

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791504

研究課題名(和文)脳性麻痺に対する神経回路再構築による抜本的再生治療

研究課題名(英文)The therapeutic potential of embryonic stem cell-derived neural progenitor cells for neonatal hypoxic-ischemic brain injury

研究代表者

篠山 瑞也 (SHINOYAMA, MIZUYA)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：70467794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脳性麻痺に対する細胞移植療法の前臨床的治療モデルを確立するべく、ES由来大脳皮質深層特異的神経前駆細胞を脳性麻痺モデルの障害された大脳皮質深層に移植し、損傷された神経回路の再構築や、運動機能の改善効果を調べた。その結果、移植細胞は脳内に生着し軸索を伸長した。運動機能も移植により回復した。ES由来神経前駆細胞の移植により、失われた神経ネットワークが再構築された可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, I evaluated the ability of embryonic stem cell-derived neural progenitor cells (ES-NPCs) to become cortical deep layer neurons, to restore the neural network, and to repair brain damage in an HIE mouse model.

Forty-hours after the induction of HIE, animals were grafted with ES-NPCs targeting the deep layer of the motor cortex in the ischemic brain. Motor function was evaluated 3 weeks after transplantation. As a result, The graft showed good survival and an appropriate innervation pattern via axonal sprouting from engrafted cells in the ischemic brain. The motor functions of the transplanted HIE mice also improved significantly compared to the sham-transplanted group. These findings suggest that cortical region specific engraftment of preconditioned cortical precursor cells could support motor functional recovery in the HIE model.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：移植・再生医療 低酸素脳虚血 再生医学 神経科学 脳性麻痺 発生・分化

### 1. 研究開始当初の背景

脳性麻痺は周産期に脳に受けた損傷がもとで発症し、運動障害がその主症状である。原因は様々であるが、その一つに胎児・新生児期低酸素脳虚血が挙げられる。近年、周産期医療は目覚ましい発展をとげ、ハイリスク児の救命率は上昇しているが、その反面結果として脳性麻痺患者は増加傾向にある。症状は永続的に後遺するため、患者の生涯は著しく制限されたものになる。しかしながら、現在行われている治療は痙縮を和らげる事を目的とした対症療法のみで、脳性麻痺に対する根本的治療法は未だ確立されていない。

近年、ES 細胞、iPS 細胞、神経・骨髄幹細胞などの幹細胞を用いた難治性神経疾患に対する細胞移植療法が注目を集めている。脳性麻痺のモデルである低酸素性脳虚血モデル動物においても、これら幹細胞を用いた報告が散見されるが、有意な機能改善を示した報告は少ない。これまでの報告では、移植細胞が脳内で生着する事は示されているが、移植・生着したニューロンが宿主神経回路を再構築可能かどうかの検討はほとんどなされていない。

一方、正常マウスに対する ES 細胞由来神経前駆細胞移植の検討では、移植細胞が脳内に生着し正常な神経回路に沿って軸索を伸長する事が報告されている。更に我々はこれまでに検討を重ね、ES 細胞から大脳皮質深層特異的錐体ニューロンの前駆細胞をより効率よく分化させる培養法を確立し、これらの細胞が正常マウスの脳内で錐体ニューロンとして生着、かつ正常ニューロンの走行に沿って白質→内包→脳幹にまで多くの軸索を伸長することも確認している。また、大脳皮質には機能的・組織学的区分がある。前後方向には機能的に運動・感覚・聴覚・視覚領域等に分かれ、背腹方向には組織学的に6層に分かれている。それぞれの皮質ニューロンからは皮質下白質へ軸索が伸長し、各神経終末で2次ニューロンとシナプスを形成することで神経ネットワークを形成している。これまで我々は予備的実験を行い、低酸素性脳虚血マウスにおいて大脳皮質深層の錐体ニューロンが特異的に障害され脱落する事を明らかにしており、脳性麻痺の病態に合致したものだと考えられる。同時に *In vitro* において ES 細胞から深層特異的錐体ニューロン (CTIP2 陽性) を効率的に分化誘導することにも成功している。

