

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10852

研究課題名(和文) 幹細胞由来神経細胞移植による脳損傷回復でのパラクライン制御と治療応用

研究課題名(英文) Paracrine control and therapeutic application in recovery of brain damage by stem cell-derived nerve cell transplantation

研究代表者

有光 なぎさ (Arimitsu, Nagisa)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：40408688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：凍結脳損傷モデルマウスでの運動機能障害改善における関連遺伝子の探索を行い見出したパラクライン因子Reelinに着目し、Reelinシグナル経路のアダプター因子である Disabled 1 (Dab1) の自然突然変異マウス由来の神経幹、前駆細胞移植を行い、野生型由来細胞移植と比較した結果、Reelin経路下流の何らかの因子が運動機能回復へ関わることを見出した。

Yotari由来神経幹・前駆細胞と野生型細胞移植を比較し、ラベル化処理を行った細胞の移植マウスでの局在により、移植細胞自身のReelin経路が損傷後の神経移動、神経再生に関わることを見出し、論文に報告した (Arimitsu, 2019)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本解析は運動皮質の脳表損傷片マヒモデルのため損傷部位への移動、層構造形成が見やすい系であり、用いる移植細胞は幹細胞よりもさらに運動神経細胞に近づけた細胞移植で、より移植部位での環境に近づけやすくしている点で細胞移植応用につながる意義がある。さらに、これまで発生過程で主に機能すると考えられていたReelinが成体においても損傷時に再活性化して損傷回復過程で機能する点で注目している因子が分泌性因子であることから、移植法だけでなくとどまらず、外的因子の導入による治療法の検討などを展開できる点に学術的意義、社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We focused on Reelin, a paracrine factor found in the search for related factors in frozen injured brain model mice. We investigated the transplantation of neural stem/progenitor cells of spontaneously mutated mice of Disabled 1 (Dab1), Yotari, which is an adapter factor of Reelin signaling pathway. As a result of comparison with wild-type cell transplantation and Yotari-derived neural stem/progenitor cells, it was found that some factors downstream of the Reelin pathway are involved in the recovery of motor function. The localization and cell feature of labeled cells derived of transplanted cell indicates that the Reelin pathway of transplanted cells themselves is involved in cell migration and nerve regeneration in the injured cortex area. We reported these results in an international journal (Arimitsu, 2019).

研究分野：分子生物学

キーワード：神経 移動 幹細胞 前駆細胞 Reelin 片マヒ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難治性神経疾患に対し、失われた神経を細胞移植により補う再生医療試験が報告され、神経細胞移植が有効であることが示唆されている。神経細胞移植での治療効果を上げるためには、広範囲に渡る損傷部位に対して、移植した細胞が定着し、元のような複雑な高次構造、神経系ネットワークを適切に再構築することが必要と考えられる。そこで、申請者が検討してきた幹細胞由来神経細胞移植実験において移植した細胞が神経損傷部位を再生する際の高次構造形成メカニズムについて解析し、新規再生治療法開発のための基盤となる実験を行うことを目的とし解析を行っている。

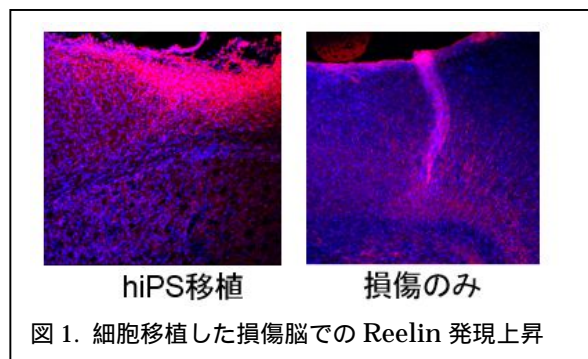
脳神経障害の治療における問題点として、1点目として、治療法の限界が挙げられる。現時点での治療薬としては神経変性の症状の進行抑制を目的とした薬しか存在せず根治的治療法は確立されていない。この点で病因の除去という治療は通用しない。また、発症後の細胞消失の進行機構はまだ不明な点が多く、さらに中枢神経組織は有効な神経再生が生じ難いため、治療及び、発症後期に対する有効な治療法は乏しい。2点目として、他の疾患と異なり、認知症は神経変性に伴い記憶や判断が欠落してしまうため著しく患者個人のQOLの低下と介護者、治療者さらには社会に対しての負担が生じる点である。従って、対症療法ではない治療法の開発が急務である。これまで大脳皮質損傷による運動機能障害や、認知症モデルトランスジェニックマウス、脊髄損傷モデルを用いて幹細胞由来神経細胞移植実験を行う上で、移植する細胞分化状態の検討、細胞形態の検討、移植する場所の検討を行った。

