

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591404

研究課題名（和文） サル脳の神経幹細胞の画像化と機能解析

研究課題名（英文） Neuronal stem cell imaging and analysis of non-human primates brain

研究代表者

松崎 秀夫（MATSUZAKI HIDEO）

浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・特任准教授

研究者番号：00334970

研究成果の概要（和文）：

本研究は、ウイルスを用いて成体サル脳で神経幹細胞特異的に細胞毒性遺伝子を発現させ、神経幹細胞を選択的に障害することによって、ほ乳動物の成体脳で見られる神経新生の担う役割を解明することを目的としている。本研究において作製されたウイルス発現系は、神経幹細胞特異的に *in vivo* で種々の遺伝子を発現するための有用な手段となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we tried to generate recombinant retrovirus or lentivirus vector capable of inhibiting function of neuronal stem cell (NSC) to assess the role of hippocampal neurogenesis in social recognition behavior of non-human primates. This virus vector system may be useful for neurogenesis research as novel tool for NSC-specific gene expression and imaging *in vivo*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成21年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成22年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：神経幹細胞, 霊長類, PET, 認知機能

1. 研究開始当初の背景

近年に至り、脳内の神経新生に注目した研究が大きな潮流となりつつある。古くから成体哺乳類の中枢神経は再生しないと考えられてきたが、米国ソーク研究所のGageらは成人の脳内にも神経幹細胞が存在し、実際には海馬歯状回や脳室下帯でさかんに神経細胞の新生が生じていることを示した（Eriksson et al, 1998）。

脊椎動物の脳でも、新しいニューロンは生涯つくられている。この発見により、それまで明確な病因が不明であった中枢神経疾患について神経新生の側面から解釈する着想がもたらされた。以後、精神疾患治療には神

経新生の修復が有効とする状況証拠が数多く集積され、神経幹細胞移植などの臨床応用が現実的に検討されている。Risperidone, Olanzapineなどの非定型抗精神病薬やSSRIなどの抗うつ薬は神経新生作用を有する（Wakade et al 2002, Santarelli et al 2003, Wang et al 2004, Kodama et al 2004, Halim et al 2004, Schmitt et al 2004, Luo et al 2005）。統合失調症患者の死後脳研究からは、統合失調症で海馬歯状回の神経幹細胞が有意に減少している事実が示されている（Reif et al 2006）。

脳内海馬で起きている神経細胞の新生は、認知機能にどのような影響を与えているの

だろうか。海馬新生ニューロンが記憶形成に関与しているかどうかを調べるため、Gouldらは海馬歯状回に methylazoxymethanol (DNAメチル化剤: 核酸に障害を与え、分裂中の神経細胞を選択的に死滅させる) を投与した成熟ラットで記憶学習に与える影響を検討した。その結果、薬剤投与により海馬依存的な痕跡条件づけに障害を生じるが、海馬非依存的な学習には障害は生じなかった。また、ニューロン新生能力が回復すると、痕跡記憶の獲得能力も回復した(Shors et al 2001)。これらの結果から、成熟ラットでのニューロン新生は記憶形成の一部を担っていると判明した。一方、HenのグループはX線照射やHSV-tk遺伝子の導入によってマウス海馬歯状回の神経幹細胞を特異的に死滅させたところ、同マウスのワーキングメモリーが向上したと報告(Saxe et al 2007)しており、神経新生と認知機能の関連は必ずしも定かではない。さらに精神活動との関連を考えると、齧歯類での検討にはおのずと限界があり、霊長類での検討が必要である。

我々は基盤研究(A)「サル統合失調症モデルの作出と統合失調症に対する神経幹細胞脳内移植療法の開発」(平成19~21年度)の補助を受け、霊長類の頭部に限局的なX線照射を施し、認知機能を調べる試みを行なった。だが、脳内神経幹細胞の存在を確認する手段は開頭して脳を剖出するほかになく、霊長類では容易ではない。簡便に脳内神経幹細胞の動向をモニターする方法の開発が望まれる。

また、限局的なX線照射によって起きる行動異常が、真に神経幹細胞を傷害したことによるものかどうか断言できない。X線照射モデルラットにおいても、神経幹細胞の傷害以外に何らかの神経細胞の形態学的変化が引き起こされ、それがモデルの異常に関連している可能性がある。脳内神経幹細胞の役割を検証するには、別の手段によって可逆的に脳内神経幹細胞のみを阻害したモデルを作製し、検証を補完する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、脳内神経幹細胞にレトロウイルスベクターでHSV-tk遺伝子を導入した霊長類モデルを開発する。herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tk)遺伝子は、分裂している細胞を特異的に死滅させる「自殺遺伝子 (suicide gene)」として遺伝子工学技術に頻用されている(van Dillen et al 2002)。HSV-tk遺伝子を導入するレトロウイルスは既に抗がん剤開発の過程で開発されている。脳室内でウイルスを介してHSV-tk遺伝子を発現したマウスでは、ガンシクロビル (ganciclovir) のホモログを用いたトレーサー18F-FHBGを末梢から導入することに

