

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25505006

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞から誘導した神経細胞を用いた認知症に対する移植療法開発のための研究

研究課題名(英文) neural stem/progenitor derived from hiPS cells improved spatial memory learning of dementia model mice

研究代表者

藤原 成芳 (Fujiwara, Naruyoshi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：50365425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：認知症は神経変性に伴う記憶や判断の欠落に加え個の尊厳も欠落させる。治療をサポートする側にも多大な負担となり、既に大きな社会問題となっている。現在対症療法しかないため根治的な治療法の開発が望まれているため、私は神経細胞移植による再生医療が認知症の根治的治療法となると考え研究を進めてきた。最初にヒトiPS(hiPS)細胞から神経細胞を分化誘導し、この細胞を認知症モデルマウスに移植する系を確立した。移植の結果、認知機能の改善が見られた。さらにマウス脳サンプルの解析の結果、移植神経細胞が欠落した神経系の再構築を促進し、認知機能改善に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dementia is a memory loss disorder, which is caused by a variety of brain diseases. There is no fundamental treatment yet. Cell replacement is one of the radical treatments on regenerative medicine and hiPS cells are very useful source for inducing functional cells required for regeneration. We first developed neural stem/progenitor cells from hiPS cells. Then, I transplanted the neuronal precursors into the PDAPP mice brain. Morris water maze test was conducted 14 days before and 45 days after the transplantation to assess the spatial memory and learning of PDAPP mice. After the transplantation, mean platform escape latency of the transplanted PDAPP mice was shorter compared with that of vehicle injected PDAPP mice. The grafted cells differentiated into both cholinergic neurons and GABAergic neurons in the cortex and hippocampus. The restoration of both cholinergic neurons and GABAergic neurons may be importantly associated with the improvement of cognitive dysfunction.

研究分野：再生医療

キーワード：認知症 再生医療 神経分化誘導 神経細胞移植

1. 研究開始当初の背景

認知症患者数は2025年には470万人を越えると推計されているが(2013年厚生労働省)、神経変性疾患であるため根治的な治療法は無く、早急な根治的な治療法の開発が強く望まれている。

近年、幹細胞を用いた再生医療が注目されている。さらにYamanakaらにより報告されたヒトiPS

(hiPS)細胞の樹立は「ヒトに適用可能な再生医療」の実現を強く期待させる研究成果であった。さらに、ここ数年来の研究は成人脳における神経幹細胞の存在を明らかにしてきた。これは「中枢神経系に対する再生医療」実現の可能性を示唆する研究成果であると考えられる。

これらの知見を踏まえ、私は認知症で欠落した神経を再生し、認知症の根本的な治療法の開発を目指すこととした。

2. 研究の目的

認知症は脳神経の変性、壊死等によって起こり、正常な知能が後天的に低下した症状を示す。生きながらにして「個」を失い、また治療をサポートする側に一方的に負担がかかるため、介護の面からも既に年大きな社会問題となっている。認知症の改善のためには失われた神経を補填し機能的に再生させることが必要であるが、そのためには「適切に神経(前駆)細胞分化を誘導し的確な部位に移植する」ことが必要となる。

本科学研究費補助金内における研究で、我々はhiPS細胞からの神経(前駆)細胞の分化誘導と誘導神経細胞の移植による認知症改善の可能性について検討する事を研究目的とした。

3. 研究の方法

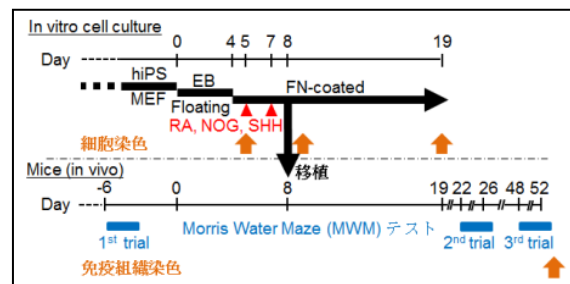
(1) hiPS細胞の培養

実験で使用するhiPS細胞はRIKEN Cell Bankから既に購入している(cell name: 253G1, cell number: HPS0002)。培養方法はRIKEN Cell Bankの方法に従い、フィーダー細胞としてマウス繊維芽細胞(MEF)を用いる。

