

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24615008

研究課題名(和文) 難治性てんかんモデルを使って神経幹細胞供給源としての嗅粘膜の可能性を探る

研究課題名(英文) The efficacy of olfactory mucosa as a source of neural stem cells

## 研究代表者

宮本 修 (MIYAMOTO, OSAMU)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00253287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：嗅粘膜に存在する神経幹細胞と嗅神経鞘細胞(OEC)を採取・培養して、移植細胞の供給源としての可能性を検討した。嗅粘膜上皮層の幹細胞に各種の栄養因子を加えて接着培養することで神経細胞に分化させることができた。一方、嗅粘膜固有層にはOECが多く存在しており、ここからの細胞を培養することでOECを増やすことができた。作製した神経幹細胞とOECをてんかんモデルやパーキンソンモデルラットに移植した。てんかんモデルに対してはほとんど効果が見られなかったが、パーキンソンモデルに対しては行動学的症状の改善効果が見られ、移植細胞供給源としての嗅粘膜細胞の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The efficacy of olfactory mucosa as a source of neural stem cells was investigated. Stem cells of olfactory epithelium were differentiated into neural cells by adding neurotrophic factors such as BDNF and GDNF to culture medium. On the other hand, olfactory ensheathing cells (OECs) were abundant in lamina propria and cultured until 70% confluent. We transplanted both neural stem cells and OECs into intractable epilepsy or Parkinson model rats. Behavioral abnormality were improved in Parkinson rats but not in epilepsy rats. The results suggest that olfactory mucosa is useful as a cellular reservoir for transplantation.

研究分野：神経生理

キーワード：嗅粘膜 神経幹細胞 嗅神経鞘細胞 移植 難治性てんかん パーキンソン病

## 1. 研究開始当初の背景

てんかんの有病率は人口の約 1%といわれており、頻度が高い神経疾患の一つである。このうち薬物療法に反応しない、いわゆる難治性てんかんは約 20%存在し、治療として海馬の部分切除や脳梁離断などの外科的アプローチ、あるいは迷走神経刺激法などが試みられている。しかし、脳組織の除去による機能障害や無効例の場合もあり、他の有効な治療法の開発が待たれている。一方、実験動物を用いたてんかんに対する移植治療の研究では、胎児脳細胞や多能性幹細胞(ES、iPS細胞)を使った移植の有効性がこれまで報告されている。しかしながら、これらの細胞の使用には倫理的な問題や腫瘍化の危険性などがあり、臨床応用には未だ多くの解決すべき課題が存在している。一方、成体脳の特定の部位にも神経幹細胞が存在しており、脳室周囲や海馬では活発に神経細胞の新生が起こっていることが近年明らかとなった。成体の神経幹細胞は自己の細胞を使用でき、理想的な移植細胞になり得る。また、神経幹細胞の採取が困難な脳室周囲や海馬以外に、細胞の採取が容易な嗅粘膜にも幹細胞が存在していることが分かっており、加えて、ここには細胞の生存や軸索の伸展を促進する NGF や BDNF などの神経栄養因子を分泌する嗅神経鞘細胞(OEC)が存在している。このため、脊髄損傷に対する OEC の移植についてはすでに多くの報告がなされており、ヒトへの応用も試みられている。しかしながら、脊髄損傷以外の疾患に対する嗅粘膜細胞移植の報告は未だ少なく、その有用性や効果の機序については充分には明らかになっていない。また、嗅粘膜の上皮層には幹細胞である基底細胞が存在し、固有層には間葉系幹細胞と OEC が存在しているが(図 1)、それらの特性についてはよく分かっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、神経系疾患の移植用細胞供給源としての嗅粘膜の有用性を検討するために、嗅粘膜上皮層と固有層から幹細胞と OEC をそれぞれ採取してそれらの増殖・分化能について調べ、難治性てんかんモデルであるキンド

