

令和元年6月8日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10744

研究課題名(和文) iPS細胞由来神経細胞移植後の運動皮質再構築の分子メカニズムの解析と治療応用

研究課題名(英文) Transplantation of iPS cell derived motoneuron precursors to damaged motor cortex

研究代表者

上田 裕司 (Ueda, Yuji)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：00223470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は片麻痺マウスに対してヒトiPS細胞由来神経細胞移植を行い運動機能が改善する事を報告した。Reelinは神経細胞の移動と運動皮質の層構造形成の制御を補助する巨大蛋白質である。我々の神経移植において移植細胞はReelinを産生し神経組織修復をもたらした。同時に移植細胞はReelinの受容体を発現しており、その下流に位置するDisabled1のリン酸化を引き起こした。その後神経細胞は接着因子インテグリンとNカドヘリンの発現し、損傷部皮質で神経ネットワークを再構築した。これらの成績は片麻痺モデル動物への神経細胞移植ではReelinがその組織学的な修復と機能回復に重要に関わることが示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳卒中では多くの患者さんがその後遺症と戦っている。我々が研究を進めているリーリンは神経細胞の移動と運動皮質の層構造形成の制御を補助する巨大蛋白質として同定され、現在では神経の機能発現に重要に関わることが知られている。統合失調症、自閉症をはじめとした種々の中枢神経系の関わる疾患で異常を示す。我々の実施した片麻痺モデルマウスに神経細胞移植を行う実験系においても、炎症細胞と移植細胞はリーリンを産生していた。この産生されたリーリンはオートクリンとパラクリンの両者のメカニズムで神経組織修復をもたらした。今後、神経細胞移植と共にリーリンを投与することが、神経機能の修復をもたらす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that human iPS cell-derived neurons transplanted to hemiplegic mice improved their motor function. Reelin is a giant protein that helps control nerve cell migration and formation of motor cortex layer structures. In our transplantation, the transplanted cells produced Reelin and resulted in nerve tissue repair. At the same time, the transplanted cells expressed Reelin's receptor and caused phosphorylation of Disabled1 located downstream thereof. Subsequently, neurons expressed adhesion molecules integrin and N cadherin, and reconstructed neural networks in the injured cortex. These results indicate that Reelin plays an important role in histologic repair and functional recovery in neural cell transplantation into hemiplegic animal models.

研究分野：再生医学

キーワード：皮質運動神経 Reelin 片麻痺 神経細胞移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳血管障害の患者数は現在 150 万人と言われ毎年 25 万人以上が新たに発症する。認知症患者数は試算を 2 年以上も超える早さで増加し本年度には 300 万人を超えた (厚生労働省推計)。介護が必要な疾患の一位は脳血管疾患 (21.5%) であり、二位は認知症 (15.3%) である (厚生労働省平成 22 年度国民生活基礎調査報告)。ヒト iPS 細胞によってこれらの問題を検討可能な *in vitro* モデルを構築し、将来的には神経組織を構築後にその移植を行う研究は説得力を持つ。我々は既にマウス胚性幹(ES)細胞、iPS 細胞、サル ES 細胞、ヒト iPS 細胞から各種の神経細胞を分化誘導する手技を確立してこれらを移植し、片麻痺マウスや脊髄損傷マウスの運動機能、さらには認知症モデルマウスの空間認識能を改善できることを報告した (Fujiwara N et al. *Neurosci Lett* 2013. Umehara T et al. *St. Marianna Medical J* 2013. Hazama Y et al *Inflamm Regen* 2010. Fujii A et al *St. Marianna Medical J* 2009. Hamada M et al *Neurobiol Dis* 2006. Ikeda R et al *Neurobiol Dis* 2005. Chiba S et al *Exp Brain Res* 2005. Ikeda R et al *Exp Neurol* 2004. Chiba S et al *J Neurol Sci* 2004. Hamada M et al *Inflamm Regen* 2004)。これら神経細胞移植にはいくつかの限界がある。(1)移植後生存細胞が少ないこと(数ヶ月後には 1%以下)(2)移植細胞の神経分化の均一化が困難であること等を発見した。一方、神経分化が高度で均一なほど機能回復は良い (Chiba S et al *J Neurol Sci* 2004)事も示した。

### 2. 研究の目的

Reelin は辺縁帯にある Cajal-Retzius 細胞から分泌される巨大な糖蛋白であり、脳の層構造形成に必須である。reelin 遺伝子に変異を持つ reeler マウスや、apoER2/VLDLR ダブル K.O. マウス、ヨタリマウスはほぼ同一の表現型を示す事、Reelin 刺激により Disabled-1 がリン酸化されること、Disabled-1 のチロシンリン酸化が行えない変異マウスは Reeler マウスと同様な表現型を示す事等が知られている。

我々はヒト iPS 細胞由来神経細胞移植においては、この Reelin の発現がその再生過程で重要に関わることを観察している。一方、Distal-less homeobox1 は前脳発生に重要に関わる homeobox 転写因子の一つで、前脳発生において接線状走化因子として働く可能性が指摘されている。そこで、神経シート移植時に皮質運動野の高次構造を再生させるために Reelin 等神経幹細胞走化関連蛋白がどのように組織再生に関わっているのかを明らかにする。

さらに正常な成体マウスの脳室に Reelin を単回投与するだけで海馬のスパイン数が増え、長期増強(LTP) が上昇し記憶行動の成績が上昇すると報告されている。運動神経とその神経サーキットに対しても Reelin の脳室持続投与が陽性の作用を示す可能性は高く、片麻痺モデルの治療応用の可能性がある。将来は Reelin を応用して片麻痺等の運動機能障害の高度機能回復を目指す。