そこで我々は脳性麻痺による運動障害を根本的に改善させる事を目的に神経幹細胞を用いた治療モデルの確立を目指した。

### 2. 研究の目的

本研究では、脳性麻痺に対する細胞移植療法の前臨床的治療モデルを確立するべく、ES 由来大脳皮質深層特異的神経前駆細胞を脳性麻痺モデルの障害された大脳皮質深層に移植し、損傷された神経回路を再構築させ、

運動機能を改善させることで、長距離神経回路の再構築を明らかにし、移植による治療効果を示す。つまり、損傷脳の局所的な再生のみならず、シナプスを介して2次ニューロンにまで投射し得る神経回路の再構築を試みることで、脳性麻痺モデルマウスにおいても正常マウスと同様の軸索伸長が起こり、ホスト側のニューロンと神経回路が再構築されれば、その結果運動機能が改善する事が推察される。

### 3. 研究の方法

SDIA (Stromal cell-inducing activity) 法を用いて神経分化誘導を実施した。ES 細胞と骨髄間質細胞 (MS5) を共培養し、7日間神経前駆細胞に富んだコロニーを形成させた後、コロニーを feeder から剥がし単細胞に分離した。その後、*in vitro* assay と低酸素脳虚血マウスの作成をした。(図1)。詳細は以下に示す。

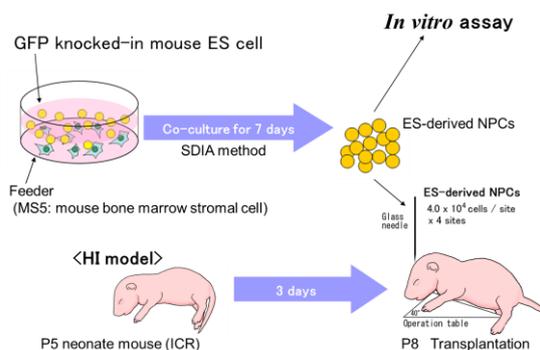


図 1

#### (1) *In vitro* assay

培養下での ES 細胞の分化が、正常マウスの発生に沿ったものである事を証明し、その上で、更に詳細な移植細胞の characterization を行った。

#### (2) 低酸素脳虚血マウスの作成

モデル作成は Levin らの方法に修正を加えたプロトコルを採用した。端的には、生後2日目の新生マウスの右総頸動脈を結紮後に切断した後低酸素環境 (8.0% O<sub>2</sub>, 30分, 37°C) に暴露することで脳虚血モデルを作成した。

#### (3) ES 由来神経前駆細胞の移植

生後5日目 (低酸素脳虚血負荷後3日目) のマウスを固定し、bregma をメルクマールに計4ヶ所、ES 由来神経前駆細胞を4万個/site ずつ注入した。また同時に培養液のみを注入した sham-control マウスも作成した。移植マーカーは ES 細胞に knocked-in された GFP である。抗 GFP 抗体を用いた DAB 染色を行い、暗視野顕鏡により軸索の末端まで明瞭に視認可能である。

#### (4) 神経ネットワーク再構築の評価

移植 3 週後に運動試験を実施した。運動機能の評価は、モデルマウスにて、正常マウスと比較し有意な運動機能の低下を認めている Rota-Rod test と Beam Walking test を用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 詳細な神経分化評価

ES 細胞に SDIA 法を用いて神経分化誘導を行った。各成熟段階の Neuronal marker, Glial marker を多くの細胞が発現することを確認した (図 2、図 3)。

