

## 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 5 月 23 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591419

研究課題名（和文）脳室周囲白質軟化症モデルにおける臨床使用薬剤の効果とエリスロポエチン併用療法

研究課題名（英文）Effect of erythropoietin and clinical-used drug in periventricular leukomalasia

研究代表者

水野 恵介（MIZUNO KEISUKE）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：00405177

研究成果の概要（和文）： 早産児に発症する脳性麻痺の主原因となる脳室周囲白質軟化症（PVL）のモデルラットが、PVL 障害後の運動機能の評価から長期 PVL モデル動物として適していることが明らかになった。マウス ES/iPS 細胞からオリゴデンドロサイト系譜への分化誘導が in vitro で可能となり、SSEA-1 陽性の未分化細胞の除去法も明らかにした。PVL モデル動物への幹細胞移植を実施し、白質内で移植細胞の生存が良いことを示すとともに、より良く生存を促進させる工夫が今後必要であることも明らかになってきた。

研究成果の概要（英文）： It was revealed by the assessment of motor functions (rotarrod, motor deficit score and cylinder test) that a rat model of periventricular leukomalasia (PVL) is appropriate to the model for a longer time. It became possible to induce oligodendrocytes and its progenitors (OPC) from mouse ES cells/iPS cells in vitro as the donor cells to PVL. In transplantation of iPS cells-derived OPC to PVL model rat, grafted cells can survive well in the white matter, revealing that some substances such as trophic factors will be needed for better survival rate.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：脳性麻痺、長期モデル、iPS 細胞、神経系分化誘導、細胞移植、前駆細胞

## 1. 研究開始当初の背景

治療技術の進歩に伴い未熟児の救命率は向上しているが、急性期の循環／呼吸不全による低酸素虚血と中枢神経系の未熟性が重なり、在胎週数 23-32 週の出生児に脳室周囲白質軟化症（PVL）という不可逆な脳傷害が誘発され、脳性

麻痺に陥るケースが多いことが大きな問題となっている。

PVL の病因として、（1）解剖学的な血行最遠部が虚血の影響を最も強く受けること、（2）子宮内感染を原因とするリポポリサッカライド細胞毒性が関与していること、（3）白質を構成す

るオリゴデンドロサイト (OLG) の正常発達の過程に出現する後期 OL 前駆細胞 (preOLs : NG2 および O4 抗原陽性、O1 抗原陰性) が選択的に低酸素虚血に対し脆弱性が高いこと、が関与していると知られる。近年、23-32 週に出生し PVL と診断された未熟児の病理標本から、この時期に認められる PVL の主たる病因として preOLs の選択的脆弱性が示された。すなわち、preOLs の選択的脆弱性を考慮した新たなモデル動物の作成が必要と考えられた。(未熟児型 PVL モデル)

申請者らは、低出生体重時のPVLの発症予防および治療法の開発を最終目標とし、まずpreOLsの選択的脆弱性を病因とする新たなPVLモデル動物の開発に取り組み、これまでにP3ラットにおける右総系動脈閉塞と6%酸素1時間の低酸素虚血により未熟児型PVLモデルラットが作成できることを報告した。さらに細胞保護作用を有するエリスロポイエチン(EPO)の低濃度投与(50~100 U/kg)により、未熟児型PVLモデルに特徴的な組織障害が軽減することを報告した。(Neonatology 94: 255-266, 2008)

未熟児に好発するPVLに対する有効な治療法の開発に向け、以下のような基礎的課題の解決が残されていた。

- (1) 我々が開発した未熟児型PVLモデルが、長期モデル動物として適しているのか。
- (2) 細胞保護作用を有する臨床使用薬剤が未熟児型PVLモデルに対し有効か。
- (3) ES/iPS細胞の幹細胞からオリゴデンドロサイト(OLG)系譜へ分化させた細胞の補充療法(より積極的な治療)の可能性はあるのか。

