

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500498

研究課題名(和文) 神経幹細胞追跡のためのバイオイメーキングシステムの構築

研究課題名(英文) Establishment of bio-imaging system for detecting neural stem cell

研究代表者

袴田 陽二 (HAKAMATA, YOJI)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：00218380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： 移植神経幹細胞を生体内で追跡可能となるメーキングシステムの構築を目指して、細胞マーカー発現ラットならびに正常スナネズミを由来とする幹細胞の樹立と脳虚血障害モデルを用いた治療効果を検証した。その結果、神経幹細胞の候補として骨髄間葉系幹細胞(BMSC)の樹立に成功した。移植BMSCは、障害部位に早期に集積し、神経細胞死を軽減した。細胞標識技術とバイオイメーキングシステムの組合せは、移植神経幹細胞の有効な追跡ツールとなることが判明した。

研究成果の概要(英文)： To establish the bio-imaging system for detecting neural stem cell after transplantation, we isolated cell marker expressed transgenic rats and normal gerbils mesenchymal stem cells (MSCs) cell from each bone marrows. We also evaluated the neuroprotective effects of labeled MSCs using the transient cerebral ischemia gerbil model. This result demonstrated that MSCs can accumulate in injured areas presumably due to chemokine activities and contribute to neuroprotection. Bio-imaging system with cell marker labeling by quantum dots and transgenic animal technology is very useful tool for detecting neural stem cell.

研究分野：神経病理

キーワード：神経再生 再生医療 間葉系幹細胞 トランスジェニック動物 脳虚血 神経細胞死

1. 研究開始当初の背景

幹細胞を利用した再生医療が注目される中、神経再生に利用可能な幹細胞には、中枢神経組織由来の神経幹細胞あるいは神経前駆細胞、更には ES 細胞ならびに iPS 細胞などがある。加えて、損傷組織の自己修復を補填する細胞として、骨髄細胞を由来とする間葉系細胞 (MSC) あるいは単核球細胞も幹細胞として期待されている。しかし、幹細胞を利用した再生医療が一般治療として定着するには、その有効性ならびに安全性の確認が重要である。申請者は、動物モデルを用いた脳虚血障害の病態解析の研究により、神経細胞死の原因が神経細胞の代謝異常に加え、神経細胞周囲のグリア細胞ならびにそれらに酸素と栄養を供給する毛細血管の血流障害が神経細胞死に重要であることを明らかにしてきた。同時に、発生工学的手法を駆使して、移植細胞の分化、増殖ならびに遊走を非侵襲的に追跡可能なバイオイメージングに利用可能な細胞マーカータンパク (GFP, Luciferase) 発現トランスジェニックラット (Tg ラット) を精力的に作製してきた。Tg ラット由来の幹細胞は分化、増殖しても、そのマーカー発現を指標に追跡可能となる。今回、Tg ラット由来の幹細胞を樹立し、臨床応用を目指した基盤研究として、幹細胞の特性解析と脳虚血障害に対する治療効果を検証することとした。

2. 研究の目的

これまで損傷を受けた神経組織は二度と回復しないと長く信じられてきたが、胚性幹細胞 (ES 細胞) の発見を機に多分化能を有する幹細胞を利用した臓器再生が期待されるようになった。さらに、山中博士らの樹立した iPS 細胞は ES 細胞に代わる幹細胞として医療や創薬での利用が期待されている。2012 年、米国ではヒト ES 細胞由来の神経幹細胞を用いた移植再生医療のための臨床試

験が承認された。しかし、移植後の神経幹細胞の動態にはいまだ不明な点が多く、臨床応用するためにはその基盤となる研究が必須である。特に、これら幹細胞の生体内におけるバリデーションを評価するには、再現性の高い疾患モデルを用いて、移植幹細胞を時空間的に追跡するシステムが必要である本研究目的は、脳虚血障害に対する神経幹細胞の治療効果を実証するために移植幹細胞を非侵襲的に長期に追跡可能なバイオイメージングシステムを構築し、そのシステムの有効性を実証することである。