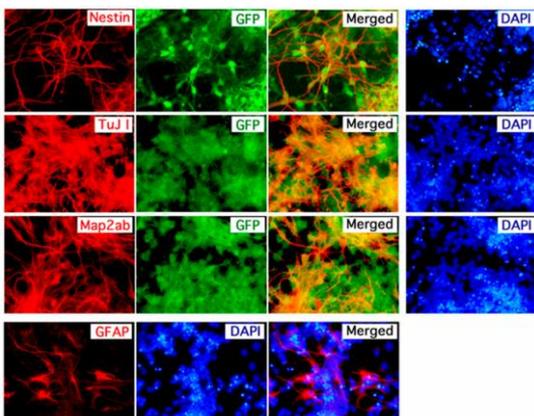


図 2 7 日間 MS5 と共培養 → 8 日間 Ornithine-fibronectin coated slide で培養

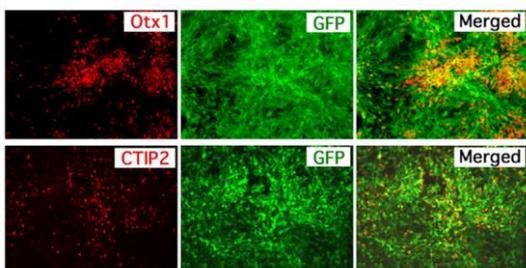


図 3 7 日間 MS5 と共培養 → 8 日間 Ornithine-fibronectin coated slide で培養

##### (2) ES 由来神経前駆細胞の定着

分化誘導を行った神経前駆細胞を大脳皮質深層に移植した。移植片の生着と同部より内包・脳梁・線条体に伸長する軸索を確認した (図 4)。

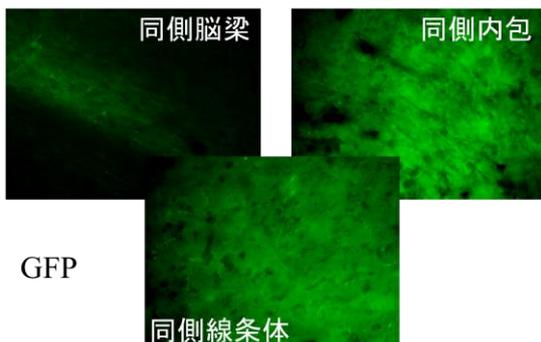


図 4 伸長する軸索

##### (3) 運動機能の促進

図 5 に Rotarod test と Beam walking test の結果を示す。Rotarod test において、Sham 群と比較して移植群は落下までの時間が延長した。Beam walking test においては、移植群における課題遂行に必要な時間が有意に短縮した。

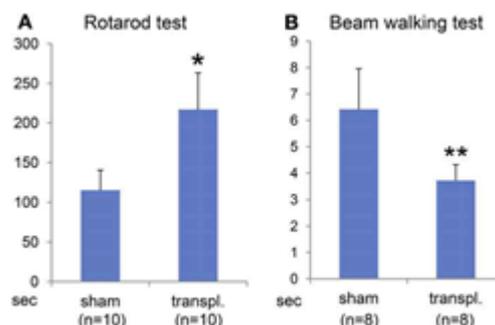


図 5

以上の結果より、ES 由来神経前駆細胞の移植により、失われた神経ネットワークが再構築されたと考えられた。

#### 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 Mizuya Shinoyama, Makoto Ideguchi, Hiroyuki Kida, Koji Kajiwara, Yoshiteru Kagawa, Yoshihiko Maeda, Sadahiro Nomura, Michiyasu Suzuki: Cortical region-specific engraftment of embryonic stem cell-derived neural progenitor cells restores axonal sprouting to a subcortical target and achieves motor functional recovery in a mouse model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2013 vol.7 128  
DOI:10.3389/fncel.2013.00128.

- ② Hiroyuki Kida, Sadahiro Nomura, Mizuya Shinoyama, Makoto Ideguchi, Yuji Owada, Michiyasu Suzuki: The Effect of Hypothermia Therapy on Cortical Laminar Disruption following Ischemic Injury in Neonatal Mice. *PLoS ONE*, 2013 Vol.8 e68877  
DOI: 10.1371/journal.pone.0068877.

[学会発表] (計 1 件)

- ① 篠山瑞也、出口誠、野村貞宏、鈴木倫保：“低酸素性虚血マウスに対する胚性幹細胞由来神経前駆細胞移植” 日本脳

神経外科学会第 71 回学術総会、2012 年  
10 月 17 日、大阪（大阪国際会議場）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

篠山 瑞也 (SHINOYAMA, MIZUYA)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：70467794