

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 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 ～ 2011

課題番号：20390382

研究課題名（和文）

胚性幹細胞および骨髄間質細胞より誘導した神経幹細胞を利用した脳梗塞治療の開発

研究課題名（英文）

Stroke therapy using embryonic stem cells and bone marrow stromal cell-derived neural stem cells

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

研究成果の概要（和文）：

ラット骨髄間質細胞より、神経幹細胞様細胞を分化させて脳梗塞モデルに移植、細胞の生着と行動の改善を確認した。またマウス ES 細胞を S 分化させ神経幹細胞のマーカーで sorting を行い、回収した細胞を脳虚血モデルに移植し腫瘍形成を解析。腫瘍形成能、生存率の改善および運動機能の改善を確認した。さらに iPS 細胞から神経幹細胞を誘導、脳虚血モデルに移植し、細胞の生着と運動機能の改善を確認した。そして ES 細胞より誘導した神経幹細胞の移植における IL-6 抗体の影響を解析した。腫瘍形成抑制や、臨床応用可能な骨髄モデルの応用など大きな進歩があった。

研究成果の概要（英文）：

Bone marrow stromal cells (MSCs) are an excellent source of cells for treating a variety of central nervous system diseases. We report the efficient induction of committed neural progenitor cells from rat and human MSCs (NS-MSCs) by introduction of cells with the intracellular domain of Notch-1 followed by growth in the free-floating culture system. To determine the therapeutic potential of NS-MSCs, cells were transplanted into the cortex and striatum in a rat model of focal cerebral ischemia. The survival, distribution, and integration of NS-MSCs in the host brain were very high, and at day 100, grafted NS-MSCs were positive for dopaminergic, glutamatergic, and gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic neuronal markers. They extended long neurites for nearly 6.3 mm and many of these expressed synaptophysin. Significant behavioral recovery was also observed in limb-placing and water-maze tests.

To establish cell therapy for cerebral ischemia using embryonic stem (ES) cells, which have self-renewing and pluripotent capacities, we induced the differentiation of the neural progenitors from mouse ES cells using the serum-free suspension culture method and confirmed the expression of various basal ganglial neuronal markers and neurotransmitter-related markers both in vitro and in vivo, which was thought to be suitable for replacing damaged striatum after middle cerebral artery occlusion. We purified the progenitors expressing the neural progenitor marker Sox1 by fluorescence-activated cell sorting and Sox1-positive neural progenitors prevented tumor formation in ischemic brain for 2 months. We also analyzed survival and differentiation of transplanted cells and functional recovery from ischemic damage.

Induced pluripotent stem (iPS) cells possess the properties of self-renewal and pluripotency, similar to embryonic stem cells. They are a good candidate as a source of suitable cells for cell replacement therapy. In this study, we transplanted human iPS cell-derived neural progenitors into an ischemic mouse brain. Human iPS cells were differentiated into neuronal progenitors by serum-free culture of embryoid body-like aggregates (SFEBS). Donor cells were transplanted into the ischemic lateral striatum

1week after ischemia induction. Cells survived at the transplantation site, with migration of a proportion of cells along the external capsule and corpus callosum. Behavioral recovery was significantly enhanced in the transplanted group. Our results suggest that human iPS cell-derived neuronal progenitors survive and migrate in the ischemic brain, and contribute toward functional recovery via neural circuit reconstitution.