3. 研究の方法

(1) 神経幹細胞の樹立と特性解析：再生医療に利用可能となる幹細胞の候補には複数存在するが、既に臨床試験が全国の複数の病院で実施され、最も臨床応用に近いと考えられている骨髄間葉系幹細胞 (BMSCs) に焦点を絞って、脳虚血研究に多用されているラットとスナネズミの骨髄から細胞を採取し、BMSCs の樹立と特性解析を行った。

(2) 脳虚血障害に対する BMSCs の治療効果：生体における幹細胞の治療効果を評価する上で、疾患モデルの選択は極めて重要である。実験には、脳虚血障害が再現性よく誘導出来るスナネズミを用いた。スナネズミの両側総頸動脈を一過性に繰返し閉塞し、大脳皮質に脳虚血を誘導し、血流再開後の神経細胞数を定量した。本モデルを用いて、MSC の神経保護作用を検証すると共に、他の幹細胞との特性比較として、骨髄細胞 (BMC) による神経保護作用を検証した。移植ルートによる有用性の相違の有無を検証するために、BMSCs を動脈および静脈投与し、神経細胞数を計測した。

(3) 間葉系幹細胞の生体に移植後の動態：移植した細胞の体内動態を検証するため、ナノ色素 QD655 で標識した MSC を血流再開 48 時間目に左側総頸動脈から移植し、局在を

検証した。

4. 研究成果

(1) 神経幹細胞の樹立と特性解析

バイオイメージングシステムで高い実績のある細胞マーカータンパクである蛍光タンパクの GFP (Green Fluorescence Protein) およびルミネッセンス発光を持つ Luc (Luciferase) Tg ラット同士を交配して、GFP/LucTg ラットの作出に成功した。成熟 Tg ラットの骨髄から定法に従って間葉系幹細胞(BMSC)の分離培養を行い、得られた細胞をリアルタイム PCR、免疫染色および分化誘導実験により特性解析を行った。さらに、ラットに加え、脳虚血実験に多用されるスナネズミの骨髄から同様に MSC の樹立に成功した。スナネズミの BMSCs は動物種を超えて、ヒト、ラットおよびマウス骨髄由来の MSC 特性と共通性が高いことを明らかになった。一方で、分化能や形態学的特徴は動物種ごとに異なることも明らかになった。

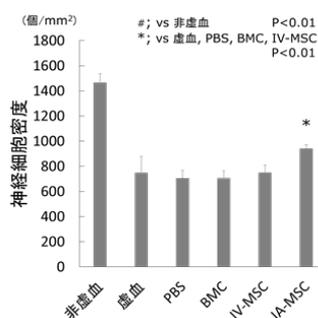


図1 移植方法・幹細胞種の違いによる大脳皮質神経細胞数の比較

(2) 脳虚血障害に対する間葉系幹細胞の治療効果：スナネズミの一過性脳虚血モデルを用いて、虚血負荷後 48 時間目に自家 BMSCs を動脈内投与 (IA-MSC) すると、虚血負荷後 7 日目の大脳皮質の神経細胞数の減少を有意に防ぐことを明らかにした (図 1)。その効果は、静脈内投与 (IV-MSC) あるいは骨髄細胞の動脈移植 (BMC) では認められなかった。

