

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25年5月15日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500360

研究課題名（和文） アルツハイマー病の新規治療戦略：神経幹細胞の経静脈的移植

研究課題名（英文） Intravenous infusion of neural stem cells as a new therapy for Alzheimer's disease.

研究代表者

王 芙蓉 (WANG FURONG)

金沢医科大学・医学部・研究員

研究者番号：30566922

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病は脳皮質での緩慢な神経細胞減少を特徴とする。神経幹細胞で補充する手法を開発し、その神経生物学的根拠について特に脳由来神経栄養因子の関与の面から明らかにすることを目的とした。アルツハイマー病モデルマウスにおいて、脳由来神経栄養因子を発現させることが知られている経頭蓋磁気刺激によって学習能力が改善することを見出した。蛍光を発する神経幹細胞を単離し、これを脳内へ移行させるための手技を利用可能にした。

研究成果の概要（英文）：Alzheimer's disease is characterized by slowly progressive loss of cortical neurons. To supplement such a neuron loss with neural stem cells might be a therapeutic measure more directly addressing to the disease than the currently available palliative drug therapies. We have discovered that repetitive transcranial magnetic stimulation, which increases expression of brain derived neurotrophic factor, improves cognition in Alzheimer's model mice. We have established the methods by which to isolate fluorescence-labeled neural stem cells and graft them into the model mouse's brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：神経系病態生理

1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病 (AD) の原因療法は確立されておらず、コリンエステラーゼ阻害薬 (塩酸ドネペジル) などの投与のみが治療法として普及している。しかし、これは対症療法であり、アルツハイマー病の病因に基づく治療法ではない。原因にせまる療法である

ワクチン療法の開発も広く行われているが、いまだ実用化していない。アルツハイマー病が進行してニューロンの喪失が起これば、現在普及しているコリンエステラーゼ阻害薬 (塩酸ドネペジル) による治療法や、開発がすすんでいるワクチン療法はもはや効果が期待できない。

(2) 新規にニューロンを補って神経回路を再構築するためには、神経幹細胞によるニューロン新生に頼る他はない。実際、神経幹細胞をアルツハイマー病モデルマウスの脳内へ定位脳手術で移植する試みがなされ、生着と認知機能改善が確認された(Blurton-Jones et al, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009)。移植された神経幹細胞が宿主脳内で生着して、再構成された神経回路網の要素として参画することは Englund et al (*Proc Natl Acad Sci USA*, 2002) 以来、いくつも報告されている。

(3) 我々はアルツハイマー病モデルマウスに神経幹細胞を投与し、これが脳内へ移行して生着することを報告している。この先行研究として、多発性硬化症モデルへの静脈経由での幹細胞移植の成功 (Pluchino et al, *Nature*, 2003) があり、炎症発生部位では血液脳関門が破綻して血管から脳実質への幹細胞移行が可能となると考えられた。頭蓋を開けることなく静脈注射にて低侵襲で細胞移植ができるなら、臨床応用の面のアドバンテージはいっそう高いと考えられる。

2. 研究の目的

(1) 脳内移植した神経幹細胞が、宿主脳で認知学習の改善に寄与しているかどうかは未知であり、これを解析することが本研究の目的である。さらに、認知改善効果の BDNF (神経成長因子) 依存性を明確にする。定位脳手術による移植では認知学習の改善は BDNF の産生に依存したと報告されている。我々の経静脈的移植の場合でも BDNF 依存性かどうかを確かめる。こうして、幹細胞が経静脈的に移植されて生着し、認知行動学習に寄与できることを証明することである。

(2) その布石として、アルツハイマー病モデルマウスに対して神経幹細胞の経静脈的移植を試み、脳内とりわけ海馬への生着を確認する。行動テストバッテリーを使って認知学習異常への治癒効果を確かめる。Blurton-Jones et al (2009) らの定位脳手術による移植では認知学習の改善は BDNF の産生に依存したと報告されている。我々の経静脈的移植の場合でも BDNF 依存性かどうかを確かめる。

(3) 電気けいれんには BDNF 発現を飛躍的

に高める作用があり、それを磁気で実現する経頭蓋磁気刺激(rTMS)によって認知行動学習の改善に効果があるかどうか解析する。さらに学習改善効果と関連する電気生理学的・組織学的特性も解析する。上記の定位脳手術による移植では、海馬でのシナプス密度が増大したと報告されており、基本的なシナプス機能やシナプス可塑性(シナプス伝達長期増強・抑圧:LTP・LTD)における変化が示唆される。これらを電気生理学的に解析し、認知学習がレスキューされる際の細胞メカニズムの端緒をつかむ。また、組織化学的にアミロイドβ(Aβ)のデポジットの軽減があるかどうか確かめる。