Safe and efficient transplantation of embryonic stem (ES) cells to the brain requires that local inflammatory and immune responses to allogeneic grafts are inhibited. To investigate cytokines that affect graft cell survival and differentiation, we used stromal cell-derived inducing activity to induce the differentiation of neural progenitor cells (NPCs) from mouse ES cells and transplanted the NPCs into mouse brain. Examination of surrounding brain tissue revealed elevated expression levels of interleukin (IL)-1 β , IL-4, and IL-6 in response to NPC transplantation. Among these, only IL-6 reduced neuronal differentiation and promoted glial differentiation in vitro. When we added anti-IL-6 receptor antibodies to NPCs during transplantation, this single and local blockade of IL-6 signaling reduced the accumulation of host-derived leukocytes, including microglia. Furthermore, it also promoted neuronal differentiation and reduced glial differentiation from the grafted NPCs to an extent similar to that with systemic and continuous administration of cyclosporine A. These results suggest that local administration of anti-IL-6 receptor antibodies with NPCs may promote neuronal differentiation during the treatment of neurological diseases with cell replacement therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳梗塞、神経幹細胞、骨髄間質細胞、胚性幹細胞、移植

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3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

たらず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京都大学医学研究科生体構造医学講座機能微細形態学教室と協力し、骨髄間質細胞から神経幹細胞を誘導し脳虚血モデルに移植する実験を行っている。これら ES 細胞由来神経幹細胞、骨髄間質細胞由来神経幹細胞を用いた脳虚血に対する移植の問題点を解決し、いち早い臨床応用を目指す研究とする。

2. 研究の目的

ES 細胞由来神経幹細胞移植における問題点としては、①SDIA 法によるマ

ウス細胞の混入、②腫瘍形成の可能性が挙げられる。①については、新たな分化方法である SFEB 法 (serum-free suspension culture) を応用することによって解決できる可能性がある。ただしこの方法は霊長類 ES 細胞では確立されておらず、系の確立が必要である。また②の腫瘍形成においても神経幹細胞のマーカーである NCAM や Sox-1 を使った FACS scan にて解決できる可能性があり、こちらも霊長類細胞における確立が必要である。骨髄間質細胞による移植に関しては、遺伝子操作が伴うためこれを伴わずに神経幹細胞を誘導する方法の確立が必要である。そして、いずれ細胞の移植にしても、移植の時期、細胞数、免疫抑制の有無、長期間の移植細胞生着の確認が必要である。また、完全に中大脳動脈領域が欠損する永久中大脳動脈閉塞モデルと血流が維持される一過性中大脳動脈閉塞モデルとでは、移植片が生着する環境が変わっているはずで、細胞移植がどのような症例に効果があるのかを明らかにする意味でも、移植片の生着、分化における脳血流量の意義も明らかにする必要がある。これらの実験を行い次世代の臨床応用につなげたい。

3. 研究の方法

(1) 細胞移植に用いるのは以下の 4 種類の細胞を考えている。これらの細胞からの神経幹細胞を誘導する方法として以下を考えている

① マウス ES 細胞：SFEB 法によってマウス feeder 細胞を除いた培養を行う。神経幹細胞を選択的に回収し移植を行うために Sox-1、NCAM、Musashi-1 などの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。

② ヒト ES 細胞：初年度はヒト ES 細胞を従来の SDIA 法で神経幹細胞に分化させ neurosphere を形成させて移植実験に用いる。ヒト ES 細胞を使った FACS sorting system はまだ確立されておらず、京都大学再生医科学研究所と共同で開発を進める。

③ ラット骨髄間質細胞由来神経幹細胞

胞：骨髄間質細胞にリポフェクション法により Notch-intracellular domain (ICD)を細胞内へ導入し神経幹細胞に誘導する。誘導された神経幹細胞を neurosphere の形で培養し移植実験に用いる。

(2) 虚血モデルとして以下のモデルを考えている。

① 一過性マウス、ラット中大脳動脈閉塞モデル：C57/Bl6 mouse(25-30g)を用い、シリコンコーティングを行った 8-0 Nylon をレーザードップラーモニター下に内頸動脈内へ挿入し中大脳動脈起始部を閉塞する。今回一過性閉塞は梗塞の範囲を変えるのみならず、梗塞巣形成後も血流が維持されるモデルとして使用する。

(3) 行動学的評価：マウス、ラットにおいては、Rota-Rod test, Cylinder test, Water maze test を行う。また神経学的スコアによる解析を行う。