(2) 神経(前駆)細胞の分化誘導

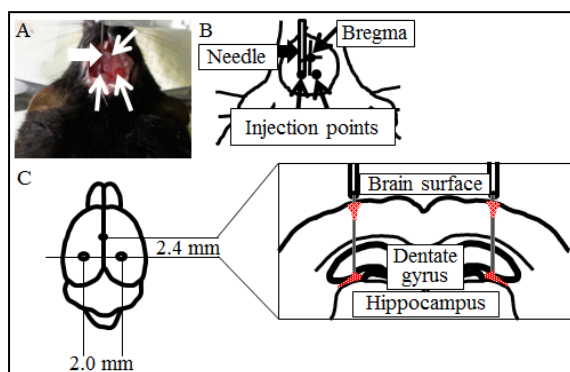
hiPS細胞を培養皿から解離後、浮遊培養を4日間行い胚様細胞塊(embryoid body: EB)を作製する。次にEBをフィブロネクチンコート培養皿に播種する。24時間後培地を分化培地に交換し、同時にレチノイン酸(RA)、ソニックヘッジホック(SHH)、ノジン(NOG)を加える(1次刺激)。48時間培養後、再度RA、SHH、NOGを加える(2次刺激)。RAは様々な生理活性を持つが、低濃度のRAは神経分化に重要である。SHHは胎生期の神

経分化に重要であり、主に前脳型の神経の誘導に重要である。またNOGは骨形成因子(BMP)を抑制し未分化外胚葉細胞から中枢神経細胞を誘導する。刺激後day5の細胞を移植に用いる。



(3) 認知症モデルマウスへの移植

hiPS細胞由来神経(前駆)細胞を認知症モデルマウスPDAPPの海馬hilus部に移植する。麻酔導入後、ステレオタキシスでマウスを固定し正確な位置に移植を行う。移植前日よりcyclosporine(3-8mg/kg)の投与を行い、拒絶反応を抑制した。頭毛を除去した後、正中線上を1.5cm程度切開する。頭蓋骨表面を露出させた後、プレグマから小脳側に-2.4mm、正中線から外側±2.0mmの場所をドリルで骨を削る。誘導神経細胞をハミルトンシリンジに吸引した後(2 x 10⁵ cells/2µl)、削った部位に垂直にハミルトンシリンジをセットし脳表から2.0mmの深さまでゆっくり挿入する。1.2mmゆっくり引き上げ、慎重に細胞を注入する。5分静置した後、反対側にも同様に細胞を注入する。



(4) モリス水迷路による認知(空間記憶)能改善効果の検討

モデルマウスへの移植は10週齢で行う。移植前(1st trial)と移植後2週間(2nd trial)及び6週間(3rd trial)でモリスの水迷路(MWM)テストを行い、移植の効果、認知機能の改善について検討する。MWMは1984年リチャード・モリスによって開発されたげっ歯類の空間記憶(学習)能力を評価する方法であり、得られたデータは海馬の機能を反映していると考えられている。現在、世界的で標準的に用いられている。2000年には認知症モデルマウス

用改良した方法を発表されており (Chen et al., 2000)、我々もこの方法を参考に作製したプロトコールにて評価を行って来た。

(5) 脳凍結切片作成及び免疫染色による移植細胞の分化状態と神経回路形成についての検討

最終の MWM テストが終了したマウスは 4% パラホルムアルデヒド (PFA) で還流固定し、脳を摘出した後凍結サンプルとする。これを 30mm に薄切し (Leica CM 1850; Leica Biosystems, Nussloch, Germany)、脳切片サンプルとして染色に用いる。免疫染色の前に HE 染色を行い組織学的な検討を行う (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)。研究で使用する抗体は、Mouse anti- β III-tubulin (Promega, Madison, WI), rabbit anti-microtubule association protein2 (MAP2, CST, Danvers, MA), rabbit anti-ChAT (Millipore, Billerica, MA), rabbit anti-VGAT (Millipore), rabbit anti- α 7nAChR (Abcam, Cambridge MA), rabbit anti-GABAA receptor α 1 (GABAR, Abcam)。