その結果、幹細胞からある程度神経分化させた細胞を移植することで一定の損傷治癒や認知機能改善効果を見出した。さらに適切な神経に分化した細胞シートが作製できることを報告した。これらの細胞は移植後にマウス脳に生着し、運動機能回復や認知機能改善傾向が見られた。今後ヒトや霊長類への応用を考える上で回復メカニズムに対する *in vivo* や細胞レベルでのさらなる検討が不可欠であり今回の研究課題の着想に至った。(参考文献 1, 2, 3, 4)。

1. Fujiwara N, Shimizu J, Takai K, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Cellular and molecular mechanisms of the restoration of human APP transgenic mouse cognitive dysfunction after transplant of human iPS cell-derived neural cells. *Exp Neurol*. 2015; 271: 423-431.
2. Suzuki N, Arimitsu N, Shimizu J, Takai K, Hirotsu C, Takada E, Ueda Y, Wakisaka S, Fujiwara N, Suzuki T. Neuronal cell sheet of cortical motor neuron phenotype derived from human iPS cells. *Cell Transplant*. 2017; 26:1355-1364. doi: 10.1177/0963689717720280.
3. Suzuki N, Shimizu J, Takai K, Arimitsu N, Suzuki T, Fujiwara N. Cellular and molecular mechanisms governing functional recovery of dementia mice after neuronal cell transplantation. *Journal of Neuroscience and Neurosurgery*. 2018; 1: 1-8
4. Iinuma M, Umehara T, Arimitsu N, Shimizu J, Misawa H, Takai K, Fujiwara N, Fujii A, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Hirotsu C, Beppu M, and Suzuki N. Induction of neural cells with spinal motoneuron phenotype from human iPS cells and the transplantation to totally transected spinal cords in mice. *Inflammation and Regeneration*. 2015; 35: 154-163.

2. 研究の目的

大脳皮質は6層構造であり、神経新生が多く起こる海馬歯状回は3層構造である。この層構造形成に発生過程で一過的に関与する因子として分泌性因子 Reelin、SDF1 が知られている。脳損傷マウス脳の発現を調べたところ、成体個体での損傷再生においても、大脳損傷後に損傷部位からの炎症性物質とともに、細胞移動、層構造形成に関する因子 (Reelin、SDF1) の発現上昇が見られた。さらに SDF1、Reelin の発現上昇は損傷後、約1カ月続くが損傷のみのマウスに比べて神経細胞分化させた幹細胞移植したマウスの方が発現増加していた (図 1)。Reelin については予備的知見だが、シグナル伝達経路にあるアダプター蛋白質 Dab1 が移植細胞周辺において増加していた。移植部位に細胞が定着し、損傷部位における神経回路網を回復するには、適切な時間、空間内における細胞の局在と、新規軸索の再伸長とが必要である。これまで中枢神経系への移植細胞の遊走、定着に際し、マウスやサル ES 細胞からの誘導神経細胞の移植実験において、SDF1 等のケモカイン、接着因子が関与している事実を明らかにしているが、発生過程での神経細胞移動制御における Reelin と SDF1 がそれぞれ異なる移動形式をとらせること、また、神経幹細胞に対して SDF1 処理すると Reelin が誘導され細胞の増殖、生存にかかわることが知られている。本研究において移植神経細胞による脳損傷からの回復時に組織での定着、神経回路形成機構において SDF1、Reelin といった分泌性因子が関わるメカニズム

