

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300201

研究課題名(和文)神経機能再生におけるES細胞治療とリハビリテーションの相加効果

研究課題名(英文) Additive effect of rehabilitation after ES cell therapy in neurological disorder model

研究代表者

弓削 類 (YUGE, RUI)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：20263676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、模擬微小重力環境を用いてES細胞の神経幹細胞分化誘導を行い、さらにその細胞を移植した。培養開始2日間微小重力環境下で培養し、その後1G環境で培養した群では、1G環境で培養し続けた群と比較して細胞塊が大きく、神経幹細胞分化が促進された。これには、Notchシグナルの活性化が関与する可能性が示唆された。さらに、この神経幹細胞を脳挫傷モデルマウスへ移植し、加えて移植後に運動を行うことで、移植細胞の神経分化が促進されることが分かった。そのメカニズムには、BDNF-GAP43経路を介した移植細胞も含めた神経回路の再編成による可能性が考えられ、細胞治療とリハビリテーションの相加効果が示された。

研究成果の概要(英文)：Here, we cultured mouse embryonic stem cells (mESCs) in simulated microgravity (SMG) for initial 2 days of neural stem cells (NSCs) induction. Moreover, the cells were transplanted brain injury model mice to examine rehabilitation acted in an additive manner for neurogenesis. In SMG, mESCs formed cell sphere bigger than in 1G condition, and on or after 3 day of induction, NSCs differentiation was enhanced. The cells were activated Notch signal. We consider Notch signal activation is one of the reasons why mESCs can form big cell sphere in SMG to induce NSCs differentiation. The cells were transplanted brain injury model mice. Some mice were treated not only cell therapy but also treadmill exercise for rehabilitation. Functional recovery and neural differentiation were most accelerated and BDNF and GAP43 mRNA expressions increased. We consider rehabilitation acts in an additive manner for reconstruction of neural network through BDNF-GAP43 pathway after cell therapy.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：人間医工学/リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：微小重力 細胞塊 神経再生 細胞移植 リハビリテーション

1. 研究開始当初の背景

細胞治療(再生医療)では、幹細胞とよばれる細胞が使われる。幹細胞の中でも、万能細胞とも呼ばれるES細胞(embryonic stem cells: 胚性幹細胞)やiPS細胞(induced pluripotent stem cells: 人工多能性幹細胞)は、生体のあらゆる細胞に分化する能力を持っているため、多くの疾患に対する応用が期待されている。一方、その高い分化能力が故、生体に万能細胞をそのまま移植するとがん化してしまうという危険性が問題とされている。がん化の危険が少ない骨髄細胞等に由来する幹細胞を使った細胞治療の臨床試験は、日本でも始まっている。将来的に万能細胞を使った細胞治療を可能にする技術が求められる。

脳損傷に対する機能回復の手段としてリハビリテーションが行われてきた。細胞移植後にリハビリテーションを行うことで、細胞移植の効果を最大限に引き出すことができる可能性が考えられる。細胞治療という新しい医療技術の導入により、移植後のリハビリテーションについて検討する必要がある。

2. 研究の目的

研究代表者らの研究から、SFEB法を基盤として、マウスES細胞を微小重力環境で神経細胞へ分化誘導を行うと、極めて効率的にネスチン陽性細胞の細胞塊が得られた。そこで本研究では、微小重力環境において、1. なぜ細胞塊ができやすいか、2. なぜ神経幹細胞へ効率良く分化するか、に関する詳細な解析を行い、万能細胞からの神経分化誘導法として、微小重力環境の有用性を考察する。さらに、3. 微小重力環境で神経分化誘導したES細胞由来の細胞を、脳挫傷による片麻痺モデル動物に細胞移植し、その効果を検討する。また、臨床現場を想定すると、細胞移植後には、移植した細胞が神経としての機能を発揮するための教育が必要となる。そこで、4. トレッドミル等を用いた運動によるリハビリテーションを併用した場合の相加・相乗効果を検討し、細胞移植後の運動、リハビリテーションプログラムの基礎的データについて考察する。

3. 研究の方法

1 - 1) 培養細胞

マウスES細胞を用いた。実験に必要な細胞数を得た時点で、神経分化誘導培地を用いて神経分化誘導を開始した(Set 0)。培地交換は、3日に1回行い、7日間培養を行った。神経分化誘導培地は、Glasgow modified Eagle's medium に NEAA, Sodium Pyruvate, 2-ME, KSR を添加し使用した。培養条件は、5% CO₂, 95% air, 37℃ とした。

1 - 2) 実験群

細胞塊を形成させる条件の違いにより、以

下の2群に分けた。

Control (C) 群: bacterial dish 法に従って、細菌用培養皿に細胞を播種し、7日間 (Day 7) 通常の 1G 環境で静置培養し神経分化誘導を行う群

Modified Induction (MI) 群: 神経分化誘導開始後2日間 (Day 2), 3D-クリノスタットを利用した模擬微小重力環境で培養した後、細菌用培養皿に再播種して5日間、神経分化誘導を行う群

