

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 6 日現在

機関番号：34417
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22790092
 研究課題名（和文）iPS 新細胞を用いたアルツハイマー型痴呆症における神経再生治療研究
 研究課題名（英文）iPS cell-based regeneration therapy for Alzheimer's disease.
 研究代表者 丸山 正人
 (MARUYAMA MASATO)
 関西医科大学・医学部・講師
 研究者番号：00399445

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー型痴呆症などの中枢神経系の脱落による疾患は、未だに根治療法が存在しない。そこで、本研究では、iPS 細胞による中枢神経再生療法の実現に向けて、分化させた iPS 細胞から神経幹細胞を効率よく純化させる方法論を構築した。

研究成果の概要（英文）：There is no curative treatment for Alzheimer's diseases characterized by neuronal degeneration. To apply iPS cells to Alzheimer's disease, we established a method for efficient purification of neural stem cells derived from mouse iPS cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：iPS 細胞、神経幹細胞、分化

1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞（iPS 細胞）は、ES 細胞と同等の機能を有するため、再生医療への応用が期待されている。特に、中枢神経系は、再生能力が低いことが知られているため、iPS 細胞を用いた細胞療法の重要なターゲットとなる。一方で、iPS 細胞を分化させると、多くの細胞種が混在するため、目的となるターゲット細胞を純化する過程が必須となる。

2. 研究の目的

iPS 細胞を用いた中枢神経系に対する再生療法を実現するため、分化させたマウス iPS 細胞から、神経細胞やグリア細胞の前駆体で

ある神経幹細胞を効率よく入手することが必要である。そこで、薬剤耐性遺伝子を神経

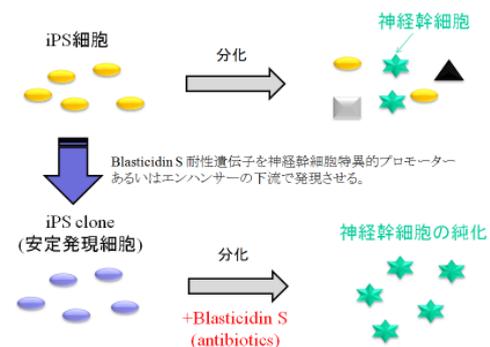


Fig. 1 分化させたiPS細胞から神経幹細胞を純化させる方法

幹細胞に特異的に発現させ、薬剤選択を利用してターゲット細胞を純化させる方法を考えた (Fig. 1)。

3. 研究の方法

ラットの尾からゲノムを抽出し、nestin のエンハンサー領域をクローニングした。抽出した領域を鋳型として種々の遺伝子発現ベクターを構築した。構築したベクターは遺伝子導入試薬およびエレクトロポレーション法を用いて、NE-4C 細胞およびマウス iPS 細胞へ導入した。遺伝子導入後、G418 耐性コロニーを作製することで、iPS 安定発現細胞を樹立した。

4. 研究成果

ラットのゲノム DNA からクローニングした nestin エンハンサー領域の活性を、内因性に nestin を発現する NE-4C 細胞においてレポーターアッセイにより確認した (Fig. 2)。その結果、nestin second intron の全長を含む pNHL を遺伝子導入した結果、エンハンサーを含まない pHL と比べてルシフェラーゼ活性が約 5 倍上昇した。また、pN257HL を遺伝子導入したときも、pNHL と同様のルシフェラーゼ活性の上昇がみられたため、nestin second intron 内に存在する 257bp の領域が、神経幹細胞におけるエンハンサー活性に十分であることが示された。さらに、257bp の領域をタンデムに繋げた pN257x2HL を遺伝子導入すると、ルシフェラーゼ活性が約 11 倍に相加的に上昇した。

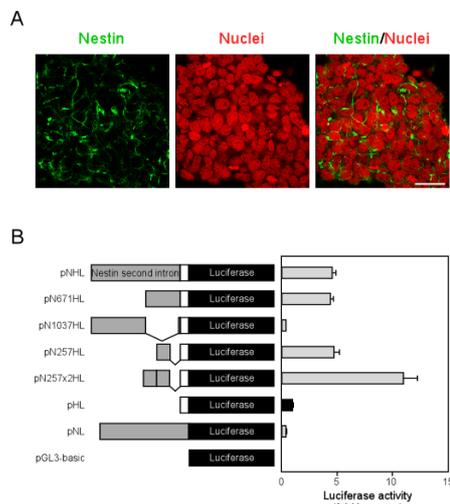


Fig. 2

次に、薬剤耐性遺伝子 (Bsd) の発現を、蛍光を指標に観察できるようにするため、nestin エンハンサーの下流で Bsd と DsRed を同時に発現するバイシストロン性遺伝子発現ベクターを 4 種類構築した (Fig. 3A)。構築したベクターを NE-4C 細胞に導入し、DsRed と Bsd の発現を解析した。トランスフェクシ