リング動物に対する嗅粘膜細胞移植の効果について検討した。さらに、他の神経系疾患としてパーキンソンモデルへの移植効果についても検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 嗅粘膜細胞からの細胞採取と培養

8 週齢ラットをペントバルビタール麻酔し、鼻中隔についている嗅粘膜を採取した。嗅粘膜をディスペーゼ処理後に上皮層(olfactory epithelium: OE)と固有層(lamina propria: LP)に分離した。上皮層はピペティングにて分散した後培地(DMEM/F12 (1:3); PS; 10% FBS; bFGF (20ng/ml); EGF (20ng/ml))にてコラーゲンコートしたディッシュに播種した。固有層は細断した後コラゲナーゼ IA 処理後、培地(D-MEM; GlutaMAX; PS; 10% FBS)にてノンコートディッシュに播種した。その後別のノンコートディッシュに接着させることで線維芽細胞とアストロサイトを除去し、浮遊細胞をポリ-L-リジンコートしたディッシュにて接着培養した。

### (2) 細胞分化

上皮層から摂取した細胞は 2 日ごとに bFGF/EGF を注加しながら培養し、16 日後にポリ-D-リジンコートしたディッシュに継代した。翌日、血清なしの培地組成に変更し(DMEM/F12 (1:1); PS; B27; bFGF (20ng/ml); EGF (20ng/ml)) 2 日ごとに bFGF/EGF を注加しながら 7 日間培養した。ネスチン陽性細胞の存在を確認後、bFGF/EGF を除去、ニューロン培地に置換(Neural basal; B27, PS)、以下の 4 群について GABA 系あるいはドーパミン系ニューロンへの分化誘導を検討した。

Group1: without BDNF & GDNF

Group2: BDNF 20ng/ml

Group3: GDNF 20ng/ml

Group4: BDNF 20ng/ml & GDNF 20ng/ml

BDNF、GDNF とともに毎日注加しながら 9 日間培養した。固有層からの細胞は培養 24 日後に OEC への分化を検討した。

### (3) キンドリングラット作製と移植

ラット(SD系、8週齢)をペントバルビタール麻酔下に脳定位固定装置(SR-5R、ナリ

シゲ)に取り付け、左側扁桃体にバイポーラーの電極を(ブレグマから0.2 mm 後方、外側4.5 mm、深さ8.3 mm)、背側海馬に細胞移植用のガイドカニューラ(AG-4、エイコム社製、ブレグマから4.3 mm 後方、外側4.0 mm、深さ2.0 mm)を埋めて、歯科用セメントで固定した。手術1週間後より、1日2回の電気刺激によってけいれん発作を誘発した(500 $\mu$ A x 60 Hz、1sec)。けいれん発作の進行度はRacine の分類に従って判定し(ステージC1~C5)、C5をキンドリングの完成とし、少なくとも3回連続してC5を示したラットを移植実験に用いた。10 $\mu$ lのハミルトンシリンジを用いて、移植用ガイドカニューラから培養した鼻粘膜由来神経幹細胞および嗅神経鞘細胞(OEC)を注入した(合計2 x 10<sup>5</sup>個/ラット、n=3)。また、培養液のみの注入を行ったラットをコントロール群とした。移植前日より免疫抑制剤(cyclosporin: 25 $\mu$ g/kg)を経口投与し、移植2週間と1ヶ月後に同条件で電気刺激してけいれん発作のステージ分類を行った。ステージ分類終了後、4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定を行い、凍結脳切片を作製し組織観察を行った。