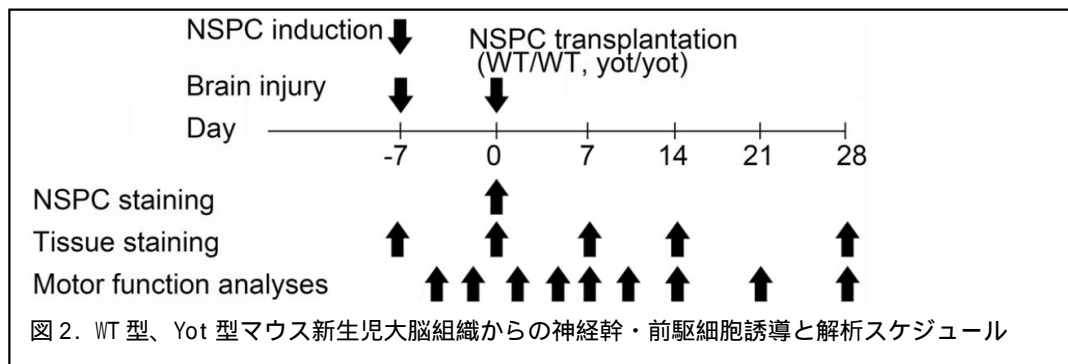


を示し、神経細胞の極性変化、遊走、軸索伸長という再生に関わる機能への量的制御のあり方を見出した後に最終的に安全かつ効果的な投与法の確立を目指した。

3. 研究の方法 動物と NSPC 細胞調製

片マヒ作製マウス及び、移植レシピエントとしては全て C57 black 6 (C57BL/6) mice (6-8 weeks old, Japan SLC, Shizuoka, Japan)を用いた。Reelin 経路が遮断された細胞種を得るため、下流のアダプター因子である Disabled 1 因子が欠失変異した Yotari strain (Yoneshima et al., Neurosci. Res.1997) をバイオリソースセンター (理研) より購入した。全ての外科的介入、術前および術後の動物のケア、安楽死を含むすべての実験手順は、the Care and Use of Laboratory Animals, 8th Edition (National Research Council)、所属大学の Animal Care and Use Committee, St. Marianna University School of Medicine に基づいて行った。実験スケジュールは図 2 に従って行った。片マヒ作製では、C57BL/6 正常マウスに対し、移植の 7 日前に低温損傷を行った。右頭頂骨にプレグマの前方 0.5 mm および外側 2.0 mm の位置にバーホールマークを作成し、液体窒素で冷却した金属プローブを押し当て作製した (図 3、損傷部位と移植部位の模式図と損傷後の出血、変性確認)。

移植用の細胞調製のためにヘテロ接合体の交雑から新生児を集めた。野生型 (WT / WT) とヨタリのホモ接合 (yot / yot) マウスのそれぞれの脳は、単一の細胞懸濁液に分離し EGF、bFGF とともに培養することでニューロスフィア作製した (Pacey et al., Nat. Protoc. 2006)。各個体の一部分をタイピングし、野生型、yot/yot 細胞種を同定した。一週間後ニューロスフィアは、TryPLE によって単一細胞懸濁液に再度調製し、CMDil にてラベルし、野生型、yot/yot 細胞それぞれ (5.0×10^5) を片マヒマウスの線条体に移植した。それぞれの細胞の特性を調べるため、移植日にサイトスピンした細胞サンプルに対し、Reelin 関連抗体や、接着因子、神経



マーカーを用い染色した。さらに神経分化刺激試薬 iwp, cyp を用い神経細胞への分化を行い、抗体染色により細胞形態、分化を解析した。

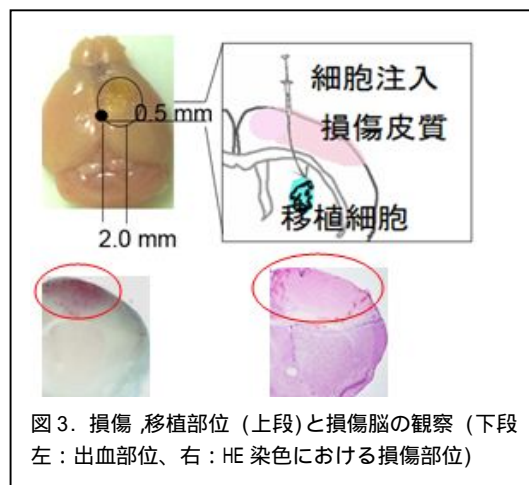
運動機能の評価系として、Rota-rod 法、Beam walking 試験を行った。