## 2. 研究の目的

PVLへの有効な治療法開発に向け、以下1-4の課題に取り組むことを目的とした。結果として、主に1と4の課題に取り組んだ。

- (1) 未熟児型PVLモデルが、運動機能および認知機能の障害という側面からもモデル動物として適しているのかどうか。
- (2) 細胞保護作用を有する他の臨床使用薬剤が、EPO同様に未熟児型PVLモデルに対して効果を有するか否か。
- (3) 有効な薬剤の併用療法がより良い効果を示すのかどうか。副作用の有無の検討。
- (4) ES/iPS細胞などの幹細胞からOLG系譜細胞

へ分化させた細胞を外部より移植する等の細胞補充療法(より積極的な治療)の可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) PVL モデルラットの作成

生後3日齢のWistarラットを用い、右総頸動脈の閉塞および2時間後に6%酸素1時間の低酸素負荷を与え、未熟児型PVLモデルを作成した。

### (2) 行動評価

#### ① ロタロッドテスト

毎分4回のスピードで回転するロタロッド上に動物をおき、1分間で毎分40回のスピードとなるように加速度を与える。3回テストを行い、落下するまでの時間をデータとした。

#### ② Motor Deficit Score (MDS)

我々が用いてきた方法により(Masuda, Hida et al, J. Neurosci. Res 85: 213-22, 2007)、障害側への自発回転、上肢把握、下肢引き戻し、棒上歩行、の4項目について、正常: 0、軽度: 1、中等度: 2、重度: 3、最重症: 4の5段階で評価した。

#### ③ シリンダーテスト

ラットを直径20cm高さ30cmの透明な円形の小空間にいれ、5分間の行動をビデオ撮影した。立ち上がり行動(rearing)、壁に上肢をつく回数、下肢に体重がかかる立ち上がり時のふらつき回数を測定した。

### (3) 幹細胞の分化誘導法

#### ① 神経幹細胞 (NSC) への分化誘導

ES細胞を接着細胞として培養し、三胚葉由来の細胞を含む胚葉体(EB)を形成させる。レチノイン酸で4日間刺激した後に、線維芽細胞増殖因子(FGF2)の存在下で一週間培養を続けると神経幹細胞からなる細胞集団を確認できる(一次 sphere)。一次 sphere を一旦分散し再び FGF2 の存在下で一週間培養を続けると神経幹細胞からなる細胞集団を確認できる(二次 sphere)。

#### ② OLG 系譜細胞への分化誘導

McKay らの報告にあるドパミン神経への分化誘導法(Nature Biotech 18: 675-9; 2000)に従い、ES細胞(第一段階)からEBを形成し(第2段階)、ネスチン陽性神経上皮細胞(NSC)の選別(第3段階)とNSCの増殖(第

4段階)を行った。その後、OLGへの培養法(J Neurosci Meth 149: 50-6, 2005)を応用し分化誘導させた。すなわち、FGF-2およびEGF存在下で、接着性のA2B5陽性NG2陰性のグリア前駆細胞へ誘導(第5段階)、Neurobasal, B27, およびPDGF+FGF-2存在下でA2B5陰性NG2陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞(O-2A細胞)へ分化(第6段階)、CNTF+T3存在下でOLGへ分化誘導(第7段階)を行う7段階のステップにより分化させた。

#### (4) 細胞の移植

マウスES細胞から分化誘導させたEGFP標識神経幹細胞を、帯状回近傍部、線条体外包境界部、脳梁下部の3箇所細胞移植した。これにより、移植後のEGFP陽性細胞を比較検討することから最適移植部位を調べた。

