

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21181

研究課題名(和文)ダイレクトリプログラミング法を用いた新規脳梗塞治療法の開発

研究課題名(英文)Novel Therapeutic Strategy using Direct Reprogramming Methods for Stroke

研究代表者

山下 徹(Yamashita, Toru)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：60644408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経幹細胞特異的な4つの転写因子群をマウス皮膚線維芽細胞に強制発現させることで、神経幹細胞の性質を持つiNS細胞株を誘導した。このiNS細胞株を脳梗塞マウス急性期に細胞移植したところ、運動機能改善効果を示し、長期観察モデルでも腫瘍形成を認めなかった。以上の結果から、ダイレクトリプログラミングで直接的に誘導したiNS細胞株が脳梗塞急性期において治療効果があり、かつ安全性が高いことが示された。

さらに、マウスの初代培養アストロサイトからも神経系細胞が誘導できることも確認できており、今後脳内グリア細胞等を脳内で直接ニューロンへ誘導する技術も検討する予定である。

研究成果の概要(英文)： We investigated the therapeutic effect of iNSC transplantation, and also monitored engrafted iNSCs after transplantation of undifferentiated murine iNSCs in ischemic striatum/cortex of the mouse brain.

We found that iNSC transplantation successfully improved the survival rate of stroke model mice with significant functional recovery from the stroke. The fate of engrafted iNSCs was that the majority of iNSCs had differentiated into astroglial cells but not into neural cells in both the sham-operated brain and the poststroke brain without forming a tumor up to 8 months after tMCAO.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳梗塞 細胞移植 iNS細胞 iPS細胞 ダイレクトリプログラミング

1. 研究開始当初の背景

2006年8月に京都大学山中伸弥教授らによってマウス皮膚線維芽細胞に4つの転写因子 (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc) を強制発現させることで iPS 細胞が誘導できることが発表された。iPS 細胞はほぼすべての組織に分化する‘分化万能性’と無限に増殖できる‘自己複製能’を併せ持つ多能性幹細胞であり、この技術を使うことで患者自身の皮膚細胞から神経系細胞を含む多様な細胞種を誘導でき、脳梗塞やパーキンソン病等で失われた神経細胞を補充する神経細胞移植治療への応用も期待されている。しかしながら iPS 細胞から神経系細胞に分化誘導し移植治療に用いる場合、少しでも未分化な iPS 細胞が残存していると腫瘍形成の可能性があり、臨床応用への大きな障壁であった。この腫瘍化の問題を解決する一つの有力な方法として現在注目されているのが、iPS 細胞を経ずに皮膚細胞から神経系細胞を誘導するダイレクトリプログラミング法と呼ばれる手法である。

本研究では、細胞移植治療への展開を踏まえ、増殖能を持ちながら腫瘍形成のリスクの低いとされる神経幹細胞 (以下 iNS 細胞) を誘導、樹立し、その治療効果と安全性を評価することを目的としている。また同時に転写因子を脳内の細胞に誘導することで直接 iNS 細胞を誘導する *in vivo* ダイレクトリプログラミング法も検討し、細胞移植を行わない再生医療の可能性も探る。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに iPS 細胞の疾患マウスモデルにおける腫瘍形成能の評価系を確立し、ダイレクトリプログラミング法により皮膚線維芽細胞から神経系細胞を直接誘導する実験系を報告した。またすでに、マウス皮膚線維芽細胞より直接的に誘導された神経幹細胞株 (iNS 細胞株) の培養を開始しその増殖能、多分化能を確認してい

る。本研究ではこの神経幹細胞株を脳梗塞などを含む神経疾患への治療応用へ展開することが目的である。計画している具体的な研究項目は、神経幹細胞株を脳梗塞マウスモデルに移植することでその治療効果と Glia-vascular unit への影響の評価、マウス脳細胞に直接転写因子を導入し、直接神経幹細胞を誘導する *in vivo* ダイレクトリプログラミングの検討の2つである。

