

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700471

研究課題名（和文） 発生期の生理的低酸素での幹細胞から神経系への分化誘導とその分化機構の解明

研究課題名（英文） Induction of oligodendrocytes from mouse iPS cells for transplantation into white matter injury and association with physiological low oxygen.

研究代表者

三角 吉代 (Misumi Sachiyo)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70529148

研究成果の概要（和文）：幹細胞を用いた細胞療法 of 課題に取り組むために、マウス iPS 細胞を用いて、①無血清培地下での効率的なオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)の分化誘導の確立と、②腫瘍化細胞除去を行った。また、③生理的低酸素下では OPC の増殖が促進されることが明らかになり、より効率的で安全なドナー細胞の確保が可能になったと考えられる。脳室周囲白質障害モデル動物への移植により、これらの iPS 由来 OPC が脳内で生着可能であることが分かった。

研究成果の概要（英文）：To obtain appropriate donor cells for transplantation, we differentiated oligodendrocyte (OL) lineage cells from mouse iPS cells. iPS cell-derived oligodendrocyte precursor cells (OPC) were induced effectively under serum free condition by 7-step culture method. Then we removed SSEA-1 (+) cells with MACS to prevent teratoma formation, resulting in 97% reduction. Physiological low oxygen promoted OPC proliferation with no effects for cell differentiation in vitro. iPS-derived OPCs survived in immature rat brain after transplantation, suggesting these cells are suitable for donor cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：オリゴデンドロサイト、iPS 細胞、低酸素、細胞移植、無血清培養、脳室周囲白質障害

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 幹細胞を用いた細胞移植療法の課題

神経細胞移植は、傷害を受けた脳機能を再建させるための方法の一つとして期待されている。ドナー細胞として ES 細胞/iPS 細胞などの幹細胞が注目されている。幹細胞を用いた細胞移植療法では、①目的細胞への効率的な分化誘導法の確立、②腫瘍化細胞の除去

が大きな課題となっており、効率的かつ安全なドナー細胞の確保が必要とされている。

## (2) 発生時の生理的低酸素

幹細胞から効率良く目的細胞を分化させるためには正常発生を再現させることが重要である。脳の発生時、子宮内は低酸素状態にあり、神経分化には低酸素状態が強く影響している。我々は発生時の生理的低酸素下

(3.5%)でマウス ES 細胞由来の神経幹細胞を培養するとドーパミン細胞への分化が促進されること、その分化機構に低酸素誘導因子(HIF-1 $\alpha$ )が関与していることを報告した。

### (3) 低酸素と腫瘍化制御因子の関係

腫瘍化制御においては細胞周期と分化機構の関連が重要である。低酸素が細胞周期制御因子 p27kip を介し、神経系細胞の分化を制御していること(J Pathol. 214: 38-45; 2008)や、腫瘍細胞の細胞周期に關与している報告がされている(PLoS One. 4(3): e4739; 2009)。低酸素状態と細胞周期・分化機構との関連が示唆される。

### (4) 脳室周囲白質障害への細胞療法

胎生 28-32 週で出生した未熟児における脳性麻痺は、約 80%が脳室周囲白質障害によるものである。脳内で発達中のオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)が低酸素虚血により選択的に傷害されることが原因と考えられている。発達中の脳は高い再生能を有しており、適切な時期に OPC を移植することで、その後の機能再建が可能であると考え実験を行っている。

## 2. 研究の目的

発生時の生理的条件である低酸素に注目し、①in vitro で幹細胞(ES/iPS 細胞)からオリゴデンドロサイトの効率的な分化誘導法の確立、②低酸素条件下でのオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)の分裂/分化への影響と細胞内機構の解明、③細胞磁気選別法(MACS)により腫瘍化する未分化細胞の除去等、を行うことにより、効率的かつ安全なドナー細胞の誘導法を確立し、幹細胞を用いた細胞療法の課題に取り組むことを目的とする。また、脳室周囲白質障害モデルを用いた移植実験により、細胞療法の基礎的研究を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 無血清培地下での幹細胞からのオリゴデンドロサイト分化誘導

マウス iPS 細胞(第1段階)から胚葉体の形成(第2段階)、神経幹細胞の選択(第3段階)と増殖(第4段階)、グリア前駆細胞の誘導(第5段階)、オリゴデンドロサイト前駆細胞の誘導と増殖(第6段階)、成熟オリゴデンドロサイトへの分化(第7段階)の7段階分化法により分化誘導を行った(図1)。胚葉体形成(第2段階)は無血清培地下で行った。各段階での遺伝子発現、分化成熟度は、RT-PCR、免疫染色法(OPC:PDGFR- $\alpha$ 抗体、未熟オリゴデンドロサイト;04,01,CNPase抗体、成熟オリゴデンドロサイト;MBP,CC1抗体)により検討した。



