

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870460

研究課題名(和文)新規誘導法で樹立された神経幹細胞は脳梗塞を治療しうるか？

研究課題名(英文)Therapeutic effect of cell transplantation with novel induced neural stem cells in stroke animal model

研究代表者

山下 徹(Yamashita, Toru)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：60644408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経幹細胞特異的な4つの転写因子群をマウス皮膚線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて強制発現させることで、iNS細胞株を誘導した。得られたiNS細胞株はニューロンとグリア細胞にそれぞれ分化できることも確認した。また脳梗塞マウスモデルの検討ではiNS細胞移植群ではvehicle群と比較して、明らかな生存率の改善と運動機能改善効果を認めた。以上の実験結果から新規iNS細胞株は脳梗塞急性期において治療効果があることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：iNSC transplantation successfully improved the survival rate of stroke model mice with significant functional recovery from the stroke, suggesting that the directly converted iNSCs may represent a promising and safe cell resource for transplantation therapy in patients suffering from ischemic stroke.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳梗塞 細胞移植 iN細胞 iPS細胞 ダイレクトリプログラミング

1. 研究開始当初の背景

2006年8月に京都大学山中伸弥教授らによってマウス皮膚線維芽細胞に4つの転写因子(Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc)を強制発現させることでiPS細胞が誘導できることが発表された。iPS細胞はほぼすべての組織に分化する‘分化万能性’と無限に増殖できる‘自己複製能’を併せ持つ多能性幹細胞であり、この技術を使うことで患者自身の皮膚細胞から神経系細胞を含む多様な細胞種を誘導でき、脳梗塞やパーキンソン病等で失われた神経細胞を補充する神経細胞移植治療への応用も期待されている。しかしながらiPS細胞から神経系細胞に分化誘導し移植治療に用いる場合、少しでも未分化なiPS細胞が残存していると腫瘍形成の可能性があり、臨床応用への大きな障壁であった。この腫瘍化の問題を解決する一つの有力な方法として現在注目されているのが、iPS細胞を経ずに皮膚細胞から神経系細胞を誘導するダイレクトリプログラミング法と呼ばれる手法である。本研究では、細胞移植治療への展開を踏まえ、増殖能を持ちながら腫瘍形成のリスクの低いとされる神経幹細胞(以下iNS細胞)を誘導、樹立し、その治療効果と安全性を評価することを目的としている。

2. 研究の目的

本研究はマウス皮膚線維芽細胞より神経幹細胞を直接的に誘導し、脳梗塞などを含む神経疾患への治療応用へ展開するための基礎的研究基盤を確立することが目的である。計画している具体的な研究項目は、

皮膚線維芽細胞株からダイレクトリプログラミング法により神経幹細胞株を樹立

神経幹細胞株を脳梗塞マウスモデルに移植することでその治療効果と腫瘍形成能を評価の2つである。

3. 研究の方法

iNS細胞株の樹立とその多分化能を確認。

我々は、今回韓国建國大学のDong Wook Han博士との共同研究により神経幹細胞特異的な4つの転写因子(ここではFactor Xsとする)をマウス皮膚線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて強制発現させ、まずiNS細胞株の樹立樹立を行った。また至適条件下でニューロンとグリアに分化誘導し、免疫染色で評価した(多分化能の確認)。

iNS細胞株を脳梗塞マウスモデルに移植することでその治療効果と腫瘍形成能を評価。

8-9週齢オスのC57B6マウスに30分間一過性中大脳動脈閉塞術を行い、その24時間後にiNS細胞株を脳梗塞周辺領域に細胞移植を行った。(iPS細胞株はレンチウイルスでGFP標識されたものを用いた。)コントロール群として、中大脳閉塞術を行っていないマウスにも同様の細胞移植を行った。その後、ローターロッド、コーナーテスト等運動機能評価を経時的に行い、28日後と8ヵ月後に還流固定後、免疫組織学的解析を行った。HE染色とNissle染色で梗塞巣体積と腫瘍の有無を評価し、各種細胞マーカーで移植されたGFP陽性細胞がどのような種類の細胞に分化、生着しているかを詳細に評価した。

