

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293308

研究課題名(和文) 多能性幹細胞(iPS細胞)を利用した脳梗塞に対する再生医療の開発

研究課題名(英文) Transplantation of iPS cell-derived neuronal stem cells into ischemic brain

研究代表者

高木 康志(Takagi, Yasushi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40312227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞由来神経幹細胞は移植された虚血脳では同側corpus callosum、striatumに広く分布し、成熟神経細胞マーカーにて染色され、神経細胞の分化が示された。行動実験では、移植後2週間では運動学的スコアの改善が得られたが長期経過観察では、有意な改善は得られなかった。臨床研究としては急性期脳卒中患者において、ロボットスーツによる機能再生治療の可能性が示唆されるデータが得られた。

研究成果の概要(英文)：Human iPSCs were induced to differentiate into cortical neuron progenitors and were transplanted intracranially into ipsilesional cortex 7 days post MCAO (90 minutes) or normal rats and also compared with sham transplanted rats. Transplantation in MCAO lesion brain increased graft reactivity, as demonstrated by higher degree of axonal outgrowth, cellular migration and directional preference toward ischemic border. Endogenous recovery was enhanced by transplantation at limited time point (\pm 2 weeks post transplantation), particularly forelimb movement after stimulation of impaired side. The improvement of functional recovery might be attributed to the declining of microglia infiltration. Human iPSCs-derived cortical neuron progenitors able to survive, migrate, and differentiate in ischemic environment and might contribute to behaviour recovery.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳血管障害学 脳梗塞 再生医療

1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患は厚生労働省の人口動態統計における国民年間死亡原因の第4位を長年占めている。しかも、厚生労働省の介護給付費実態調査によると要介護の原因となった疾患の内約3割が脳血管疾患であり、特に男性においてはその割合は4割以上と報告されている。脳梗塞に対する再生医療の試みとしては、内因性神経新生を亢進させる方法と細胞移植の二つに大別されるが、内因性神経新生は非常に数が少なく、たとえ亢進できたにしても機能回復をもたらすのには十分でないと考えられる。そこで、脳梗塞後の機能回復のためには細胞移植を行う必要がある。細胞移植による神経再生については、1990年代末から2000年前後にかけて、胚性幹細胞 (embryonic stem cell, ES cell) や骨髄間質細胞が neuron に分化する方法や可能性が報告され、飛躍的に研究が進歩した。申請者は1999年にマウス脳虚血モデルにおいて神経新生現象が起こっていることをマウスで始めて報告し (Takagi Y. et al. Brain Res. 1998)、日本学術振興会海外特別研究員として脳虚血研究における世界の第一人者の一人である Harvard University の Michael A. Moskowitz 教授の下に栄養因子である FGF2 や細胞周期制御物質である p21, p27 の脳虚血後神経新生における役割を明らかにしてきた (Yoshimura S and Takagi Y. et al. PNAS 2001, Qui J and Takagi Y. et al. J Exp Med. 2004)。帰国後は京都大学再生医科学研究所笹井芳樹教授の下、その当時報告されたばかりの ES cell から神経細胞を特異的に分化させる SDIA (stromal cell-derived inducing activity) 法を用いてカニクイサル ES 細胞をドーパミン産生細胞に分化させ、MPTP にて作成したサルパーキンソン病モデルに移植し機能回復を PET (positron emission computed tomography)、運動学的スコア、病理組織学的に確認し報告した

(Takagi Y. et al. J Clin Invest. 2005)。同時に脳虚血モデルにおいてもマウス ES 細胞、カニクイサル ES 細胞から誘導した神経幹細胞を脳虚血モデルに移植し、それらの生着および分化を報告している (Takagi Y. et al. J Neurosurg. 2005, Hayashi J and Takagi Y. et al. J Cereb Blood Flow and Metab. 2006)。また、共同研究者である高橋と共同でヒト ES 細胞を使う実験を行うことが京都大学医の倫理委員会に申請し、その使用が認められている。また2004年よりは骨髄間質細胞から Notch intracellular domain (Notch ICD) を細胞内へ transfection することによって神経細胞が誘導できることを報告した。今回の研究の背景としては、これまで長い間傷害された中枢神経系は再生不可能とされてきたが神経幹細胞が発見され、また胚性幹細胞から神経幹細胞の分化が可能となり、さらに体細胞から多能性幹細胞 (induced pluripotent cell: iPS) 細胞が樹立され中枢神経系を再構築することが考えられるようになった。

2. 研究の目的

当研究は Human iPS 細胞を使った脳梗塞に対する細胞移植治療を行うための translational research である。この研究では human iPS 細胞から誘導された神経幹細胞を使った脳梗塞モデルへの移植実験、移植後のビデオシステムによる行動解析、3T-MRI を使った移植細胞トラッキング、組織学的検討などの Pre-clinical study を行う。また効果のメカニズム解明や研究体制の整備も行う。臨床応用へのシステム作りも行う。

3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞を SFEB 法で分化させ神経幹細胞のマーカーで FACS sorting を行い、viability や回収効率など至適条件を検討する。回収した細胞をラット脳虚血モデルに移植し腫瘍形成を解析する。また 3T-MRI によ