### (2) 低酸素下での分化誘導

マウス iPS 細胞由来、およびラット(生後1日)脳内から単離したオリゴデンドロサイト前駆細胞を、通常酸素下(20% O<sub>2</sub>)と低酸素条件下(3.5% O<sub>2</sub>)にて培養した。その後の増殖、分化について BrdU 取り込み、DNA 量測定、免疫染色法により検討した。

### (3) 腫瘍化細胞の除去

マウス iPS 由来 OPC において、SSEA-1 抗体結合マイクロビーズを用いて、細胞磁気選別(MACS)を行い腫瘍化の危険性のある未分化細胞の除去を行った。

### (4) 電気生理学的実験

オリゴデンドロサイトは発達の段階に応じて発現するイオンチャンネルが変化することが知られている。iPS 由来オリゴデンドロサイトが生理的機能を持つことを確かめるため、未熟オリゴデンドロサイトでホールセルパッチクランプを行い内向き整流性 K 電流(I<sub>Kir</sub>)を測定した。

### (5) 脳室周囲白質傷害モデルへの移植

ラット(生後3日)の右総頸動脈を閉塞したのち、低酸素負荷により傷害モデルを作成した。2日後(生後5日)、マウス iPS 細胞由来 OPC(CSFE 標識)を脳梁部に移植した。

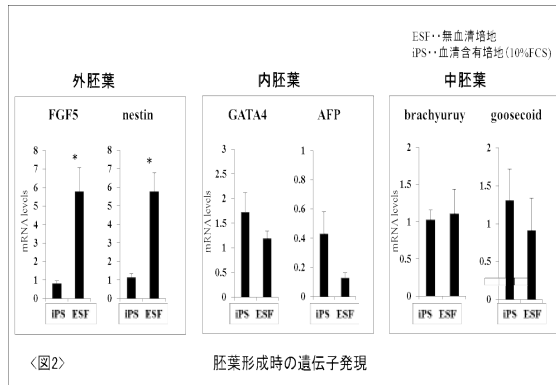
## 4. 研究成果

### (1) マウス iPS 細胞からのオリゴデンドロサイト分化効率

#### ① 無血清培地下での外胚葉分化促進

胚葉形成時(第2段階)に、無血清培地下で培養すると通常血清含有培地群と比較して外胚葉の遺伝子発現(FGF5, nestin)が増加した。一方、内胚葉マーカー(GATA4, AFP)中胚葉マーカー(brachyury, gooseoid)遺

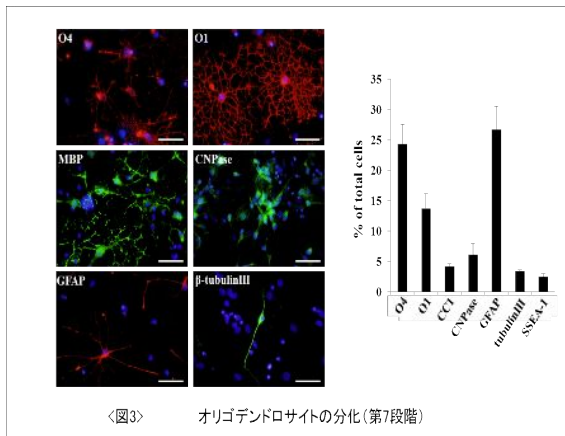
伝子の発現には変化がなかった (図2)。このことより、無血清培地では外胚葉への分化促進とその後の神経系細胞への分化促進が明らかになった。



〈図2〉 胚葉形成時の遺伝子発現

## ②オリゴデンドロサイト分化効率

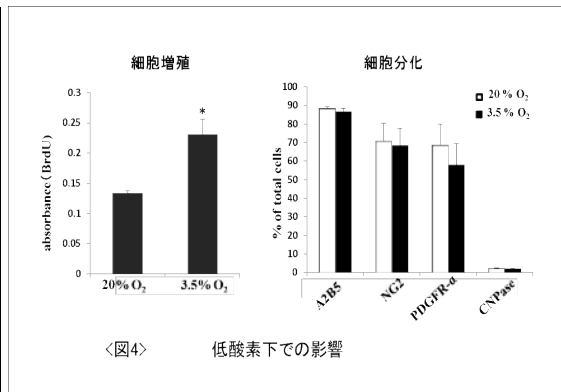
7段階法によりマウス iPS 細胞を分化させると、第5段階で 68.7%が A2B5 陽性のグリア前駆細胞であった。また、第6段階では 47.5%のオリゴデンドロサイト前駆細胞の発現が確認できた。その後、第7段階において最終分化をさせると 04 陽性の未熟オリゴデンドロサイトの割合は 24.3%であった。また、成熟オリゴデンドロサイトのマーカーである CC1, MBP の発現も確認できた (図3)。従来法よりもより効率的にオリゴデンドロサイトが誘導できた。



〈図3〉 オリゴデンドロサイトの分化 (第7段階)