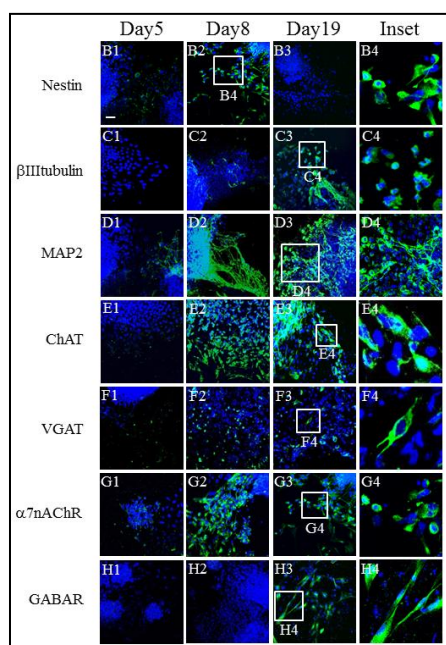
ホストの細胞と移植細胞を区別するために抗ヒト核タンパク質抗体 (mouse anti-human nuclei (hNuc, Millipore) antibodies.) を用いる。

4. 研究成果

(1) *In vitro* における神経分化誘導

分化誘導刺激後 day8 と day19 で免疫細胞染色を行った。コントロールとして day5 (分化誘導刺激前) の細胞を用いた。その結果、その結果 Nestin は 8 日目に強い発現が見られた後 (93.6 \pm 1.0%)、day19 では劇的に減少していた (8.1 \pm 0.7%)。 β III tubulin は day19 では 86.7 \pm 4.6% であった。

また MAP2 は day19 では 48.3 \pm 3.8% であった。ChAT は day8 です でに発現が見られ、19 日目には約 82.9 \pm 4.4 % の細胞で発現が見られた。さらに α 7nAChR



は day19 で 86.4 \pm 3.7% の細胞で発現していた。(mean \pm SEM of three independent experiments)

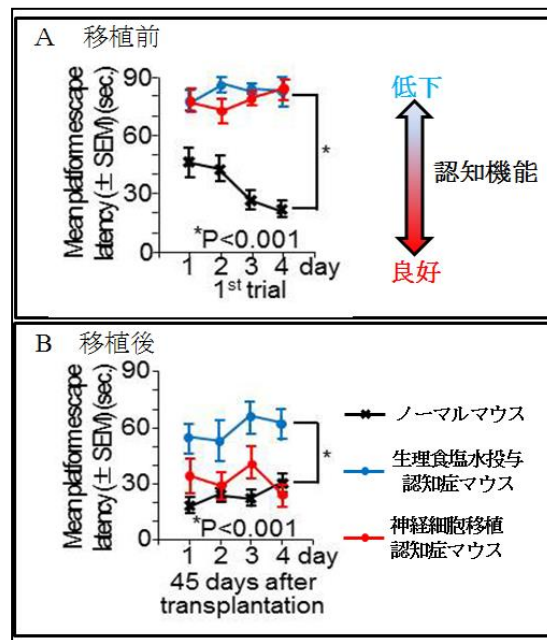
(2) 認知症モデルマウスへの神経細胞移植

誘導神経 (前駆) 細胞 (day8) を PBS に懸濁し、PDAPP マウスの両側海馬に移植した。移植後 41.4 \pm 4.5 (n=21) 日後、脳サンプルより凍結切片を作成し HE 染色を行った。さらに抗ヒト核タンパク抗体 (hNuc) を用いて免疫組織染色を行った。

その結果、移植部位を中心に移植 (神経) 細胞の生着を確認した。

(3) 移植後の認知 (空間記憶) 能改善効果の検討

MWM テストを行い、移植による空間記憶能の改善効果について検討を行った。PDAPP マウスには 10 週齢で既に non-Tg マウスと比べ空間記憶能が低下しているマウスが存在しており、このマウス群を空間記憶能低下マウスとして用いている。移植前は移植 PDAPP マウス群、sham-PDAPP マウス群ともにプラットフォーム到達時間はほぼ同じであったが、移植後、移植 PDAPP マウス群は sham-PDAPP マウス群と比較してプラットフォーム到達時間の有意な短縮が認められ、空間記憶能が改善している可能性を示唆した。(MANOVA *: P<0.05)



(4) 免疫組織染色による移植効果の検討

移植後、移植細胞由来の ChAT 陽性細胞は特に大脳皮質で分化していた (13.1 \pm 4.9%)。またホストの ChAT 陽性細胞の分化誘導も促進されており、大脳皮質で 14.0 \pm 2.3% であった。 α 7nAChR 陽性細胞は大脳皮質で 13.6 \pm 2.9%、海馬で 2.6 \pm 0.6% とともに増加していた。またホストでの α 7nAChR 陽性細胞の増加は顕著で大脳皮質で