(3) 生体移植後の BMSCs の動態：

Tg ラット由来 BMSC の移植後のレシピエント内の動態を in vivo イメージングシステム (IVIS) を用いた追跡実験を行った。Tg ラット細胞 (肝細胞、骨髄細胞、MSC) を利用したラット間の同種異系細胞移植では、移植細胞は移植後 1 週間以上追跡可能であるのに対し、スナネズミへの異種移植では 1 週間以内に検出限界以下になり、何らかの免疫抑制が必要であることが判明した。今回は、免疫抑制剤シクロスポリンと放射線照射の併用に対する移植細胞の動態を検討し、その延長を確認した。新たに正常スナネズミ MSC の移植後のレシピエント内の動態を追跡するシステムの構築を目指して、蛍光色素細胞ラベルキットを用いて BMSC を標識し、移植後の細胞追跡システムの構築を目指した。ナノ蛍光色素でラベルした MSCs を移植すると、虚血障害部位に速やかに集積するが、移植後 5 日目には障害部位には存在しなかった。MSCs の脳虚血障害に対する邦語効果の詳細は不明であるが、障害急性期における MSCs の治療効果は MSCs の神経組織への分化あるいは組織置換ではなく、MSCs の分泌する各種の保護因子によるものと考えられる。今回の研究では、ルミネッセンス発光や蛍光タンパクである GFP を用いたバイオイメージングシステムの構築を目指し、両形質を発現するトランスジェニックラットを由来とする MSCs を樹立したが、スナネズミ移植後の体内消失が極めて早く、長期の観察が困難であった。当初、幹細胞の抗原性によるものと想定していたが、移植後の MSCs の体内動態は移植のタイミングや移植細胞数あるいは移植ルートにより大きく変動する可能性があり、今後の課題である。バイオイメージングシステムの構築を目指す上で、さらなる検討が必要である。細胞マーカーを利用したバイオイメージングシステムは生体内における神経幹細胞追跡のためのよいツールとな

ることが判明した。

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 4件)

- 1) Ito U, Hakamata Y, Yamaguchi T, Ohno K. Cerebral ischemia model using mongolian gerbils-comparison between unilateral and bilateral carotid occlusion models. *Acta Neurochir Suppl*, 118:17-21, 2013. DOI:10.1007/978-3-7091-1434-6_3
- 2) Ito U, Hakamata Y, Watabe K, Oyanagi K. Astrocytic involvement in the maturation phenomenon after temporary cerebral ischemia. *Acta Neurochir Suppl*, 118:23-29, 2013. DOI:10.1007/978-3-7091-1434-6_4
- 3) Ito U, Hakamata Y, Watabe K, Oyanagi K. Mannitol infusion immediately after reperfusion suppresses the development of focal cortical infarction after temporary cerebral ischemia in gerbils. *Neuropathology*, 34(4): 360-369, 2014. DOI:10.1111/neup.12113
- 4) Yamamoto, S, Nagao, Y., Kuroiwa, K., Hakamata, Y., Ichida, M., Saito-Ohara, F., Tominaga, K., Endo, H. Rapid selection of XO embryonic stem cells using Y chromosome-linked GFP transgenic mice. *Transgenic Res.*, 23(5): 757-765, 2014. DOI:10.1007/s11248-014-9813-0

[学会発表](計 17件)

- 1) 丸山基世、藤澤正彦、横須賀誠、斎藤 徹、羽山伸一、袴田陽二 : Alb-DsRed2 Tg ラットにおける性的二形性 DsRed2 発現は GH 分泌パターンに依存する。第 59 日本実験動物学会総会、2012.5.24、別府市
- 2) 袴田陽二、岡村恵理子、藤澤正彦、伊藤梅男 : スナネズミの脳底動脈血管走行の多様性。第 59 日本実験動物学会総会、