3. 研究の方法

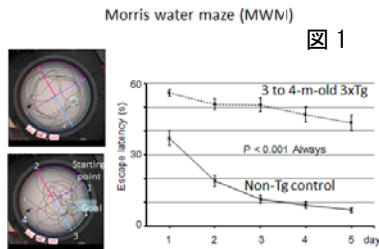
(1) アルツハイマー病モデルマウス(3xTg-ADモデル)とGFP発現マウスの自家コロニーを構築する。3xTg-ADではアミロイド前駆体蛋白質(APP)・プレセニリン・タウの3遺伝子が改変され、大脳皮質錐体細胞では、細胞内アミロイドβ(Aβ)が生後3カ月以降に蓄積され、次いで6カ月以降に細胞外にAβが老人斑様に沈着していく。認知行動学習の能力を評価するためのテストとしてモリス水迷路と新規物体識別試験を実施できるようにする。

(2) これまでの研究で脳への電気けいれん刺激が細胞内アミロイドβの毒性に一部拮抗することを明らかにした。また電気けいれんはBDNFの発現を高める。これより、3xTgマウスの脳内でBDNFの発現を高める手段として電気けいれん刺激やその磁気版である経頭蓋磁気刺激(rTMS)が活用できる可能性がある。ここでは実際にBDNF発現の高まることを確認したうえで、経頭蓋磁気刺激を施行する。まず3xTgマウスにおいてrTMSが認知行動を改善することを確かめる。

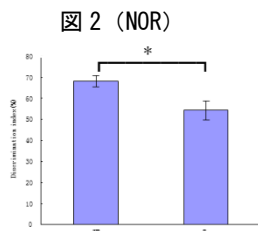
(3) GFP発現マウスの大脳皮質からトリブシンとピペット操作(trituration)によって神経幹細胞も含む細胞全体を単離し、これを3xTgマウスに注入する。側脳室内にカニューレ先端を慢性的に留置し、これを通じて脳室内へ注入する。注入後の種々のインターバルでマウスを使って認知行動学習を行う。蛍光を発する細胞の生着を確かめる。GFPによりグラフト細胞を、doublecortinによる免疫組織により神経幹細胞を同定する。次いで経尾静脈的な注入と生着を試みる。

4. 研究成果

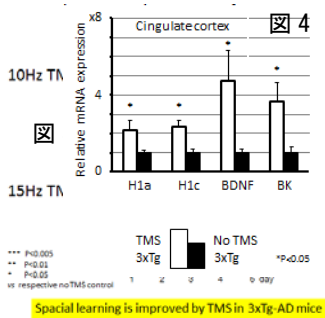
(1) 認知行動学習の能力を評価するためのテストとしてモリス水迷路(Morris water Maze; MWM)と新規物体識別試験(Novel Object Recognition; NOR)を実施できるようにした。生後 3-4 か月の 3xTg マウスにおいては、Discrimination Index (NOR の場合：図 2)と Escape Latency の (MWM の場合：図 1) の両方の指標において学習能力は劣っていた。



Spatial learning is impaired in 3xTg-AD mice



(2) 経頭蓋磁気刺激 (rTMS) によって 3xTg マウスの学習能力が改善することを MWM によって明らかにした (図 3)。1 Hz、10Hz および 15Hz と異なる 3 種の周波数で試行したところ、rTMS 効果には周波数依存性があった。15Hz において効果のあることが判明した。また、同じく周波数依存的に rTMS は大脳皮質における BDNF 発現を高め、15Hz において有意な上昇のあることを明らかにした (図 4)。

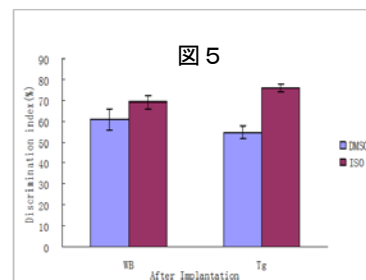


Spatial learning is improved by TMS in 3xTg-AD mice

(3) 15Hz の経頭蓋磁気刺激での学習改善に呼応し、細胞レベルでの記憶学習モデルである海馬長期増強 (LTP) も、周波数依存的に改善することが判明した。両者の周波数依存性から、経頭蓋磁気刺激による認知行動の改善と海馬可塑性の改善との関連が強く示唆される。皮質錐体細胞における興奮性は、3xTg では野生型よりも増大しており、これも 15Hz の経頭蓋磁気刺激によって改善されることが解った。この興奮性の増大と改善は、BK 型カリウムチャンネルの 3xTg マウスでの活性低下と、rTMS による活性増大によることが示唆された。さらに、BK チャンネルを活性促進することが知られている細胞内アダプター蛋白質である Homer1a も、rTMS によって発現増大することが判明した。この Homer1a は野生マウスでも rTMS によって発現上昇することが判明した。また、15Hz での rTMS によって Aβ 軽減の起こることが ELISA 法で判明した。

(4) 神経幹細胞を移植するシステムとして尾静脈注入を採用するが、この手法では大量注入の困難なことが予想されたので、まず脳室へカニューレで注入する方法を用いた。rTMS で BK チャンネルの活性が高まることを報告していたので、この方法で BK チャンネル活性化剤(isopimaric acid; ISO)を脳室投与して NOR の成績がコントロール(ISO)よりも改善することを明らかにし、我々の脳室投与システムがうまく作動することを確認した(図 5)。