### 3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞から神経細胞を分化誘導して *in vitro* で二次元構造さらに三次元構造を形成させる時に、皮質運動野発生時に重要となる Reelin 等神経幹細胞遊走関連分子の遺伝子・蛋白発現を観察する。神経細胞移植時には *in vivo* での観察を行う。In vivo では移植後の経時的、部位的な Reelin, Disabled の分子間相互作用の果たす役割に着目する。一部の実験では遺伝子改変マウスを用いてこれら分子の役割を明らかにする。本研究では成長因

子・ケモカインを用いて Reelin 等の発現調節を行い大脳皮質の第 5 層である内錐体(細胞)層 internal pyramidal layer の形成を目指す。損傷部皮質の再生モデルを用いて、皮質に対する垂直方向及び水平方向の神経幹細胞の遊走に関わる分子動態を解明して、さらなる神経の多層化・組織再構築を目指して解析を加える。

#### 4 . 研究成果

我々はこれまでに片麻痺モデルマウスに対してヒト iPS 細胞由来神経細胞移植を行ってきた。ここでは神経細胞移植が片麻痺モデルの運動機能を著明に改善させた。その過程でケモカイン SDF1 がヒト神経細胞の受容体 CXCR4 に作用して神経細胞の遊走と成熟をもたらす事を既に報告した。

Reelin は神経細胞の移動と運動皮質の層構造形成の制御を補助する巨大蛋白質として同定され、現在では神経の機能発現に重要に関わることが知られている。

最近になり統合失調症、自閉症をはじめとした種々の中枢神経系の関わる疾患で異常を示す事が示されてきた。我々の片麻痺モデルマウスに神経細胞移植を行う実験系においても、炎症細胞と移植細胞は Reelin を産生していた。この産生された Reelin はオートクリンとパラクリンの両者のメカニズムで神経組織修復をもたらした。

移植細胞は Reelin の受容体である ApoE 受容体と VLDL 受容体を充分量発現しており、Reelin を受け取ることで細胞内刺激伝達系でその下流に位置する Disabled1 のリン酸化を引き起こした。リン酸化 Disabled1 はその下流に位置する GSK ベータのリン酸化も誘導した。

その後の事象として神経細胞の遊走に重要に関わる接着因子であるインテグリンと N カドヘリンの発現を誘導した。移植細胞は Reelin に暴露後、損傷部皮質まで遊走した。そのうち損傷部皮質で神経ネットワークを再構築した。損傷部皮質まで移動した神経幹/前駆細胞は移動の過程で皮質運動神経への分化を伴い、FoxP2、CRIM1、さらに Fetzf2 や CTIP2 などの一次運動神経マーカーを発現した。これらの成績は、片麻痺モデル動物への神経幹/前駆細胞移植では Reelin がその組織学的な修復と機能回復に重要に関わることが示している(論文修正中)。

神経細胞移植モデルを用いて運動機能回復、皮質層構造の再生過程における Reelin 等の神経幹細胞走化関連蛋白の役割を解明して、再生過程におけるこれら分子の役割を明確化を行ったうえで、今後は、さらに神経の多層化、三次元神経組織の再構築に応用する点に独創性を有する研究結果と考えている。

特記すべき視点としては、発生学的機序の再現という観点からは、正常発生移植後の組織再生のみならず、疾患特異的な iPS 細胞を応用すれば何らかの疾患特有の分子動態を把握できる可能性を持つ。大脳皮質発生に重要な分子群は、Reelin のみではなく、その多くの分子が、ヒトでの動態は十分らかではないが、脳梗塞等で中心的な役割を果たすことが示唆されており(Courtes S et al. Plos one 2011)、今後発生モデル・疾患モデルとして革新的な研究成果をもたらすと推察する。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Shimizu J, Kubota T, Takada E, Takai K, Fujiwara N, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Relative abundance of *Megamonas hypermegale* and *Butyrivibrio* species decreased in the intestine and its possible association with the T cell aberration by metabolite alteration in patients with Behcet's disease. *Clin Rheumatol*. 2019. doi: 10.1007/s10067-018-04419-8. [Epub ahead of print] 査読有
2. Shimizu J, Kubota T, Takada E, Takai K, Fujiwara N, Arimitsu N, Murayama MA, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Propionate-producing bacteria in the intestine may associate with skewed responses of IL10-producing regulatory T cells in patients with relapsing polycondritis. *PLoS One*. 2018; 20;13(9):e0203657. doi: 10.1371/journal.pone.0203657. eCollection 2018. 査読有
3. Suzuki N, Arimitsu N, Shimizu J, Takai K, Hirotsu C, Takada E, Ueda Y, Wakisaka S, Fujiwara N, Suzuki T. Neuronal cell sheet of cortical motor neuron phenotype derived from human iPS cells. *Cell Transplant*. 2017; 26:1355-1364. doi: 10.1177/0963689717720280. 査読有
4. Shimizu J, Kubota T, Takada E, Takai K, Fujiwara N, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Bifidobacteria Abundance-Featured Gut Microbiota Compositional Change in Patients with Behcet's Disease. *PLoS One*. 2016; 11: e0153746. 査読有
5. Shimizu J, Takai K, Takada E, Fujiwara N, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Possible association of proinflammatory cytokines including IL1 and TNF with enhanced Th17 cell differentiation in patients with Behcet's disease. *Clin Rheumatol*. 2016; 35:1857-1863. 査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

#### 6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。