2012.5.26、大分市

- 3) 丸山基世、藤澤正彦、横須賀誠、斎藤 徹、藤平篤志、天尾弘実、羽山伸一、袴田陽二 : ラット性的二形性肝 CYP 発現解析モデルの確立。第 19 回肝細胞研究会、2012.6.29、札幌市
- 4) 丸山基世、藤澤正彦、横須賀誠、斎藤 徹、藤平篤志、天尾弘実、羽山伸一、袴田陽二 : ラットにおける脳と肝薬物代謝酵素の性的二形性の比較。第 154 回日本獣医学会、2012.9.14、盛岡市
- 5) Masahiko FUJISAWA, Hiroki KAWAMURA, Aya INOUE, Motoyo MARUYAMA, Yoji HAKAMATA. The healing effect of serotonin 5HT4 receptor activation on gastric and duodenal ulcers. AFLAS 2012(The 5th Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations Congress), Oct. 10-12, 2012, Bangkok, Thailand
- 6) Yoji HAKAMATA, Masahiko FUJISAWA, Motoyo MARUYAMA, Umeo ITO. Mongolian Gerbil Strains in Japan Demonstrate Diversity in Collateral Flow Pattern of Basilar Arteries. AFLAS 2012(The 5th Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations Congress), Oct. 10-12, 2012, Bangkok, Thailand.
- 7) Motoyo MARUYAMA, Masahiko FUJISAWA, Makoto YOKOSUKA, Toru R SAITO, Atsushi TOHEI, Hiromi AMAO, Shinichi HAYAMA, Yoji HAKAMATA: Establishment of a new in vivo analysis model for sexually dimorphic rat liver CYP gene expression. AFLAS 2012(The 5th Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations Congress), Oct. 10-12, 2012, Bangkok, Thailand,
- 8) 上田拓、大坂優衣、藤澤正彦、袴田陽二 : スナネズミを用いた新規脳虚血モデル

- の作製と応用。第2回動物保健看護系大学協会学術交流会，2013.3.9，東京
- 9) 佐川 航、藤澤正彦、袴田陽二：セロトニン5-HT4受容体刺激による小腸潰瘍治療効果の可能性について。第2回動物保健看護系大学協会学術交流会，2013.3.9，東京
- 10) 大坂優衣、寺谷 工、丸山基世、藤澤正彦、袴田陽二：スナネズミ骨髄細胞由来間葉系幹細胞の特性解析 第29回日本獣医生命科学大学学術交流会，2013.11.9，東京
- 11) 藤澤正彦、大坂優衣、丸山基世、袴田陽二：Hydrodynamic法によるnaked DNA導入に対するヒスタミン処置の有効性。第61日本実験動物学会総会，2014.5.15，札幌市
- 12) 大坂優衣、藤澤正彦、寺谷工、丸山基世、袴田陽二：スナネズミおよびラット骨髄由来間葉系幹細胞の特性比較研究。第61日本実験動物学会総会，2014.5.17，札幌市
- 13) 荒井香南、大坂優衣、藤澤正彦、袴田陽二：スナネズミの繁殖における腔内インピーダンスの有用性。第61日本実験動物学会総会，2014.5.17，札幌市
- 14) 大坂優衣、藤澤正彦、寺谷工、丸山基世、袴田陽二：スナネズミ脳虚血障害に対するスナネズミ骨髄由来間葉系幹細胞の神経保護作用の研究。第157回日本獣医学会学術集会，2014.9.11，札幌市
- 15) 荒井香南、大坂優衣、藤澤正彦、袴田陽二：スナネズミの繁殖における腔壁インピーダンス値の有用性。第1回獣医生命科学会，2014.11.9，東京
- 16) 大坂優衣、藤澤正彦、寺谷工、丸山基世、袴田陽二：スナネズミ自家骨髄由来間葉系幹細胞を用いた脳虚血障害に対する神経保護作用の研究。第1回獣医生命科学会，2014.11.9，東京
- 17) 大坂優衣、藤澤正彦、寺谷工、丸山基世、袴田陽二：スナネズミ自家骨髄由来間葉系幹細胞を用いた虚血性脳障害研究モデルの開発。第14回日本再生医療学会，2015.3.20，横浜市
- 〔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〕
ホームページアドレス
<http://www.nvlu.ac.jp/veterinary-nursing/members/003.html/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
袴田 陽二 (HAKAMATA YOJI)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授
研究者番号：00218380
- (2) 研究分担者
藤澤 正彦 (FUJISAWA MASAHIKO)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師
研究者番号：10508873