(4) パーキンソンモデルラット作製と移植ラット(SD系、8週齢)をペントバルビタール麻酔下に脳定位固定装置に取り付け、黒質から線条体への投射経路である内側前脳束(右側)の2箇所(それぞれブレグマより、前後-3.6 mm、外側1.8 mm、深さ9 mm、前後-4.3 mm、外側1.6 mm、深さ8.4 mm)に6-hydroxydopamine (6-OHDA、濃度2.5 $\mu$ g/ $\mu$ l in saline)を注入し破壊した(各箇所4 $\mu$ lずつ)。手術3週間後にアポモルフィン(Apo、0.5 mg/kg, sc)誘導回転数を測定し、7回/min以上のラットをパーキンソン病(PD)モデルとして以下の実験に使用した。PDラットをOEC移植群(n=1)、上皮層由来神経細胞(OE)+OEC移植群(n=3)、培養液のみ投与群(n=3)に分け、それぞれ25 $\mu$ lのハミルトンシリンジを用いて障害側線条体の2箇所(それぞれブレグマより、前後+0.5 mm、外側2.5 mm、深さ5.0 mm、前後-0.8 mm、外側3 mm、深さ4.5 mm)に細胞を移植した(合計2 x 10<sup>5</sup>個/ラッ

ト、各箇所8 $\mu$ lずつ)。移植前日より免疫抑制剤(cyclosporin: 25 $\mu$ g/kg)を経口投与した。移植4週間後にApo誘導回転数を4日間測定し、測定終了後灌流固定して脳組織を観察した。

#### 4. 研究成果

(1) 嗅粘膜上皮層と固有層に存在する幹細胞特性の比較(図1)

嗅粘膜上皮層の培養によって多くの幹細胞(基底細胞; base cell)が増殖し(図1A, E)、さらに栄養因子を加えることで神経幹細胞のマーカであるネスチン陽性細胞が出現した(図1B, F)。その後、ニューロン用培地に置換してさらに培養を続けることで若い神経細胞のマーカであるTuj-1陽性細胞を得ることができた(図1C, G)。一方、固有層には幹細胞よりも嗅粘膜神経鞘細胞(OEC)や間葉系細胞が多く存在しており、OECの採取に適することが分かった。さらに、培養条件を検討することでコンフルエントの70%までOECを増やすことができた(図1D, H)

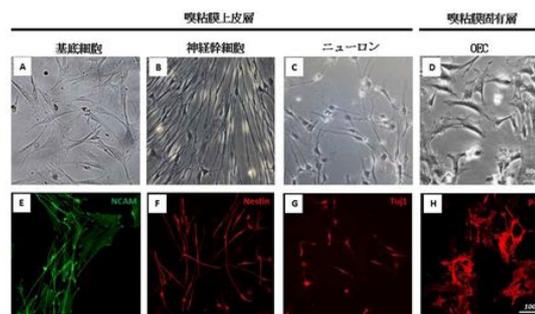


図1. 培養した嗅粘膜細胞(位相差顕微鏡像:A~D、免疫染色像:E~H)

(2) GABA系やドーパミン系ニューロンへの分化(図2)

嗅粘膜上皮層から得た神経幹細胞にGDNFを作用させることで、数は少ないがドーパミン系ニューロンのマーカであるチロシンヒドロキシラーゼ(TH)陽性細胞への分化が確認された(Group3 & 4, 図2)。

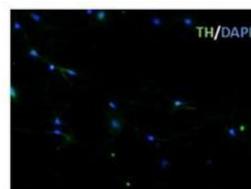


図2. ドーパミン系ニューロンへの分化  
一方、GABA系ニューロンへの分化については

BDNF を加えることで試みたが、そのマーカーであるグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD67) 陽性細胞はほとんど得られなかった (Group2 & 4)。

(3) キンドリングモデルへの移植 (図3)  
 今回は、ニューロンに分化する前の段階である神経幹細胞を移植した。鼻粘膜由来の神経幹細胞と OEC を同時に移植した群において、移植 1 ヶ月後の脳組織で、移植領域に神経幹細胞のマーカーである nestin および OEC のマーカーである p75 陽性細胞が確認され (図 3a, b 矢印)、移植細胞が脳内に定着していることが示された。しかし、幼若ニューロンのマーカーである Tuj-1 および間質系幹細胞のマーカーである Thy 陽性細胞は見られず、また、キンドリングステージの改善は認めなかった。これは移植細胞が海馬内に十分に挿入できなかったことに由来すると思われる。