モデルマウスに移植した移植細胞による再生における神経回路構築

移植した細胞がレシピエント内でどのような分子を発現し移植環境と神経ネットワークを形成しているのかについて移植後マウスは経時的に、ペントバルビタール大量投与により安楽死させたマウスを PBS, 4% パラフォルムアルデヒドの心臓還流によって固定した。さらにクリオスタットにより $30 \mu\text{m}$ の切片を作成し、移植神経細胞の局在と分化させた細胞の性質を組織免疫染色により経時的に確認した。皮質損傷モデルでの損傷部位における神経細胞の分布割合の変化、神経再生に関わる分泌性因子の候補としての Reelin の発現変動を解析した。さらに Yotari 由来神経幹・前駆細胞と野生型細胞移植を比較し、ラベル化処理を行った細胞の移植マウスでの局在を解析した。

4. 研究成果

4-1: 移植約 2 週前に片マヒ予定マウスの運動訓練を行い、訓練できたマウスのみを片マヒマウスに使用した。移植 7 日前に野生型マウスの片麻痺処理を行い、Rotrod, beam walking test により片マヒが維持されることを確認した (図 3、片マヒ後の出血および変性確認、運動機能評価については図 5 beam walking のみ表示、day-5, -2)。同時期に WT / WT マウスと yot / yot マウスの新生児脳からニューロスフィアを作製した。0 日目 (移植日) ニューロスフィアは単一細胞に酵素処理され、WT / WT NSPC および yot / yot NSPC を線条体にそれぞれ移植した (図 3、模式図移植部位)。移植に用いた細



胞一部はサイトスピンされ、免疫細胞化学によって特徴を確認した(図4)。pDab1 タンパク質を発現する細胞の割合は、WT / WT NSPC 全体の $22.2 \pm 2.5\%$ でした。yot / yot NSPC は pDab1 を発現しなかった。WT / WT NSPC 全体に対するアクティブなインテグリン 1 タンパク質を発現する NSPC の割合は、 $8.5 \pm 6.9\%$ で、yot / yot NSPC は、活性インテグリン 1 を発現しなかった(図4)。神経細胞分化条件にてさらに培養すると yot 細胞は神経細胞分化の割合が減少した。

4-2: WT / WT NSPC の移植による片マヒマウスの運動機能の改善

NSPC 移植のある場合とない場合の片マヒマウスの運動機能を評価するために、-5 日目から 28 日目まで Beam walking test, Rotarod test (図5, rotarod test は data not shown) を行った。WT / WT NSPC 移植片マヒマウスの運動機能は、yot / yot NSPC 移植マウスの運動機能と比較して大幅に改善された。yot / yot 由来の NSPC 移植マウスの運動機能は、PBS 注射マウスの運動機能と比較するとわずかに改善された。死亡率は、移植前日および移植後のすべての負傷したマウスでそれぞれ 4.0% および 1.0% でした。死亡率と体重変化は 3 つのマウスグループ間で有意差はなかった (WT / WT NSPC 移植、yot / yot NSPC 移植、および PBS 注射マウス)。

4-3: 損傷した運動皮質への移植された NSPC の直接的な移動

WT / WT および yot / yot NSPC の移植後、損傷した脳の組織学的分析を行った。細胞に蛍光赤を標識する CMDiI を使用して、細胞の局在を決定した。移植された WT / WT NSPC は、移植部位から上方に移動し、7 日目に脳梁に近づき、14 日目にそれを横切った(図6)。28 日目に、WT / WT NSPC は損傷した運動皮質の周囲に広く分布した。損傷した皮質の有核細胞全体 (DAPI 陽性細胞) における CMDiI 陽性 WT / WT 細胞の割合は、観察期間を通じて大幅に増加した(図6, cortex)。注入された線条体の有核細胞全体における WT / WT 細胞の割合は、観察期間を通じて実質的に減少した(図6, striatum)。損傷した皮質の有核細胞全体における CMDiI 陽性の yot / yot 細胞の割合は、観察期間を通じて低いままであった(図6)。これらの結果は、yot / yot NSPC の移行能力が低いことを示唆する。