## (2) 低酸素下での OPC 増殖促進

ラット脳由来初代培養 OPC を 3.5%低酸素下で 6日間培養すると、20%酸素下と比較して BrdU 取り込みが 2 倍に増加していた。免疫染色による細胞分化度には変化が見られなかった (図4)。マウス iPS 由来 OPC でも BrdU 取り込み、DNA 量の増加が確認できた。低酸素条件は OPC の分化には影響せず増殖を

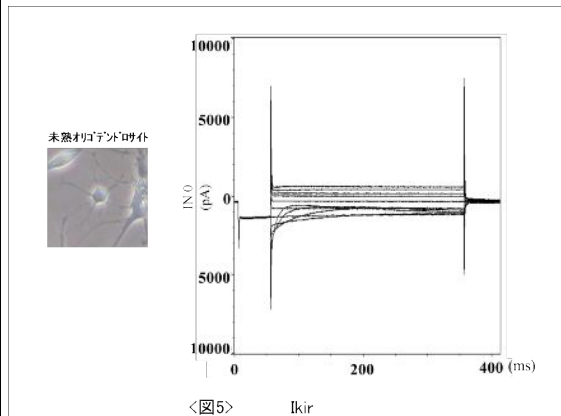


〈図4〉 低酸素下での影響

促進させることが明らかになった。

## (3) 電気生理学的性質

ホールセルパッチクランプ法により iPS 細胞由来オリゴデンドロサイトの電気生理学的性質を測定した。未熟オリゴデンドロサイトで分化段階に特徴的な内向き整流性 K チャネルの発現が認められた (図5)。iPS 由来オリゴデンドロサイトが形態的のみではなく、機能的性質をもった細胞であることが確認できた。



〈図5〉 I<sub>kir</sub>

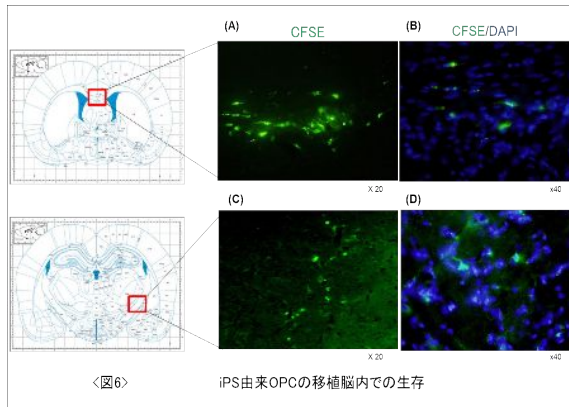
## (4) 腫瘍化細胞の除去

iPS 細胞からオリゴデンドロサイトへの分化誘導後、腫瘍化の危険性のある SSEA-1 陽性未分化細胞が 2.4%残存していることが分かった。これらの細胞を除去するため、第5段階において細胞磁気選別法により SSEA-1 陽性細胞の除去を行った。その結果、陽性細胞数が 0.1%まで減少し、腫瘍形成細胞を除去できることが明らかになった。

## (5) 脳室周囲白質障害モデルへの移植実験

マウス iPS 由来 OPC の in vitro での効果を見るために、脳室周囲白質障害モデル動物への移植を行った。生後 5日のモデルラット脳 (脳梁部) に iPS 由来 OPC を移植すると、2

週間後に白質内での生存が確認できた（図6）。また、免疫抑制剤の投与により移植細胞の生存は促進されることが分かった。より長期の生存と成熟のためには、栄養因子等の処置が必要であることが示された。



## 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 2 件）

- ① Misumi S, Nishigaki R, Ueda Y, Watanabe Y, Shimizu Y, Ishida A, Hida H  
Differentiation of oligodendrocytes from mouse induced pluripotent stem cells without serum.  
Translational Stroke Res 4(2):149-157, 2013 DOI:10.1007/s12975-012-0250-1 査読有
- ② Ishida A, Ueda Y, Ishida K, Misumi S, Masuda T, Fujita M, Hida H  
Minor neuronal damage and recovered cellular proliferation in the hippocampus after continuous unilateral forelimb restraint in normal rats. J Neurosci. Res. 89: 457-465, 2011 DOI: 10.1002/jnr.22566 査読有

〔学会発表〕（計 7 件）

- ① 三角吉代、鄭且均、飛田秀樹、障害モデルへの細胞移植に向けたマウス iPS 細胞由来オリゴデンドロサイト前駆細胞の分化誘導、第 90 回日本生理学会、平成 25 年 3 月 27 日、タワーホール船堀・東京
- ② 三角吉代、上田佳朋、飛田秀樹ら、iPS 細胞からのオリゴデンドロサイト前駆細胞誘導と未熟ラット脳への移植、北米神経科学学科、平成 24 年 10 月 15 日、ニューオリンズ・アメリカ合衆国

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三角 吉代 (Misumi Sachiyo)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：70529148