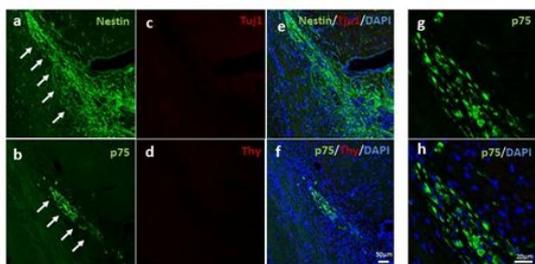


図 3. キンドリング動物における移植 4 週間後の免疫染色像

(4) パーキンソンモデルへの移植 (図 4, 5)  
 現在の段階では、鼻粘膜からドーパミン系ニューロンへの分化ができたが、十分量のニュー

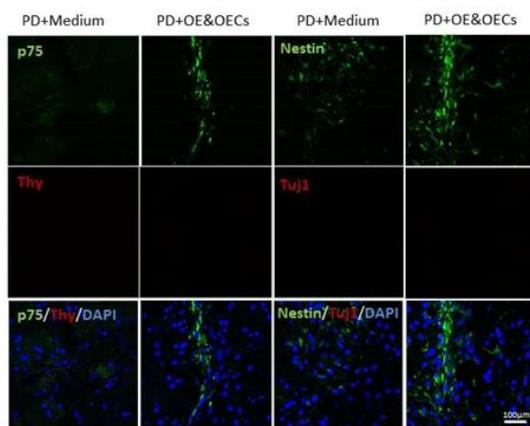


図 4. パーキンソンモデル動物における移植 4 週間後の免疫染色像

ロンを分化できないため、移植供給源としての応用には不十分である。そこで今回、ド

ーパミン系ニューロンの代わりに鼻粘膜由来の神経幹細胞を用いて移植実験を行った。結果は、キンドリングモデル同様に移植細胞が脳内に定着していることが示された (図 4)。さらにこれらの動物について、線条体におけるドーパミン系ニューロンの分布と Apo 誘導回転数を比較した (図 5)。コントロールである PD + Medium 群では左の処置側に TH 陽性線維が認められないが、細胞を移植した PD+OECs 群および PD+OE&OECs 群では TH 陽性線維の再生が一部見られた (図 5A 矢印)。また、移植群では Apo 誘導回転数の減少が見られた (図 5B)。

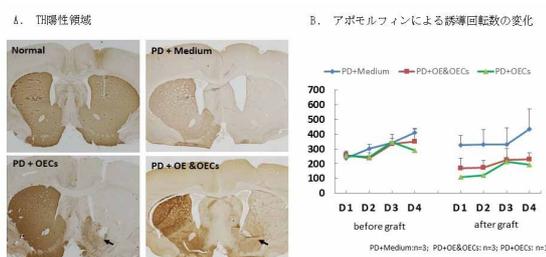


図 5. パーキンソンモデル動物に対する細胞移植による変化

## 5. 考察

嗅粘膜上皮層から神経幹細胞を作製することはできたが、培養を続けてもほとんど増殖がみられず、さらにそこからニューロンへの分化の培養条件に切り換えても十分量の GABA 系やドーパミン系のニューロンを得ることはできなかった。胎児脳細胞や ES 細胞を使った研究では継代培養による幹細胞の増殖がみられるので、胎児脳などの未熟な細胞と異なり成体組織から作製した幹細胞の増殖能は制限があるのかもしれない。この点を確認するために、今後、胎児あるいは生後 3 週齢程度の幼若ラットの嗅粘膜を用いて同様に培養し、組織採取動物の年齢による幹細胞増殖能の違いについて検討する必要がある。