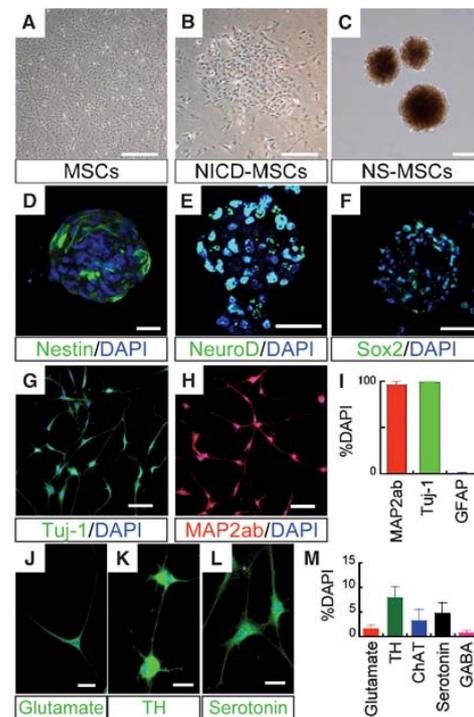
① マウス ES 細胞を SFEB 法で分化させ神経幹細胞のマーカーで FACS sorting を行い、viability や回収効率など至適条件を検討する。回収した細胞を脳虚血モデルに移植し腫瘍形成を解析する。また PET,MRI による個体を生かしたままで腫瘍形成、生着を評価できるシステムを構築する。幹細胞のマーキングには Fe パーティクルを用い、細胞のトラッキングができるシステムを作る

② マウスモデルを用いて移植生着を向上させる添加薬剤の検討を行う。候補としては 1. サイトカインを最初の候補とする 2. apoptosis 制御物質 (caspase inhibitor,抗酸化物質) これらの薬剤は申請者はすでに脳虚血実験にて使用してきており、すぐに移植実験に応用可能である。

4.研究成果

ラット骨髄間質細胞より、Notch intracellular domain を transfection し、floating culture を行うことにより神経幹細胞様細胞を分化させることができ

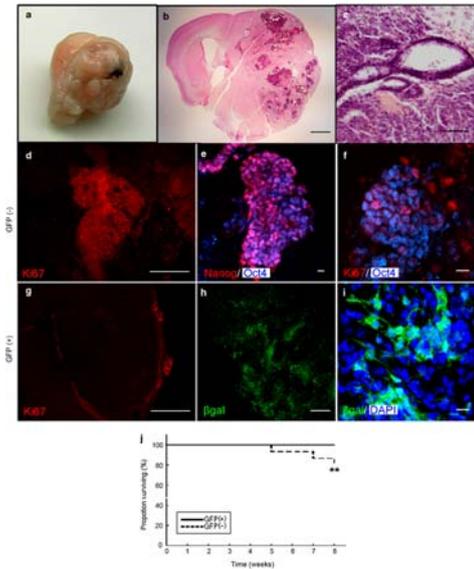
た。この細胞をラット脳梗塞モデルに移植、細胞の生着と行動の改善を確認した。移植後三ヶ月間、細胞は生着し、行動学的にも機能改善が認められた。この結果は JCBF&M 誌に掲載された。



Neuronal induction from marrow stromal cells (MSCs). (A-C) Phase-contrast images of rat cells. After Notch intracellular domain (NICD) transfection, original naive MSCs (panel A) changed their morphology (NICD-MSCs, panel B). Panel C represents spheres made from NICD-MSCs (referred to as NS-MSCs) on a low cell-binding dish. (D-F) Expression of nestin (panel D), NeuroD (panel E), and Sox2 (panel F) in rat NS-MSCs. (G and H) β -tubulin isotype III (Tuj-1) (panel G) and microtubule associated protein 2 (MAP2ab)-positive (panel H) neuron-like cells differentiated from rat NS-MSCs. (I) The proportions of rat cells expressing neural markers. (J-L) Expression of glutamate (panel J), tyrosine hydroxylase (TH) (panel K), and serotonin (panel L) in neuron-like cells derived from rat NS-MSCs spheres. The proportions of cells expressing neurotransmitter-related markers in rat cells (M). Scale bars=250 μ m (panels A and B), 100 μ m (panel C), 50 μ m (panels D-F), 20 μ m (panels J-L).