ョン効率を補正するため、各ベクターと

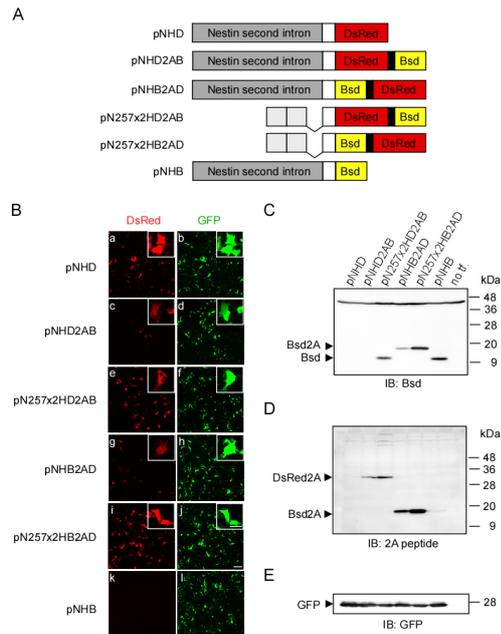


Fig. 3

pEGFP-N1 ベクターを同時トランスフェクションした。DsRed の蛍光観察を行った結果、

pNHD2AB や pNHB2AD を遺伝子導入した場合には、pNHD と比べて DsRed の蛍光は減少した。一方、pN257x2HD2AB や pN257x2HB2AD を遺伝子導入した場合には、DsRed の蛍光は上昇した (Fig. 3B)。タンデム型エンハンサーを含むベクターにおいて遺伝子発現量が増加することは、Fig. 2 の結果と同様であった。次に、各ベクターを NE-4C 細胞へ遺伝子導入後のライセートを用いて、Bsd の発現をウェスタンブロット法により解析した (Fig. 3C-E)。抗 Bsd 抗体を用いて検出した結果、pN257x2HD2AB を遺伝子導入した場合には、pNHB を遺伝子導入した場合と同様、約 13kDa の Bsd のバンドが確認できた。一方、pNHB2AD と pN257x2HB2AD を遺伝子導入した場合には、15kDa のバンド (Bsd-2A の融合タンパク質) が確認できた。Bsd-2A-DsRed のコンストラクトを有するベクターの方が、DsRed-2A-Bsd のコンストラクトを有するベクターよりも Bsd の発現量が高かったことから、NHB2AD 及び N257x2HB2AD のコンストラクトを以降の実験に用いた。

iPS 細胞において、安定発現株を効率よく作製するため、piggyBac トランスポゾンプラスミドを構築した (Fig. 4A)。最も長い挿入部位を有する pPB-NHB2AD を、トランスポゼース (mPB) の存在下あるいは非存在下で iPS 細胞へ導入し、G418 耐性コロニーの形成効率を検討した。その結果、pPB-NHB2AD 単独で遺伝子導入した場合に比べて、mPB と pPB-NHB2AD を同時に遺伝子導入すると、コロ

ニ形成効率が約 10 倍に上昇した (Fig. 4B, C)。同様に、pPB-HB2AD 及び pPB-N257x2HB2AD の iPS 安定発現細胞も樹立した。