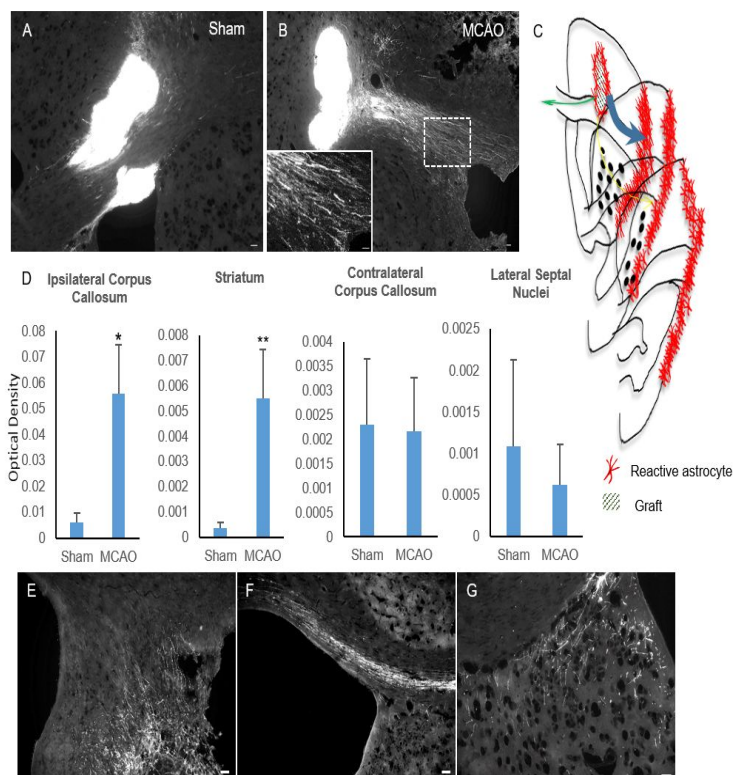
る個体を生かしたままで腫瘍形成、生着を評価できるシステムを構築する。臨床からのアプローチとしては、急性期脳卒中患者において、ロボットスーツを使った機能再生治療の導入実験を行った。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞より大脳皮質細胞を誘導しラット中大脳動脈閉塞モデルを用いて、梗塞巣の中心に移植を行い移植細胞の生着範囲、分化を組織学的に検討した。ヒト iPS 細胞から Ccip2 陽性ヒト大脳皮質細胞を多く含む神経幹細胞を誘導することが可能となった。この細胞を、マウス脳虚血モデルに移植した。細胞は脳梗塞巣へ移動し生着した。移動した細胞は、コントロールマウス脳より、広範囲に生着した(図)。

また、ホストの反応としてはマイクログリアの増勢とオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖が認められた。これらのデータを基に論文執筆中である。行動実験では、移植後2週間では運動学的スコアの改善が得られたが長期経過観察では、有意な改善は得られなかった。また、臨床研究においては、ロボットスーツを急性期脳卒中患者に装着し、運動機能の改善を検討している。このロボットスーツは、脳から筋肉への生体信号を関知し筋肉の動きをサポートするとともに、脳へのフィードバックをかけ、脳と筋肉への神経回路の再生を図る機能再生医療である。今回、急性期脳卒中患者において、ロボットスーツによる機能再生治療の可能性が示唆されるデータが得られた。今後の展開としては、ヒト iPS 細胞を用いた移植治療を臨床応用するために、大型実験動物の研究を進めるとともに、臨床治験まで含めた中長期のロードマップをすすめていくことが重要であると考えている。また、今回始めた、臨床からのアプローチとしての機能再生医療が、移植による再生を相互作用を発揮して、より効果的な治療

が進むものであると考えている。



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4件)

1. Chihara H, Takagi Y, Nishino K, Yoshida K, Arakawa Y, Kikuchi T, Takenobu Y, Miyamoto S. Factors Predicting the Effects of Hybrid Assistive Limb Robot Suit during the Acute Phase of Central Nervous System Injury. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2016;56(1):33-7.
2. Hermanto, Y., Takagi, Y., Ishii, A., Yoshida, K., Kikuchi, T., Funaki, T., Mineharu, Y., Miyamoto, S. Immunohistochemical Analysis of Sox17 Associated Pathway in Brain Arteriovenous Malformations World

Neurosurgery 87:573-583,2016

3. Hermanto, Y., Takagi, Y., Yoshida, K., Ishii, A., Kikuchi, T., Funaki, T., Mineharu, Y., Miyamoto, S. Histopathological features of brain arteriovenous malformations in Japanese patients Neurologia Medico-Chirurgica 56;6:340-344,2016.
4. Takagi, Y., Hermanto, Y., Takahashi, J.C., Funaki, T., Kikuchi, T., Mineharu, Y., Yoshida, K., Miyamoto, S. Histopathological characteristics of distal middle cerebral artery in adult and pediatric patients with Moyamoya disease Neurologia Medico-Chirurgica 56;6:345-349,2016.

〔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)研究代表者

高木 康志 (TAKAGI, Yasushi)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：40312227

(2)研究分担者

高橋 淳 (TAKAHASHI, Jun)
京都大学・iPS細胞研究所・教授
研究者番号：10270779

森實 飛鳥 (MORIZANE, Asuka)

京都大学・iPS細胞研究所・助教
研究者番号：10528730

荒川 芳輝 (ARAKAWA, Yoshiaki)
京都大学・医学研究科・特定講師
研究者番号：20378649

谷垣 健二 (TANIGAKI, Kenji)
滋賀県立成人病センター・専門研究員
研究者番号：70362473