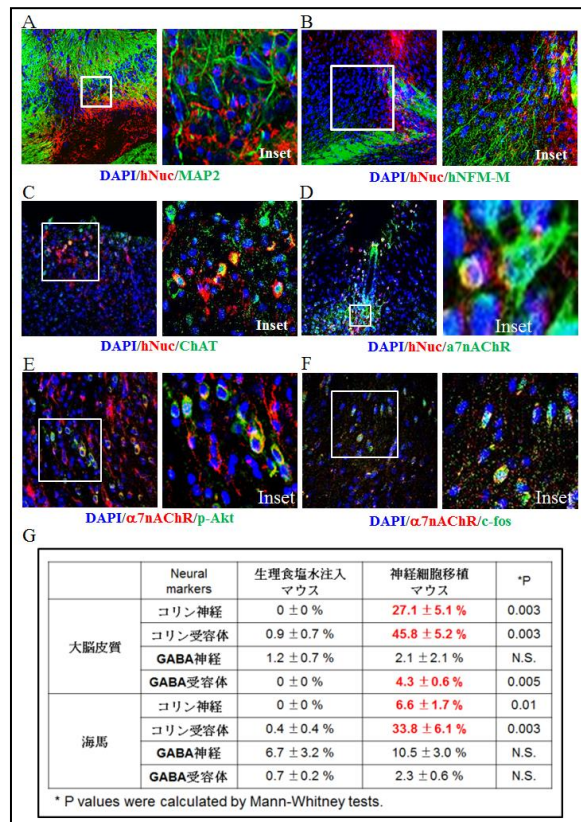
32.9±4.2%、海馬では 31.2±5.5%であった。

さらに移植により移植細胞由来の VGAT 陽性細胞は海馬で分化していた (3.7±1.1%)。

GABA_AR 陽性細胞は大脳皮質で 2.0±0.2 であった。またホストでの GABA_AR 陽性細胞は大脳皮質で 2.3±0.9%、海馬では 2.0±0.7%であった。

移植により α7nAChR 陽性細胞及び GABA_AR 陽性細胞の発現亢進が見られたが、それぞれの陽性細胞の Akt のリン酸化(p-Akt)を調べたところ、大脳皮質及び海馬の α7nAChR 陽性細胞及と GABA_AR 陽性細胞でリン酸化されており、これらの受容体から機能的なシグナルが伝達されていることが示唆された。

移植により α7nAChR 陽性細胞及び GABA_AR 陽性細胞の発現亢進が見られたが、陽性細胞における c-fos の発現を調べたところ、大脳皮質及び海馬の α7nAChR 陽性細胞及と GABA_AR 陽性細胞で c-fos の発現が亢進しており、これらの受容体発現細胞を介して神経伝達が機能的に行われていることが示唆された。※c-fos は神経伝達時に発現が亢進する神経伝達初期マーカーとして使われている。



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 10 件)

- ① Fujiwara N, Shimizu J, Takai K, Arimitsu N, Ueda

Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Cellular and molecular mechanisms of the restoration of human APP transgenic mouse cognitive dysfunction after transplant of human iPS cell-derived neural cells. *Exp Neurol*. 2015; 271:423-31. doi:

10.1016/j.expneurol.2015.07.008. 査読有

- ② Shiratsuchi T, Misawa H, Saito A, Shimizu J, Iinuma M, Fujiwara N, Takai K, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Beppu M, Suzuki N. Sonic hedgehog supplementation rapidly induces myogenesis in human induced pluripotent stem cells. *St. Marianna Medical J* 2015 6: 123-131 査読有

- ③ Suzuki N, Shimizu J, Hirotsu C, Takada E, Arimitsu N, Ueda Y, Fujiwara N, Suzuki T, Takai K. Generation of Retinal Progenitor Cell Sheets which Differentiate into Rhodopsin Positive Photoreceptors from Mouse iPS Cell Derived Retinal Progenitor Cell Clones. *International Journal of Ophthalmology and Clinical Research* 2015; 2:1 査読有

- ④ Shimizu J, Takai K, Takada E, Fujiwara N, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Possible association of proinflammatory cytokines including IL1β and TNFα with enhanced Th17 cell differentiation in patients with Behcet's disease. *Clin Rheumatol*. 2015; DOI 10.1007/s10067-015-2966-2 2015.5. 査読有