また、PVLモデル動物への移植では、ES細胞/iPS細胞由来の神経幹細胞およびpreOLsを脳梁部へ細胞数20万/2 $\mu$ lの濃度で移植した。

### 4. 研究成果

#### (1) 長期モデルとして検討

##### ① 運動機能評価

生後60日にロタロッドおよびMDSにより運動機能を評価した(図1)。

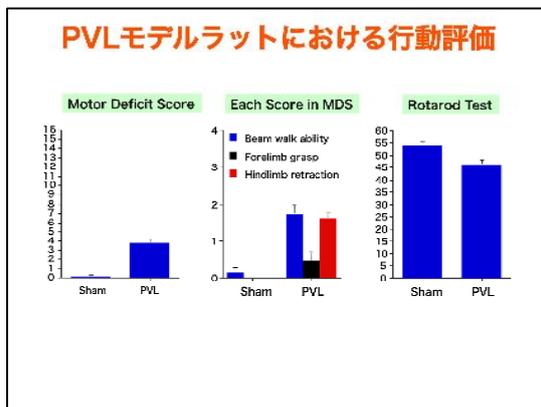


図1 生後60日後の運動機能評価

ロタロッドテストおよびMDSから、下肢を中心とする運動機能の低下が認められた。

また、生後19ヶ月齢の老齢PVLモデルに対し、シリンダーテストを実施した(図2)。

不安様行動の指標であるrearing回数に大きな違いは認められなかった(図2左)。しかし、立ち上がり時に壁に手をつく回数の増加(図2左)、下肢に体重を載せた時のふらつき回数の増加がみられた(図2右)。障害側の運動機能の低

下を示す結果と解釈している。

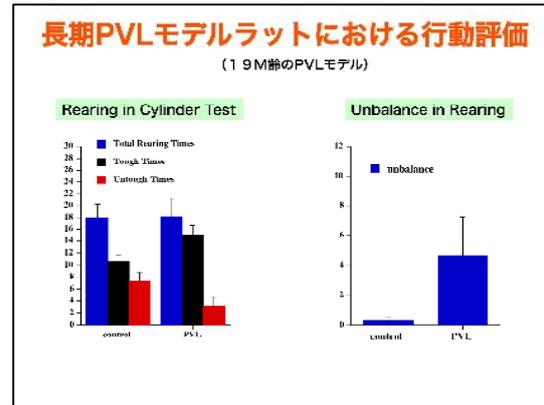


図2 生後19ヶ月齢の運動機能評価

これらの結果から、PVLモデル動物において下肢を中心とする軽度の運動機能低下が長期間認められることが明らかとなった。

##### ② 組織学的な評価

PVL発症早期の神経障害をArgyophil III染色法により調べた。発症後0, 12, 24, 48時間および3, 7日において評価したところ、障害超早期のニューロンは殆ど検出されなかった。

脳組織変化をP10, P20, P60で調べたところ、NeuN陽性細胞数は対照群に比べ変化はないが、APC陽性細胞数はどの時点でも障害側で約20%減少していた。

①および②の結果から、未熟児型PVLモデルはOLG選択的な障害の長期的持続により運動機能低下が発育期以降も生じることが示唆され、このモデルが長期モデルとしても有用であることが示唆された。

#### (2) マウスiPS細胞の分化誘導

マウスiPS細胞を7段階の過程を経てOLGへ分化誘導させた(図3)。

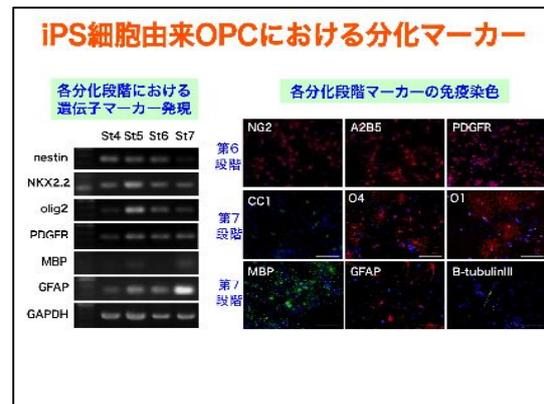


図3 iPS細胞からOLGへの分化誘導

PDGF (10ng/ml) 存在下で6日間培養する第6段階において、全細胞のうち約52%の細胞がA2B5陽性であり、また約50%がPDGF $\alpha$ R陽性であった。また、T3でOLGへ7日間分化させると、約25%がO4陽性、約15%がO1陽性、約5%がCC1陽性、約25%がGFAP陽性、3%が $\beta$ -tubulin III陽性へと分化した。また、SSEA-1陽性細胞が約2%程度確認された。