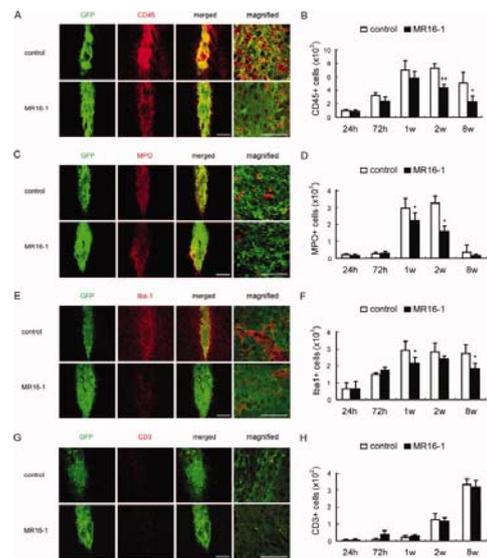
またマウス ES 細胞を SFEB 法で分化させ神経幹細胞のマーカー SOCS1 で FACS sorting を行い、viability や回収効率など至適条件を検討。回収した細胞を脳虚血モデルに移植し腫瘍形成を解析。腫瘍形成能、生存率の改善および細胞の生着と運動機能の改善を確認した。以上の結果は、Lab Invest 誌に掲載され

た。



In vivo teratoma formation after transplantation. In the green fluorescent protein (GFP)-negative group, relatively large intracerebral tumors, which could cause cerebral herniation, were observed 8 weeks after transplantation (a, b). Histological analysis indicated that these cells (c) were co-stained with the undifferentiated embryonic stem (ES) cell markers, Oct4 and Nanog, and the proliferation marker Ki67, and were diagnosed as immature teratoma (d-f). In the GFP-positive group, clusters of undifferentiated cells were scarcely detected (g). The β galactocerebrosidase (β gal)-positive grafted cells within the cerebral ischemia had large cell bodies and extended axons (h, i). Kaplan-Meier analysis revealed a significantly higher survival rate in the GFP-positive group than in the GFP-negative group (j). Scale bar: b, d, g and h, 1 mm; c, 100 μ m; e, f and i, 10 μ m. ** $P < 0.01$.

さらにiPS細胞からSFEB法で神経幹細胞を誘導、脳虚血モデルに移植し、細胞の生着と運動機能の改善を確認した。以上の結果はBrain Res誌に掲載された。ES細胞より誘導した神経幹細胞の移植におけるIL-6抗体の影響を解析、IL-6抗体により拒絶反応の抑制、神経分化の促進が起こることを確認した。以上についてはJ Neurosci Res誌に掲載された。



Reduced inflammatory and immune responses in the presence of MR16-1. Immunofluorescence images of CD45⁺ (A), MPO⁺ (C), and CD3⁺ (G) cells at 2 weeks and Iba-1⁺ (E) cells at 8 weeks with or without MR16-1 treatment. The numbers of CD45⁺ (B), MPO⁺ (D), Iba-1⁺ (F), and CD3⁺ (H) cells in and around the graft at different time points are presented as mean \pm SEM (n = 5 for each group). At each time point, two values were compared (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control samples, *t*-test). Scale bars = 300 μ m; 50 μ m in magnified images.