また、今回は嗅粘膜細胞のニューロンへの分化が不十分である上に、分化した細胞を移植した場合に生体への生着率が著しく減少したため (data not shown)、その前の段階

である神経幹細胞の状態でキンドリングラットへの移植を行った。てんかん原性獲得では新しい神経ネットワーク（てんかん回路）が形成されることが示唆されており、てんかんに対する移植治療効果の機序として、移植細胞が海馬内のてんかん回路に対して抑制性のネットワークを形成してけいれん発作を抑制することが考えられる。今回は神経幹細胞とOECとの共移植を行うことで移植細胞の生存率上昇に成功したが、移植部が目的の海馬に到達していなかったこともあり、症状の改善は見られなかった。今後は海馬内に移植したときの効果を再検討する必要がある。

パーキンソンモデルラットへの移植もキンドリングラット同様の理由で神経幹細胞とOECとの共移植を行った。パーキンソン病では、黒質の神経細胞が変性することによって線条体において黒質由来のドーパミン放出量が減少し、このため運動機能障害に陥る。ラットモデルの場合は単一方向への回転運動が出現する。このラットモデルに対して線条体に細胞を移植することで、ドーパミン系ニューロンを補填もしくは増長することで症状の改善を図った。結果としては、OEC移植群とOE+OEC移植の両群とも移植部位にTuj-1陽性細胞が見られない、つまり移植細胞が成熟神経細胞にまで成長していないものの、線条体におけるTH陽性領域は対照群に比べて明らかに拡大していた。また、OECのみを移植した群が神経幹細胞と共移植を行った群同様に症状改善の傾向が見られたことから、OECがドーパミン系ニューロン回復の主たる役割を担っていたのかもしれない。このOECによる症状改善のメカニズムについて、グラフトからの栄養因子分泌やホストの残存ファイバーの再生などに焦点を当て今後検討する予定である。

#### <引用文献>

Semah F, Picot MC, Adam C, Broglin D, Arzimanoglou A, Bazin B, Cavalcanti D, Baulac M. *Neurology*, 51(5):1256-1262, 1998  
Ryvlin P. *Epilepsia*, 44(supp5):23-28, 2003

Shetty AK. *Neurotherapeutics*, 8(4):721-735, 2011

Eriksson PS, Perfilieva E, Björk- Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. *Nat Med*, 4(11):1313-1317, 1998

Pellitteri R, Spatuzza M, Russo A, Stanzani S. *Neurosci Lett*, 417(1): 24-29, 2007

Lima C, Pratas-Vital J, Escada P, Hasse-Ferreira A, Capucho C, Peduzzi JD. *J Spinal Cord Med*, 29(3):191-203, 2006

Lindsay SL, Riddell JS, Barnett SC. *Glia*, 58(2):125-34, 2010

Racine RJ. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 32(3):281-294, 1972

Miyazaki T, Miyamoto O, Janjua NA, Hata T, Takahashi F, Itano T. *Epilepsy Res*, 56(1):5-15, 2003

Nakagawa T, Miyazaki T, Miyamoto O, Janjua NA, Hata T, Itano T. *Epilepsy Res*, 61(1-3):141-151, 2004

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. 宮本修、難治性てんかんモデル動物に対する嗅粘膜細胞移植の効果とその機序の検討、山陽放送学術文化財団リポート、第58号、33-37、2014（査読無し）
2. Tomita M, Katsuyama H, Watanabe Y, Shibaike Y, Yoshinari H, Tee JW, Iwachidou N, Miyamoto O. c-Fos immunoreactivity of neural cells in intoxication due to high-dose methamphetamine., *Toxicology* 319;63-68, 2014（査読有り）
3. Lu F, Nakamura T, Toyoshima T, Liu Y, Shinomiya A, Hirooka K, Okabe N, Miyamoto O, Tamiya T, Keep RF, Itano T. Neuroprotection of granulocyte colony-stimulating factor during the acute phase of transient forebrain ischemia in gerbils., *Brain Res* 1548;49-55, 2014 (10.1016/j.brainres.2013.12.010.)(査読有り)
4. Okabe N, Nakamura E, Himi N, Narita K, Tsukamoto I, Maruyama T, Sakakibara N, Nakamura T, Itano T, Miyamoto O. Delayed administration of the nucleic acid analog 2Cl-C.OXT-A attenuates brain damage and enhances functional recovery after ischemic stroke., *Brain Res* 1506;115-131, 2013 (10.1016/j.brainres.2013.02.009.)