移植細胞中のSSEA-1陽性細胞を除去するため、分化の第5段階で残存する未分化細胞を取り除く必要があるため、SSEA-1抗体結合磁気マイクロビーズを用いて細胞除去を行った。その結果、10%程度含まれていたSSEA-1陽性細胞は1%以下となった。

### (3) 細胞移植

#### ① 移植部位の検討

ES細胞由来NSCを線条体外包境界部、脳梁下部へ、免疫抑制剤を用いず細胞移植を行った。移植20日後の陽性細胞の分布を調べた(図4)。

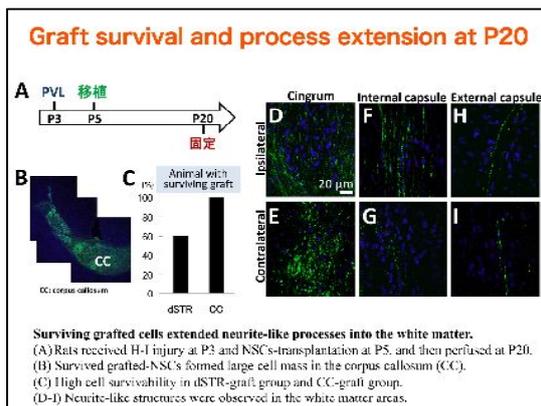


図4 白質内における移植細胞の検出

その結果、移植部位周囲や移植部位から離れた白質内(反対側外包および両側内包)に及ぶ広範囲に多数のEGFP陽性細胞の生着を確認した。特に、白質内において移植細胞の生存が非常に良いことが明らかとなった。また、移植2ヶ月後において、白質内でMAP-2陽性&EGFP陽性の細胞集塊が観察された。

#### ② PVLモデルラットへの移植

##### 1) GFP標識ES細胞由来神経幹細胞の移植

PVL作成2日後にGFP標識ES細胞由来NSCを脳梁部へ移植した。移植15日後に、GFP陽性の細胞体は移植部近傍白質に局限し、内包など他白質領域では $\beta$ -tubulin IIIおよびSMI312陽性の神経突起様構造が認められた。

移植6ヶ月後の組織変化では、GFP陽性の神経細胞は検出されなかった。生食投与群ではAPC陽性細胞が約20%減少したままであったのに対し移植群では障害側のAPC陽性細胞数が対照側と比べ同程度まで回復していた(図5)。

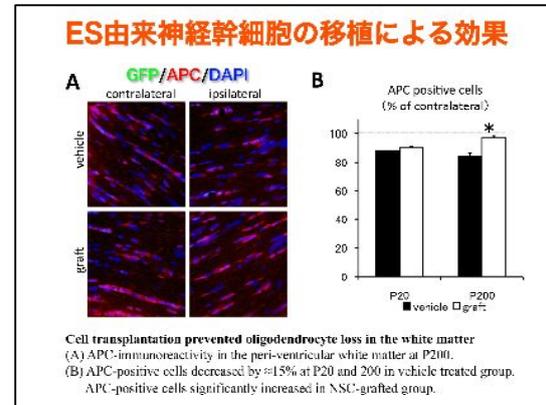


図5 移植によるAPC陽性細胞の増加

この結果から、ES細胞由来神経幹細胞は移植後早期には白質内において生着するが長期まで生存しないことが明らかになった。しかし細胞移植により、APC陽性細胞を正常レベルにまで分化・生存させることに対し何らかの作用を与えている可能性が示唆された。