以上の研究から、霊長類モデルでの安全性確認実験が今後必要ではあるが、腫瘍形成や、臨床応用可能な骨髄モデルの応用など大きな進歩が認められた。また、申請時には考えられなかったiPS細胞研究の発展があり、この方面での研究の進歩も達成可能であった。

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 11 件) (全て査読有)

1. Fujimoto M, Hayashi H, Takagi Y, Hayase M, Marumo T, Gomi M, Nishimura M, Kataoka H, Takahashi J, Hashimoto N, Nozaki K, Miyamoto S. Transplantation of telencephalic neural progenitors induced from embryonic stem cells into subacute phase of focal cerebral ischemia. Lab Invest. 2012 Apr;92(4):522-31. doi: 10.1038/labinvest.2012.1. Epub 2012 Feb 13.
2. Gomi M, Takagi Y, Morizane A, Doi D, Nishimura M, Miyamoto S, Takahashi J.

- Functional recovery of the murine brain ischemia model using human induced pluripotent stem cell-derived telencephalic progenitors. *Brain Res.* 2012 Jun 12;1459:52-60. Epub 2012 Mar 28.
3. Doi D, Morizane A, Kikuchi T, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T, Motono M, Sasai Y, Saiki H, Gomi M, Yoshikawa T, Hayashi H, Shinoyama M, Refaat MM, Suemori H, Miyamoto S, Takahashi J. Prolonged maturation culture favors a reduction in the tumorigenicity and the dopaminergic function of human ESC-derived neural cells in a primate model of Parkinson's disease. *Stem Cells.* 2012 May;30(5):935-45. doi: 10.1002/stem.1060.
 4. Morizane A, Takahashi J. [A challenge towards the clinical application of induced pluripotent stem cell technology for the treatment of Parkinson's disease]. *Brain Nerve.* 2012 Jan;64(1):29-37. Review. Japanese.
 5. Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Nishimura K, Takahashi J. Small-molecule inhibitors of bone morphogenic protein and activin/nodal signals promote highly efficient neural induction from human pluripotent stem cells. *J Neurosci Res.* 2011 Feb;89(2):117-26. doi: 10.1002/jnr.22547. Epub 2010 Dec 8.
 6. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong H, Nakagawa M, Tanabe K, Tezuka K, Shibata T, Kunisada T, Takahashi M, Takahashi J, Saji H, Yamanaka S. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods.* 2011 May;8(5):409-12. Epub 2011 Apr 3.
 7. Fujimoto M, Takagi Y, Muraki K, Nozaki K, Yamamoto N, Tsuji M, Hashimoto N, Honjo T, Tanigaki K. RBP-J promotes neuronal differentiation and inhibits oligodendroglial development in adult neurogenesis. *Dev Biol.* 2009 Aug 15;332(2):339-50. Epub 2009 Jun 6.
 8. Hayase M, Kitada M, Wakao S, Itokazu Y, Nozaki K, Hashimoto N, Takagi Y, Dezawa M. Committed neural progenitor cells derived from genetically modified bone marrow stromal cells ameliorate deficits in a rat model of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009 Aug;29(8):1409-20. Epub 2009 May 13.
 9. Zhou F, Gomi M, Fujimoto M, Hayase M, Marumo T, Masutani H, Yodoi J, Hashimoto N, Nozaki K, Takagi Y. Attenuation of neuronal degeneration in thioredoxin-1 overexpressing mice after mild focal ischemia. *Brain Res.* 2009 May 26;1272:62-70. Epub 2009 Mar 25.
 10. Nakamura J, Fujimoto M, Yasuda K, Takeda K, Akira S, Hatayama T, Takagi Y, Nozaki K, Hosokawa N, Nagata K. Targeted disruption of Hsp110/105 gene protects against ischemic stress. *Stroke.* 2008 Oct;39(10):2853-9. Epub 2008 Jul 24.
 11. Fujimoto M, Takagi Y, Aoki T, Hayase M, Marumo T, Gomi M, Nishimura M, Kataoka H, Hashimoto N, Nozaki K. Tissue inhibitor of metalloproteinases protect blood-brain barrier disruption in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008 Oct;28(10):1674-85. Epub 2008 Jun 18.
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・再生医科学研究所・教授
研究者番号：10270779