( 査読有り )

5. Himi N, Hamaguchi A, Hashimoto K, Koga T, Narita K, Miyamoto O. Calcium influx through the TRPV1 channel of endothelial cells (ECs) correlates with a stronger adhesion between monocytes and ECs., *Advances in Medical Sciences* 57;224-229, 2012  
(10.2478/v10039-012-0044-4.) ( 査読有り )

[ 学会発表 ] ( 計 7 件 )

1. 氷見直之, 高橋尚, 岡部直彦, 陸豊, 中村恵美, 城本高志, 成田和彦, 古我知成, 宮本修, 脳塞栓発症後の早期運動による海馬BDNF濃度の変化と神経細胞保護に対する役割, 第92回日本生理学会大会, 2015年03月25日, 神戸国際会議場 ( 神戸 )
2. 城本高志, 岡部直彦, 陸豊, 中村一丸山恵美, 氷見直之, 成田和彦, 木村和美, 宮本修, 脳梗塞後の神経新生と機能回復の関連について, 第37回日本神経科学大会, 2014年09月13日, パシフィコ横浜 ( 横浜 )
3. Himi N, Takahashi H, Okabe N, Koga T, Nakamura E, Feng L, Shiromoto T, Narita K, Miyamoto O. The exercise at early stage after stroke enhanced the recovery of memory function via BDNF elevation in the hippocampus in stroke model rats., *Neuroscience* 2013, 2013年11月09日, San Diego, USA
4. 氷見直之, 高橋尚, 岡部直彦, 古我知成, 中村恵美, 成田和彦, 宮本修, 脳梗塞急性期における運動による認知機能回復と海馬BDNF濃度の上昇との関係, 第36回日本神経科学大会, 2013年06月21日, 国立京都国際会館 ( 京都 )
5. 中村恵美, 岡部直彦, 氷見直之, 成田和彦, 宮本修, 脳虚血耐性におけるリアノジン受容体の関与, 第90回日本生理学会大会, 2013年03月27日, タワーホール船堀 ( 東京 )
6. 氷見直之, 高橋尚, 古我知成, 岡部直彦, 中村恵美, 成田和彦, 宮本修, 脳梗塞モデルラットにおける脳梗塞急性期の海馬BDNF濃度上昇が認知機能回復に及ぼす効果, 第90回日本生理学会大会, 2013年03月27日, タワーホール船堀 ( 東京 )
7. 氷見直之, 高橋尚, 中村恵美, 国安勝司, 岡部直彦, 成田和彦, 古我知成, 宮本修, 脳梗塞モデルラットを用いた脳梗塞急性期の運動負荷による機能回復効果の検証, 第35回日本神経科学大会, 2012年09月18日, 名古屋国際会議場 ( 名古屋 )

[ 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 ]

ホームページ等

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/physiology/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 修 ( MIYAMOTO, Osamu )  
川崎医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 00253287

(2) 研究分担者

氷見 直之 ( HIMI, Naoyuki )  
川崎医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 70412161

岡部 直彦 ( OKABE, Naohiko )  
川崎医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 30614276

成田 和彦 ( NARITA, Kazuhiko )  
川崎医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 60104808  
( 削除 : 平成 25 年 3 月 29 日 )

(3) 研究協力者

丸山 恵美 ( MARUYAMA Emi )  
Roland N AUER