4. 研究成果

神経幹細胞特異的な4つの転写因子群をマウス皮膚線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて強制発現させ、培養開始4週間後、皮膚線維芽細胞の形態はクラスター状に変化し、EGF,FGF存在化で継代することで、iNS細胞株を誘導した。得られたiNS細胞株はNestin, Sox2, Olig2などの神経幹細胞マーカーが陽性であることが

確認された。またニューロンとグリア細胞にそれぞれ分化させた場合、ニューロンのマーカーである MAP2, Tuj1、アストロサイトのマーカーである GFAP, オリゴデンドロサイトのマーカーである GalC がそれぞれ陽性であることも確認でき、得られた iNS 細胞株が多分化能を持つことも確認できた。

また脳梗塞マウスモデルの検討では iNSC 細胞移植群では vehicle 群と比較して、明らかな生存率の改善と運動機能改善効果を認めた。移植後 28 日後、8 ヶ月後の検討の結果、移植された細胞は大部分がアストロサイト等のグリア細胞に分化していることが明らかになった。また移植後 8 ヶ月までの間で、その細胞移植群から腫瘍形成は認めないことを確認できた。

以上の実験結果から新規 iNS 細胞株は脳梗塞急性期において治療効果があり、かつ安全性が高いことが明らかになった。今後臨床応用に向けて、更なる研究開発を行っていく必要がある。

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 3 件)

1) Yamashita T, Abe K

Direct reprogrammed neuronal cells as a novel resource for cell transplantation therapy (査読有). *Cell Transplant* 2014; 23:435-439.

2) Yamashita T, Zhai Y, Kurata T, Hishikawa, N, Morimoto N, Ohta Y, Deguchi K, Abe K
Strong Improvement of Apolipoprotein E/Low-density Lipoprotein Receptor Signals by Telmisartan in Post-stroke Spontaneously Hypertensive Stroke Resistant (査読有).

J Stroke Cerebrovasc Dis 2014; 23:2240-2249.

3) Tian F, Yamashita T, Deguchi K, Omote Y,

Kawai H, Ohta Y, Abe K

In vivo optical imaging correlates with improvement of cerebral ischemia treated by intravenous bone marrow stromal cells (BMSCs) and edaravone (査読有).

Neurol Res. 35 (2013) 1051-1058

〔学会発表〕(計 7 件)

1) 2015. 4. 10-12

The 8th Pan Pacific Symposium on Stem Cell and Cancer Research (Hsinchu, Taiwan)

Yamashita T, Matsuzono K, and Abe K.

Direct Reprogrammed Neuronal Cells as a Novel Resource for Cell Transplantation Therapy

2) 2014.5.21-24

第 55 回日本神経学会学術大会 (博多)
Super Expert Session 2

山下徹, 阿部康二

骨髄間葉系幹細胞と iN 細胞を用いた再生医療の開発

3) 2014. 4. 12-14

The 7th Pan Pacific Symposium on Stem Cell and Cancer Research (Taichung, Taiwan)

Yamashita T, Tian FF, Deguchi K, Omote Y, and Abe K.

In vivo optical imaging in post-stroke murine model treated by intravenous bone marrow stromal cells or free radical scavengers

4) 2014. 4. 3-5

2nd Asian Clinical Conference (Kyoto, Japan)

Yamashita T, Abeliovich A, and Abe K

iN cell models of Alzheimer's disease

5) 2013.11.1-2

第 25 回日本脳循環代謝学会総会 (札幌)

山下徹, 阿部康二

iN 細胞を用いた新規脳梗塞治療法開発へ

の展望

2013. 5. 20-23

BRAIN 2013 (Shanghai, China)

6) Yamashita T, Abeliovich A, and Abe K

Direct reprogramming from human fibroblasts to hiN cells; A novel method preparing cell resource for stroke therapy

7) 2013. 4. 13-15

The 6th Pan Pacific Symposium on Stem Cell and Cancer Research (Hsinchu, Taiwan)

Yamashita T, Abeliovich A, and Abe K

iN cell models of Alzheimer`s disease.

〔図書〕(計 1 件)

1) 山下徹、阿部康二

iPS 細胞・iN 細胞による脳梗塞治療

日本臨床増刊号 最新臨床脳卒中学(下)

(2014) 691-696 日本臨床社

〔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

山下徹 (Toru Yamashita)

岡山大学大学院医歯薬総合研究科

脳神経内科学 講師

研究者番号: 60644408