よってPET画像法による神経幹細胞の可視化が実現できる(Dubey et al 2003)。

この技術を応用して本研究では、神経幹細胞のマーカー分子として近年知られてきたProminin (CD133)のプロモーター活性を利用して、まず初年度に「カニクイザル脳内神経幹細胞特異的にHSV-tk遺伝子を導入するレトロウイルス」を構築し、カニクイザルへの遺伝子導入を果たす。ついで次年度より、このサルを用いた実験に入る。これまで霊長類に行なってきたX線照射の神経幹細胞への影響を、18F-FHBGを用いたPETによって生体脳で観察する。X線照射は脳内の神経前駆細胞の新生を阻害するため、脳内神経幹細胞が傷害される経過を生体で捉えることができるかと期待される(Monje et al 2002)。また、別にganciclovirの脳室内投与で神経幹細胞のみ選択的に死滅させたサルを作製する。このサルの解析は広く脳内神経幹細胞の役割を知る重要な手がかりとなりうるが、本研究では認知機能との関連に注目する。今後の脳科学の主要な領域の一つは、この神経幹細胞の機能解明と治療への応用にある。しかし脳内神経幹細胞を損傷するとどうなるのか、霊長類で報告した例は知られていない。また、生体脳において神経幹細胞を画像化する技術は未だに開発されていない。本研究はこれらを同時に解決しうるものである。霊長類での脳内神経新生の役割を問うためには、モデル動物として神経幹細胞の機能低下をもたらす遺伝子操作を施した霊長類の開発が望まれる。だが、世代交代に年単位を要すること、動物倫理上の壁が高いことなどから事実上遺伝子改変ザルを作り出すことには不可能に近かった。

そこで本研究では、成熟サルにウイルスベクターで遺伝子を導入することで特異的な神経幹細胞の機能低下を図る。この方法もかつては理論上の産物にすぎなかったが、カニクイザルのBACライブラリーが完備され、幹細胞マーカー分子のプロモーター配列をクローニングできるようになったことから、実現に至った。現時点ではこの手法による遺伝子導入が唯一サルに適用可能である。

本研究で作製される霊長類モデルがどのような異常所見を示すかは不明だが、今後は神経幹細胞移植によりその所見の修復が果たせるかどうか注目している。ゆくゆくは統合失調症にみられる認知機能異常の解明に利用することを考えており、最終的にはこの霊長類モデルで神経幹細胞の脳内移植による統合失調症治療法の開発を目指している。こうした着想は、国内外を通してこれまでに例がない。しかし、このモデルは精神医学者のみならず、神経幹細胞を研究する全ての研究者にとって、有益な研究材料となる。

3. 研究の方法

初年度は神経幹細胞の機能低下をもたらすウイルスベクターの構築とカニクイザル脳室内へのウイルス注入を行ない、次年度以降は遺伝子導入を果たしたカニクイザルを用いて、PETによる脳内神経幹細胞のモニタリング、および神経幹細胞と認知機能の関連について調べる実験計画とした。

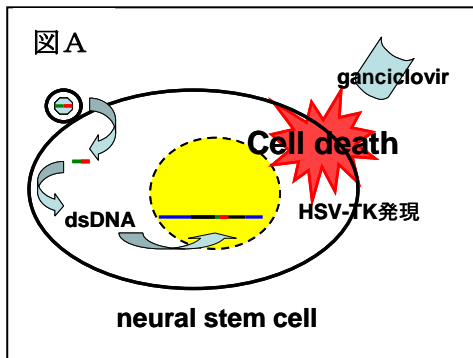
2008 年度

①遺伝子導入による霊長類モデルの作製

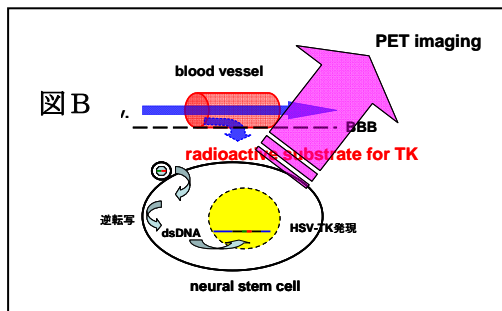
1) レトロウイルスの構築：カニクイザル Promonin (CD133) プロモーター下に HSV-tk 遺伝子, IRES 配列, EGFP 遺伝子を連結してレトロウイルスベクターに挿入する。このウイルスを PT67 細胞でパッケージングしてウイルス粒子を得る。