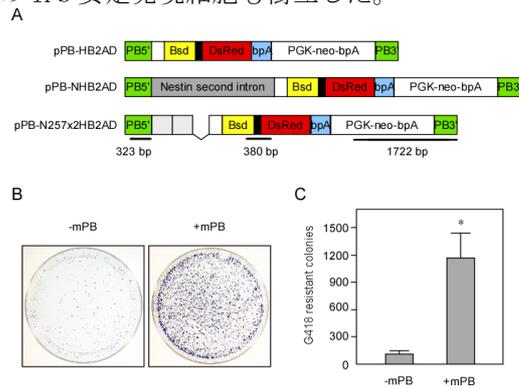


Fig. 4

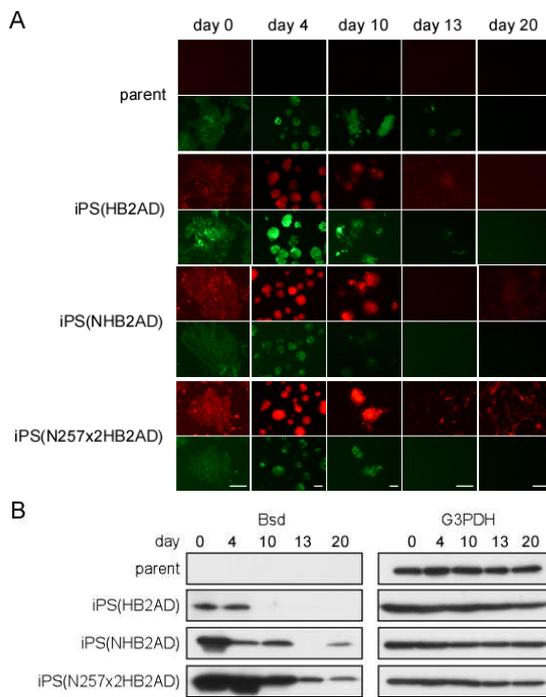


Fig. 5

各安定発現細胞を神経系へと分化させたときの、DsRed の蛍光を経時的に観察した (Fig. 5A)。その結果、未分化な状態 (day0) でも、iPS (HB2AD)、iPS (NHB2AD)、iPS (N257x2HB2AD) は赤色蛍光を示した。エンハンサー領域を有しない iPS (HB2AD) でも赤色蛍光が観察されることから、これは、Hsv-tk プロモータによる非特異的な発現であると考えられる。iPS (HB2AD) や iPS (NHB2AD) では、DsRed の蛍光は、分化の進行とともに減少し、分化 13 日目 (day13)、20 日目 (day20) では、ほとんど蛍光はみとめられなかった。一方、iPS (N257x2HB2AD) では、分化 20 日目まで赤色蛍光が観察された。本研究で用いた iPS 細胞は、Nanog プロモータ

の下流において GFP を発現するが、分化が進むにつれて GFP の蛍光は減少した。Bsd の発現は、iPS (NHB2AD) 細胞では day20 においてみとめられ、iPS (N257x2HB2AD) 細胞では、day13、day20 において発現がみとめられた (Fig. 5B)。

以上の結果から、iPS (HB2AD) において非特異的な DsRed 及び Bsd の発現が減少する 13 日目以降に Blasticidin S を添加するのが最適であると考えられた。RT-PCR 法を用いて、神経系へ分化誘導させた iPS 細胞における分化マーカーの発現を経時的に解析した結果、分化が進むにつれて外胚葉マーカーである Nestin、内胚葉マーカーである Gata6、中胚葉マーカーである Brachyury の発現量は上昇し、ES 細胞マーカーである Oct3/4 や Sox-2 の発現量は減少した (Fig. 6)。このことは、20 日間分化させても、神経幹細胞以外に、内胚葉や中胚葉由来の細胞、さらには未分化な細胞が混在していることを示している。

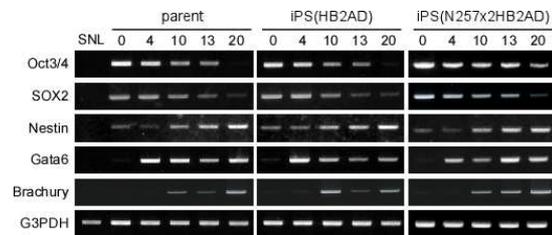


Fig. 6

次に、分化させた細胞に blasticidin S を加えたときの DsRed 陽性細胞の純化をフローサイトメトリーを用いて解析した。まず、20 日間分化させた parent 及び安定発現細胞を FSC vs SSC のドットプロットで解析し (Fig. 7A)、propidium iodide 陰性の生細胞 (黒線内) をゲーティングした。DsRed の蛍光について解析した結果、parent (gray) や iPS (HB2AD) 細胞 (black) は、赤色蛍光を示さなかったのに対し、iPS (N257x2HB2AD) 細胞 (white) は DsRed の蛍光を示した (Fig. 7B)。次に、iPS (N257x2HB2AD) 細胞を、50 μ g/mL の blasticidin S 存在下あるいは非存在下で分化させたときの DsRed 陽性細胞の割合を解析した。その結果、blasticidin S 存在下で分化させると、DsRed 陽性細胞の割合が 47.4% から 55.4% へと増加した (Fig. 7C, D)。