3. 研究の方法

iNS 細胞株を脳梗塞マウスモデルに移植することでその治療効果と腫瘍形成能を評価した。8-9 週齢オスの C57B6 マウスに 35 分間一過性中大脳動脈閉塞術を行い、その 24 時間後に iNS 細胞株を脳梗塞周辺領域に細胞移植を行った。(iPS 細胞株はレンチウイルスで GFP 標識されたものを用いた。) コントロール群として、中大脳閉塞術を行っていないマウスにも同様の細胞移植を行った。その後、ローターロッド、コーナートテスト等運動機能評価を経時的に行い、28 日後と 8 ヶ月後に還流固定後、免疫組織学的解析を行った。HE 染色と Nissl 染色で梗塞巣体積と腫瘍の有無を評価し、各種細胞マーカーで移植された GFP 陽性細胞がどのような種類の細胞に分化、生着しているかを評価した。

P2 マウス大脳アストロサイトに神経幹細胞特異的転写因子 2 つをレトロウイルスベクターを用いて強制発現させ、その後 3、7、12 日後に固定して免疫染色で神経細胞の有無を評価した。

4. 研究成果

神経幹細胞特異的な 4 つの転写因子群をマウス皮膚線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて強制発現させ、得られた iNS 細胞株は Nestin, Sox2, Olig2 などの神経幹細胞マーカーが陽性であることを

確認した。

また脳梗塞マウスモデルの検討では iNSC 細胞移植群では vehicle 群と比較して、明らかな生存率の改善と運動機能改善効果を認めた。また移植後 8 ヶ月までの間で、その細胞移植群から腫瘍形成は認めないことを確認できた。

P2 マウス大脳アストロサイトに 2 つの転写因子を強制発現させることで、神経系細胞 (iN 細胞) を直接的に誘導できることが明らかになった。ただ Day12 の時点で誘導効率が 3.6% であり、更なる条件の検討が必要と考えている。

以上の実験結果からダイレクトリプログラミングで誘導された iNS 細胞は脳梗塞治療に有効であること、またアストロサイトから直接 iN 細胞を誘導することができることが明らかになった。今後、脳内アストロサイトを直接神経系細胞に誘導する in vivo ダイレクトリプログラミング法の開発を行っていく予定である。

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 6 件)

1. Yamashita T, Liu W, Matsumura Y, Miyagi R, Zhai Y, Kusaki M, Hishikawa N, Ohta Y, Kim SM, Kwak TH, Han DW, Abe K. Novel therapeutic transplantation of induced neural stem cells for stroke. *Cell Transplant*, Cell Transplant, 26, 461-467, 2016. (査読あり)
2. Yamashita T, Abe K. Recent Progress in Cell Reprogramming Technology for Cell Transplantation Therapy. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 56: 97-101 (2016). (査読あり)

3. Zhai Y*, Yamashita T,* Nakano Y, Sun Z, Shang J, Feng T, Morihara R, Fukui Y, Ohta Y, Hishikawa N, Abe K. Chronic Cerebral Hypoperfusion Accelerates Alzheimer's Disease Pathology with Cerebrovascular Remodeling in a Novel Mouse Model. *J Alzheimers Dis*, 53: 893-905 (2016) (* equally contributed). (査読あり)
4. Zhai Y, Yamashita T, Nakano Y, Sun Z, Morihara R, Fukui Y, Ohta Y, Hishikawa N, Abe K. Disruption of White Matter Integrity by Chronic Cerebral Hypoperfusion in Alzheimer's Disease Mouse Model. *J Alzheimers Dis*, 52: 1311-9 (2016). (査読あり)
5. Yamashita T, Abe K. Recent Progress in Therapeutic Strategies for Ischemic Stroke. *Cell Transplant*, 25: 893-8 (2016). (査読あり)

[学会発表](計 1 件)

- 1) 2015. 10.30-31
第 27 回日本脳循環代謝学会 (富山)
山下徹、阿部康二 新規神経幹細胞 (iNSCs) は脳梗塞を治療しうるか?

[図書](計 1 件)

- 1). Yamashita T, Abe K, iPS cells and iN cells, Cell Therapy against Cerebral Stroke 39-46 2017. Springer

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下徹 (Toru Yamashita)
岡山大学大学院医歯薬総合研究科
脳神経内科学 講師
研究者番号： 60644408

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()