##### 2) iPS細胞由来preOLの移植

マウスiPS細胞から6段階の分化誘導法によりOPCへ分化させた細胞を小さな細胞塊とした後、未熟児型PVLモデルラットの脳内へ移植し、移植2, 7, 14日後においてGFP陽性の移植細胞を調べた(図6)。

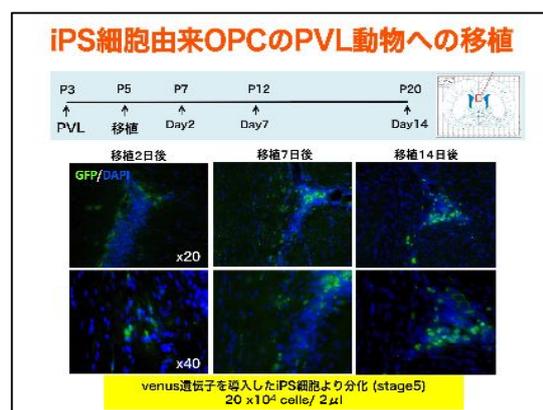


図6 iPS細胞由来OPCの細胞移植

移植2日後にはGFP陽性細胞が多く認められるが、2週間後において生存している移植細胞の数は少なかった。

このことから、マウスiPS細胞からOPCへの

分化誘導が in vitro で可能となり、さらにその細胞移植により脳内で生着する細胞は少ないものの、確認することができた。長期の生存に関しては、栄養因子投与などの工夫が必要であることが示唆された。

## 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 2 件)

- 1, Kato S, Aoyama M, Hida, H, et al.  
11 名 4 番目  
Endogenous erythropoietin from astrocyte protects the oligodendrocyte precursor cell against hypoxic and reoxygenation injury  
**J Neurosci. Res.** 89: 1566-74, 2011  
査読有り doi: 10.1002/jnr.22702
- 2, Kato S, Mizuno K, Togari H et al.  
15 名 11 番目  
Edaravone, a novel free radical scavenger, reduces high-mobility group box 1 and prolongs survival in a neonatal sepsis model  
**Shcock** 32(6): 586-92, 2009. 査読有り  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19295481>

[学会発表] (計 6 件)

- 1, Misumi S, Masuda T, Hida H et al  
Grafted ES-derived neural stem cells can survive and increase oligodendrocytes in the brain of Periventricular leukomalacia model  
第 89 回日本生理学会, 2012 Mar 29-31, 松本市
- 2, Misumi S, Fujita M, Masuda T, Hida H.  
Oligodendrocyte progenitor cells from mouse induced pluripotent stem cells: selection of A2B5 positive cells and transplantation into the brain  
北米神経科学大会, 2011 Nov 12-16, Washington D. C.
- 3, Masuda T, Misumi S, Hida H, et al  
Differentiation of grafted neural stem cells in the white matter of periventricular leukomalacia model rat

第 34 回日本神経科学大会, 2011 Sep 14-17, 横浜市

- 4, Masuda T, Aoyama M, Hida H et al  
Better survival of grafted neural stem cells in the white matter of a periventricular leukomalacia model  
第 88 回日本生理学会, 2010 Mar 28, 横浜
- 5, Fujita M, Misumi S, Hida H et al  
Efficient induction of oligodendrocytes from mouse ES cells: immunocytochemical and electrophysiological evidences  
北米神経科学大会, 2009 Oct 17-21, Chicago
- 6, Kako E, Kaneko N, Hida H, et al  
Enhanced oligodendrogenesis and neurogenesis in the subventricular zone of neonatal mouse brain following Hypoxia/ischemia  
第 32 回日本神経科学大会, 2009 Sep 16-18, 名古屋市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水野 恵介 (MIZUNO KEISUKE)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号: 00405177

### (2) 研究分担者

飛田 秀樹 (HIDA HIDEKI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 00305525

### (3) 連携研究者 該当者なし

### (4) 研究協力者

増田 匡 (MASUDA TADASHI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 10423641

三角 吉代 (MISUMI SACHIYO)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 70529148