- ⑤ Iinuma M, Umehara T, Arimitsu N, Shimizu J, Misawa H, Takai K, Fujiwara N, Fujii A, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Hirotsu C, Beppu M, Suzuki N. Induction of neural cells with spinal motoneuron phenotype from human iPS cells and the transplantation to totally transected spinal cords in mice. *Inflammation and Regeneration* 2015; 35(3):154-163. 査読有

- ⑥ Misawa H, Saito A, Shimizu J, Iinuma M, Shiratsuchi T, Fujiwara N, Takai K, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Beppu M, Suzuki N. Pax7 Gene Induction Rapidly Regulates Myocyte Homeostasis in Human Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells. *St. Marianna Medical Journal*. 2014; 5:59-67. 査読有

- ⑦ Fujiwara N, Shimizu J, Takai K, Arimitsu N, Saito A, Kono T, Umehara T, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Restoration of spatial memory dysfunction of human APP transgenic mice by transplantation of neuronal precursors derived from human iPS cells. *Neurosci Lett*. 2013; pii: S0304-3940(13)00947-6. doi: 10.1016/j.neulet.2013.10.043. 査読有
- ⑧ Kono T, Arimitsu N, Shimizu J, Takai K, Fujiwara N, Umehara T, Saito A, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Hashimoto T, Tanaka Y, Suzuki N. Human iPS Cell Derived Neurons with Cortical Motor Neuron Phenotype Are Relevant for Functional Recovery of Hemiplegic Mice with Injured Motor Cortex. *St.Marianna Medical Journal* 2013; 4(2): 31-40. 査読有
- ⑨ Umehara T, Arimitsu N, Iinuma M, Shimizu J, Takai K, Fujiwara N, Saito A, Kono T, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Beppu M, Suzuki N. Transplantation of Motor Neurons Derived from Human iPS Cells into Total Transection Model of Spinal Cord Injury in Mice. *St.Marianna Medical Journal* 2013; 4(2): 21-30. 査読有
- ⑩ Saito A, Shimizu J, Fujiwara N, Takai K, Arimitsu N, Umehara T, Kono T, Misawa H, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Moroe Beppu, Suzuki N. IGFII/Akt Signaling Regulates Myocyte Homeostasis in Human Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells. *St.Marianna Medical Journal* 2013; 4(2): 41-48. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 藤原成芳、鈴木千佳、高井憲治、廣津千恵子、有光なぎさ、高田えりか、清水潤、鈴木登、ヒトiPS由来神経細胞移植による認知機能改善と改善メカニズムについての検討 日本再生医療学会、大阪国際会議場 (大阪府大阪市) 2016年3月17日～19日
- ② Fujiwara N, Takai K, Takada E, et al. Human iPS derived neural stem/precursor improved spatial memory learning of dementia model mice. *International Society for stem cell research, STOCKHOLM, SWEDEN*, 2015, 6, 24-27
- ③ 藤原成芳、高井憲治、鈴木千佳、廣津千恵子、高田えりか、有光なぎさ、白土崇輝、清水潤、

鈴木登、ヒトiPS由来神経細胞移植による空間記憶能の改善と改善メカニズムについての検討 日本再生医療学会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2015年3月19日～21日

- ④ Fujiwara N, Takai K, Takada E, et al. Restoration of spatial memory dysfunction of human APP transgenic mice by transplantation of neuronal precursors derived from human iPS cells. 12th International Society for stem cell research, VANCOUVER, CANADA, 2014, 6, 18-21
- ⑤ 藤原成芳、高井憲司、高田えりか、廣津千恵子、飯沼雅央、三沢寛子、有光なぎさ、清水潤、鈴木登、ヒトiPS細胞から誘導した神経細胞移植による空間記憶能の改善と改善メカニズムの検討 日本再生医療学会、京都国際会館 (京都府京都市) 2014年3月4日～6日
- ⑥ Fujiwara N, Takai K, Takada E, et al. Differentiation of cholinergic neurons from hiPS cells and restoration of cognitive function by their transplantation in mice with dementia. 11th International Society for stem cell research, BOSTON, MA USA, 2013, 6, 12-15

[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
無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 成芳 (Fujiwara, Naruyoshi)
聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
研究者番号：50365425

(2) 研究分担者

高井 憲治 (Takai, Kenji)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号：60121167