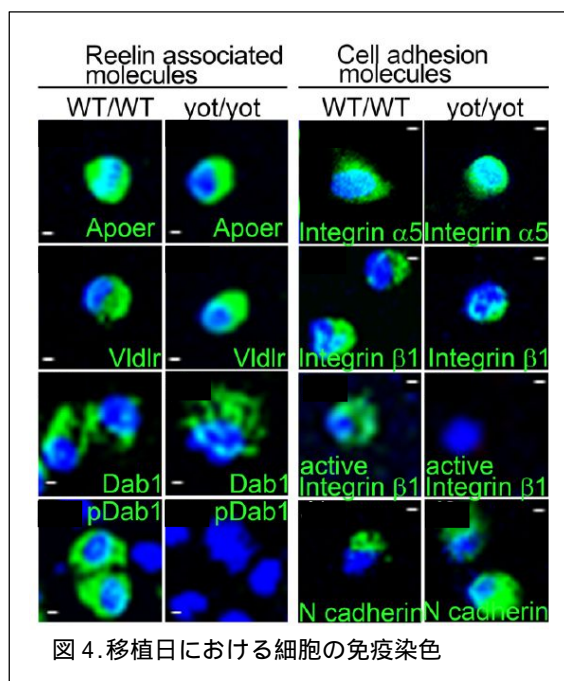


図4. 移植日における細胞の免疫染色

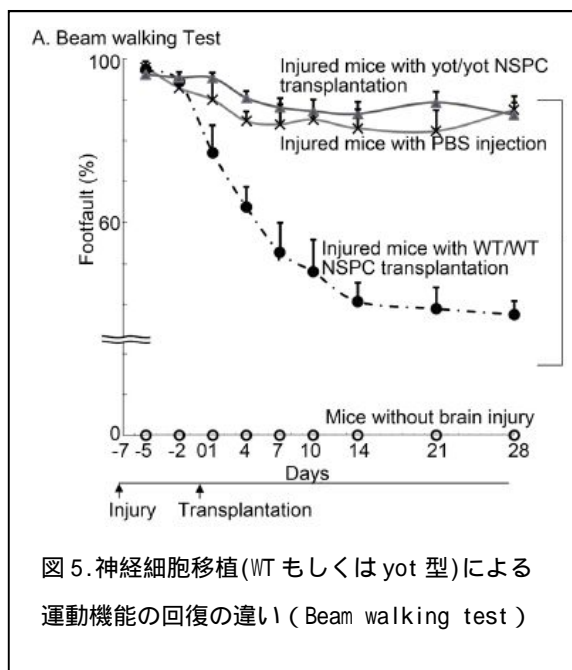


図5. 神経細胞移植(WT もしくは yot 型)による運動機能の回復の違い (Beam walking test)