2) 脳室内カニューレの留置：6頭の成熟雄カニクイザル(4~5歳)を用いる。カニクイザルをペントバルビタール麻酔下に脳定位手術装置に固定し、サルのアトラスに基づいて脳室内にカニューレを留置する。

3) ウイルスの注入：脳カニューレを介して組み換えレトロウイルスを注入する。このウイルスは神経幹細胞に特異的に感染して、HSV-tk 遺伝子を発現する。このモデルは ganciclovir の脳室内投与で神経幹細胞のみ選択的に死滅させることができる(図A)。



しかし、一定期間ののち ganciclovir が代謝されると、このモデルは可逆的に正常に戻りうる。また、HSV-tk 遺伝子の特異的なトレーサー¹⁸F-FHBG を末梢から導入することによって PET 画像法による神経幹細胞の可視化が実現できる(図B)。



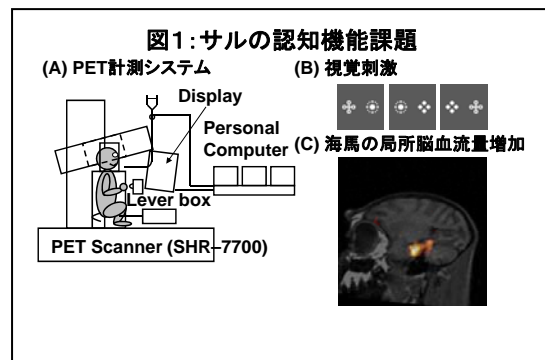
2009 年度

②霊長類モデル脳内神経幹細胞の PET イメージング

遺伝子導入を終えた成熟雄カニクイザル3頭を用いる。全身麻酔下で頭部以外は3.0mm厚の鉛遮蔽箱で覆い、海馬と側脳室を含む領域に対して、1回5Gy(対向二門照射で左右から2.5Gyずつ)で、6回の分割照射を行う(総線量30Gy)。X線照射後より3ヶ月毎に¹⁸F-FHBGでPET測定し、X線照射による脳内神経幹細胞の変化を観察する。

③霊長類モデルの PET 計測による認知機能評価

遺伝子導入を終えた成熟雄カニクイザル3頭を用いる。脳内神経幹細胞の機能低下が認知機能に与える影響を調べるため、PET計測システムの中で表示される視覚刺激のうち一方を選択する弁別課題をサルに行わせる。この課題の遂行中に¹⁵O-H₂Oを用いてPET測定を行うと海馬の局所脳血流量の増加が確認できる。同じ課題を ganciclovir 投与前・投与後および ganciclovir の効果が消えた後に行わせ、神経幹細胞の機能低下と海馬認知機能障害の関連を調べる(図1)。



2010 年度

④霊長類モデルの脳の組織学的評価

実験②、③の終了後、深麻酔下に安楽死させ、死後脳を病理組織学的検討に用いる。まず神経細胞には NeuN, アストロサイトには GFAP, オリゴデンドロサイトには APC (CC1), ミクログリアには CD11b に対する蛍光抗体を用いて各細胞の分布を検討する。ついで神経幹細胞・前駆細胞のマーカーである Nestin, Prominin, Ki-67 に対する特異的抗体を用い、側脳室下帯と海馬歯状回におけるマーカーの発現を免疫組織化学法により検討する。そして PET で得た所見との整合性を確かめる。

4. 研究成果

当初 HSV-tk 遺伝子を Prominin1 プロモーターの下流に組込んだレトロウイルスベクターを構築し、感染した神経幹細胞が ganciclovir の存在下に選択的に障害されるような遺伝子発現系の作製を試みたが、感染実験で十分な効果が得られなかった。そこでレンチウイルス発現系に転向し、CMV プロモーターの下流に HSV1-tk を組み込んだレンチウイルスベクターを作製した。カニクイザル脳に感染させた後に脳室内 ganciclovir 投与で神経幹細胞障害の誘導を行った結果、in vivo 蛍光イメージング装置および PET によって脳室下帯における神経幹細胞死の誘引を確認したが、bystander effect によると推測される周辺細胞の非細胞特異的細胞死も多く確認され、今後はウイルスの感染方法や ganciclovir の投与手段の至適化が必要と判断された。遺伝子発現系の構築が予定通りに進まなかったため、サルの認知機能評価・脳病理組織学的評価は行われなかった。

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0件)

〔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)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

松崎秀夫 (matsuzaki hideo)

浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・特任准教授

研究者番号：00334970

(2)研究分担者

岩田泰秀 (iwata yasuhide)

浜松医科大学・医学部付属病院・講師

研究者番号：10285025

中村和彦 (nakamura kazuhiko)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80263911

須田史朗 (suda shiro)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：40432207

植木孝俊 (ueki takatoshi)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60317328

岩田圭子 (iwata keiko)

浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・特任助教

研究者番号：30415088