BcdS の添加により、どのような特徴を有する細胞が純化されたのかを、Real-time qPCR 法により解析した (Fig. 8A)。その結果、blasticidin S 添加後の細胞は、神経幹細胞マーカーである Nestin の転写産物が約 1.6 倍に上昇し、中胚葉マーカーである Brachyury の転写産物が約 1/5 にまで低下していた。これより、blasticidin S の添加により、中胚葉系の細胞が死滅することで、神経幹細胞の純化効率を上昇させていることが示された。

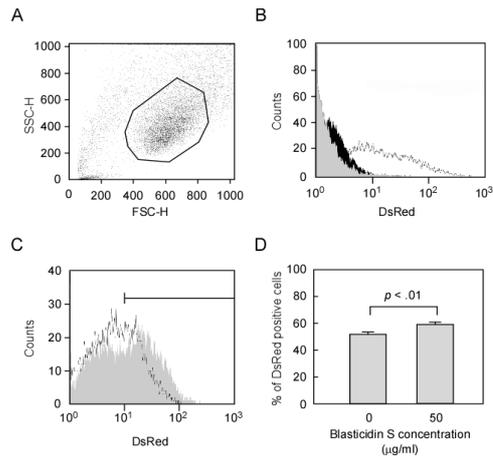


Fig. 7

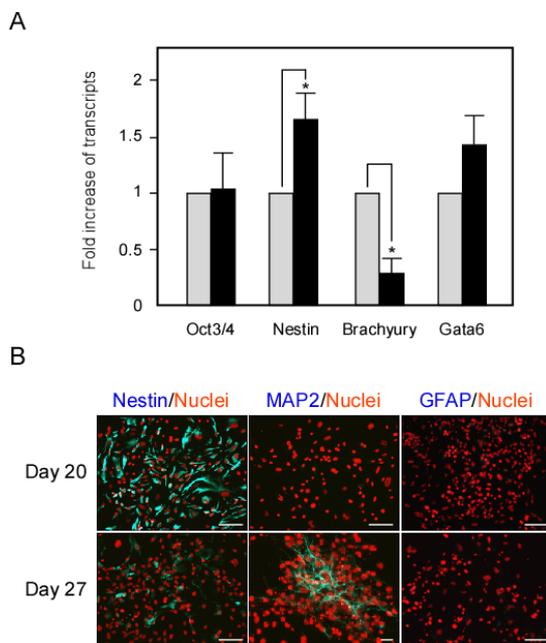


Fig. 8

最後に、純化した細胞が、神経細胞への分化能を有するか検討した (Fig. 8B)。

blastocidin S 添加により純化させた細胞を、さらに 7 日間分化させ、神経細胞マーカー (MAP2) 及びグリア細胞マーカー (GFAP) に対する抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、GFAP 陽性細胞はみとめられなかったが、MAP2 陽性細胞が観察されたことから、純化させた細胞は、神経系への分化能を保持していることが示された。

特異的プロモータの選択など、さらなる効率化が必要であるが、以上の結果、薬剤選択を利用した神経幹細胞の純化方法が構築できた。アルツハイマー病やパーキンソン病などの中枢神経をターゲットとした再生医療研究への本法の貢献が期待される。

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)

[学会発表] (計 2 件)

丸山正人, 山下雄司, トリフォノフステファン, 加瀬政彦, 杉本哲夫, ” 薬剤選択によるマウス iPS 細胞由来神経幹細胞の純化” 第 84 回日本生化学会大会、京都 2011 年 9 月 23 日

丸山正人, 山下雄司, トリフォノフステファン, 加瀬政彦, 清水順一, 杉本哲夫, ” 薬剤耐性を利用したマウス iPS 細胞由来神経幹細胞の純化” 第 34 回日本神経科学大会、神奈川 2011 年 9 月 17 日

[その他]

ホームページ等

<http://www3.kmu.ac.jp/anat2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 正人 (MARUYAMA MASATO)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：00399445