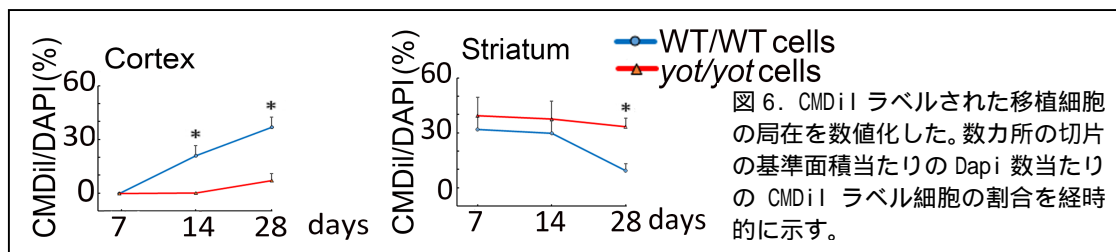


図6. CMDiI ラベルされた移植細胞の局在を数値化した。数カ所の切片の基準面積当たりの Dapi 数当たりの CMDiI ラベル細胞の割合を経時的に示す。

Reelin は受容体 (Apoer および Vldlr)、Dab1、キナーゼ (MEK, ERK) 経路を介してニューロンのシナプス機能を調節し (Trotter et al., J. Neurosci. 2013)、下流の細胞接着分子である Ncadherin および Integrin α 5 β 1 (Franco et al., Neuron 2011) を介した神経幹細胞の移動に不可欠である。以上より運動機能回復において Reelin を介したシグナル経路が神経細胞の遊走だけでなく、運動神経分化に関わり機能することが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Suzuki N, Shimizu J, Takai K, Arimitsu N, Suzuki T, Fujiwara N.	4. 巻 1
2. 論文標題 Cellular and Molecular Mechanisms Governing Functional Recovery of Dementia Mice after Neuronal cell Transplantation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience and Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31021/jnn.20181103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Maruyama T, Baba T, Maemoto Y, Hara C, Okano JH, Enda Y, Matsumoto K, Arimitsu N, Nakao K, Hamamoto H, Sekimizu K, Tagaya M, Tani K	4. 巻 9
2. 論文標題 Loss of DDHD2, whose mutation causes spastic paraplegia, promotes reactive oxygen species generation and apoptosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death and Disease	6. 最初と最後の頁 797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-018-0815-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu J, Kubota T, Takada E, Takai K, Fujiwara N, Arimitsu N, Murayama MA, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N	4. 巻 20
2. 論文標題 Propionate-producing bacteria in the intestine may associate with skewed responses of IL10-producing regulatory T cells in patients with relapsing polychondritis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0203657
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0203657. eCollection 2018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki N, Arimitsu N, Shimizu J, Takai K, Hirotsu C, Ueda Y, Wakisaka S, Fujiwara N, Suzuki T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Neuronal cell sheets of cortical motor neuron phenotype derived from human iPS cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Transplant.	6. 最初と最後の頁 1355-1364.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1177/0963689717720280.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomochika K, Arimitsu N, Murayama MA, Hirotsu C, Nagata K, Takai K, Shimizu J, Akazawa T, Torii Y, Umehara T, Iinuma M, Niki H, Suzuki N.	4. 巻 10
2. 論文標題 Transplantation of Human iPS Cell-Derived Neural Cells with an Artificial Nerve Conduit Leads to Cellular Retention in the Transplanted Area and Improves Motor Function in a Mouse Spinal Cord Injury Model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 St. Marianna Med. J.	6. 最初と最後の頁 27-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arimitsu Nagisa, Takai Kenji, Fujiwara Naruyoshi, Shimizu Jun, Ueda Yuji, Wakisaka Sueshige, Hirotsu Chieko, Murayama Masanori A., Suzuki Tomoko, Suzuki Noboru	4. 巻 320
2. 論文標題 Roles of Reelin/Disabled1 pathway on functional recovery of hemiplegic mice after neural cell transplantation; Reelin promotes migration toward motor cortex and maturation to motoneurons of neural grafts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 112970 ~ 112970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2019.112970	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Jun, Suzuki Tomoko, Hirotsu Chieko, Ueno Hiroki, Takada Erika, Arimitsu Nagisa, Ueda Yuji, Wakisaka Sueshige, Suzuki Noboru	4. 巻 14
2. 論文標題 Interaction between SDF1 and CXCR4 Promotes Photoreceptor Differentiation via Upregulation of NF B Pathway Signaling Activity in Pax6 Gene-Transfected Photoreceptor Precursors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ophthalmic Research	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000503929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Nagisa Arimitsu, Jun Shimizu, Kenji Takai, Naruyoshi Fujiwara, Chieko Hirotsu, Yoko Okada and Noboru Suzuki
2. 発表標題 NEURAL REGENERATION MECHANISMS IN TRANSPLANTATION OF NEURONAL CELLS DERIVED FROM HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS WITH THE EFFECT OF THEIR PARACRINE SECRETION.
3. 学会等名 International society for stem cell research 14th annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nagisa Arimitsu-Nakata, Chieko Hirotsu, Kenji Takai, Jun Shimizu, Naruyoshi Fujiwara, Yoko Okada, Noboru Suzuki
2. 発表標題 Neural regeneration after transplantation of Neuronal cell sheet of cortical motor neuron phenotype.
3. 学会等名 the 5th TERMIS-WC 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nagisa Arimitsu, Jun Shimizu, Kenji Takai, Naruyoshi Fujiwara, Chieko Hirotsu, Yoko Okada, and Noboru Suzuki.
2. 発表標題 Reelin Signal Activation is Associated With Motor Function Recovery in the Neuron Transplantation of Hemiplegic Mice.
3. 学会等名 the 51st Winter Conference on Brain Research (WCBR) . Whistler Canada 14-19 January 2018. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nagisa Arimitsu, Kenji Takai, Chieko Hirotsu, Jun Shimizu and Noboru Suzuki.
2. 発表標題 Motor function recovery in hemiplegic mice after neural stem / progenitor cells transplantation, International society for stem cell research 15th annual meeting.
3. 学会等名 International society for stem cell research 2019 annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考