このシステムを使って細胞注入することに取り掛かった。GFP 発現マウスの大脳皮質からトリプシンとピペット操作 (trituration) によって神経幹細胞も含む細胞全体を単離し、これを 3xTg マウスに注入した。生着し



ておれば蛍光を発する細胞が観察できるはずであるが、これはこれまでのところ確認できていない。この成功を経て、投与後に認知行動テスト (NOR と MWM) を行い、ついで組織学的に GFP によりグラフト細胞を doublecortin 免疫組織により神経幹細胞を同定し、その結果を見た後に脳室注入法から経尾静脈的注入に切り替えをすすめる。

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5件)

- ① Zhang Q, Tanaka K, Sun P, Nakata M, Yamamoto R, Sakimura K, Matsui M, Kato N. Suppression of synaptic plasticity by cerebrospinal fluid from anti-NMDA receptor encephalitis patients. *Neurobiology Disease*. 査読有, 45, 2012, 610-615.
DOI:10.1016/j.nbd.2011.09.019.
- ② Sugai T., Yamamoto R, Yoshimura H, Kato N. Multimodal cross-talk of olfactory and gustatory information in the endopiriform nucleus in rats. *Chemical Senses*. 査読有, 37, 2012, 681-688.
DOI:10.1093/chemse/bjs046.
- ③ Yamamoto R, Ueta Y, Sugai T., Kato N. A serotonergic discrimination favoring synaptic inputs that accompany robust spike firing in lateral amygdala neurons. *Neuroscience*. 査読有, 220, 2012, 119-130.
DOI:10.1016/j.neuroscience.2012.06.008.
- ④ Sun P, Wang F-R., Wang L, Zhang Yu, Yamamoto R, Sugai T., Zhang Q, Wang Z-D, Kato N. Increase in cortical pyramidal cell excitability accompanies depression-like behavior in mice: a transcranial magnetic stimulation study. *Journal of Neuroscience*. 査読有, 31, 2011, 16464-16472.
DOI:10.1523/JNEUROSCI.1542-11.2011.
- ⑤ Yamamoto K, Ueta Y, Wang L, Yamamoto R, Inoue N, Inokuchi K, Aiba A, Yonekura H, Kato N. Suppression of a neocortical potassium channel activity by

intracellular amyloid- β and its rescue with Homer1a. *Journal of Neuroscience*. 査読有, 31, 2011, 11100-11109.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.6752-10.2011.

[学会発表] (計8件)

- ① 加藤伸郎「海馬メタ可塑性とアルツハイマー病モデルマウス認知回復との関連」第90回日本生理学会、2013年3月27日、東京都江戸川区 タワーホール船堀
- ② 加藤伸郎「軽度ストレスに対するレジリエンスと Homer1a」第13回「知と構成」領域懇話会、2012年10月27日、兵庫県神戸市 かんぼの宿有馬
- ③ 加藤伸郎「可溶性アミロイド β による電気生理学的な異常事象」第7回スフィンゴセラピー研究会、2012年7月13日、石川県羽咋郡志賀町 能登ロイヤルホテル
- ④ Kato N. Some neurologic emergency may be well controlled: A lesson from a class of autoimmune encephalitis. 中日学術講演会、2011年10月27日、China Wuhan
- ⑤ 須貝外喜夫「嗅覚および味覚の multimodal chemosensory 領域としてのラット傍梨状核・前障・島皮質」日本味と匂学会第45回大会、2011年10月6日、石川県金沢市 石川県立音楽堂
- ⑥ 須貝外喜夫「電気生理学的および c-fos 研究による傍梨状核・前障・島皮質への嗅覚および味覚情報の収束」第34回日本神経科学大会、2011年9月16日、神奈川県横浜市 横浜パシフィコ
- ⑦ 加藤伸郎「反復経頭蓋磁気刺激によるアルツハイマー病モデルマウスの認知学習改善にともなう大脳皮質アミロイド β 量の低下」金沢医科大学医学会第47回学術集会、2011年7月9日、石川県河北郡内灘町 金沢医科大学
- ⑧ Kato N. Improved learning parallels normalization of electrophysiological properties after transcranial magnetic Stimulation in a mouse Alzheimer's disease model. *Neuroscience* 2010, 2010年11月16日, USA San Diego

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 光照射装置、この光照射装置を備えた

部屋、及び照明器具

発明者：加藤伸郎

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2011-234026

出願年月日：23年10月25日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

王 芙蓉 (WANG FURONG)

金沢医科大学・医学部・研究員

研究者番号：30566922

(2) 研究分担者

加藤 伸郎 (KATO NOBUO)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：10152729

須貝外喜夫 (SUGAI TOKIO)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90064625

孫 鵬 (SON PENG)

金沢医科大学・総合医学研究所・研究員

研究者番号：80555053

(H22)