369

(3) 連携研究者

なし