1 - 3) 形態学的観察

倒立型位相差顕微鏡を用いて観察した。細胞の写真をデジタルカメラを用いてパーソナルコンピュータに取り込み、画像処理ソフトウェアを用いて細胞塊の最大径を計測した。

1 - 4) reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

未分化な細胞のマーカーは Oct-4, Nanog を用い、神経幹細胞の分化マーカーには、Nestin, Pax6, 分化関連因子として、E-cadherin, N-cadherin, Notch を用いた。内部標準遺伝子には、β-actin を用いた。

1 - 5) Western blot

Western blot により、細胞内シグナル伝達系である NICD (Notch Intracellular Domain) のタンパク質発現を解析した。

2 - 1) 細胞移植

脳損傷モデルマウスを作製し、損傷後7日に、尾静脈経路で細胞移植を行った。移植細胞には、マウスES細胞由来神経幹/前駆細胞を用いた。細胞移植後の運動として、移植翌日(損傷後8日)よりトレッドミルを使用して毎日運動(6m/min, 20min)を行わせた。

2 - 2) 実験群

細胞移植のみを行う群 (Transplantation: T 群)、運動のみを行う群 (Exercise: E 群)、細胞移植後に運動を行う群 (Transplantation + Exercise: TE 群)、治療を実施しない群 (Control: C 群)、頭部切開のみの群 (Sham: S 群) の5群とした。

2 - 3) 運動機能評価

運動機能評価には、rotarod test および beam walking test を用いた。損傷後7(移植前)、14、21、28、35日に行った。

2 - 4) 組織学的評価

損傷後35日に脳を摘出し、神経分化マーカーの MAP2 およびアストロサイト分化マーカーの GFAP で免疫染色を行い、移植細胞の動態を評価した。

2 - 5) 遺伝子発現解析

運動機能回復過程における脳損傷領域で

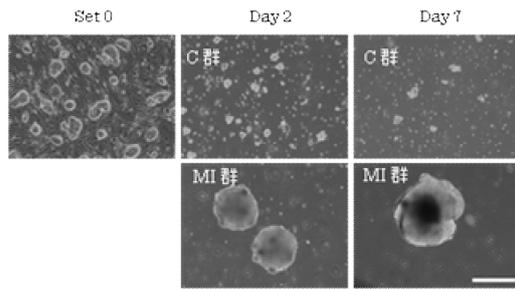


図 1 . 形態変化

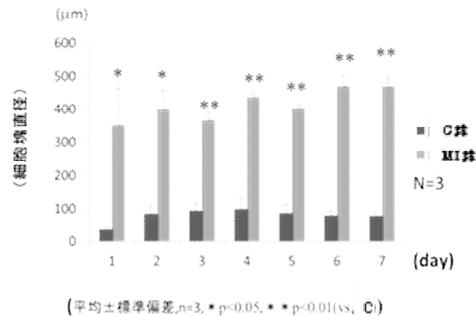


図 2 . 細胞塊のサイズ

の遺伝子発現変化を解析するため、損傷後 8, 11, 15, 35 日 (運動開始前, 開始後 3, 7, 27 日 / 細胞移植後 1, 4, 8, 28 日) に脳を摘出した。摘出後、損傷領域より mRNA を抽出し real-time PCR 法を用いて、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) や成長関連タンパク質 (growth associated protein-43: GAP43) の発現を解析した。

2 - 6) 電気生理学的解析

損傷後 21 日と 35 日に運動誘発電位 (motor-evoked potential: MEP) を測定した。

4. 研究成果

1 - 1) 細胞形態の変化

Set 0 において, ES 細胞はコロニー状に増殖した (図 1)。神経分化誘導 2 日後, MI 群は、細胞塊のサイズが均一で、C 群と比較して大きな、真球状の細胞塊を形成した。C 群ではサイズが小さく、不均一であった。各群の細胞塊の直径を算出した結果、全ての培養期間において、C 群と比較して MI 群で有意に細胞塊の直径が大きかった (図 2)。

1 - 2) 分化マーカーの mRNA の発現

Oct-4 及び Nanog は、Set 0 で発現がみられ、C 群では、Day 1 から Day 4 まで発現が維持されていたが、Day 5 から Day 7 では発現が減弱した (図 3)。MI 群では、Day 4 まで発現は維持されたが、Day 5 から Day 7 では発現はほとんどみられなかった。Nestin は、

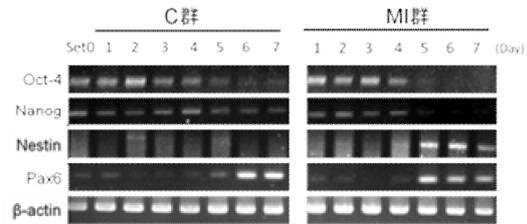


図 3 . 分化マーカーの mRNA の発現

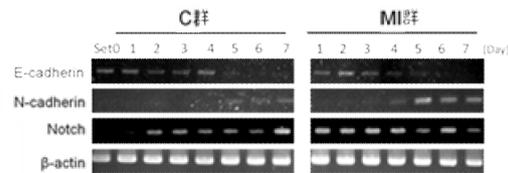


図 4 . 細胞分化関連因子の mRNA の発現

C 群ではあまり発現がみられなかった。MI 群では、Day 5, 6, 7 で C 群と比較して強い発現がみられた。Pax6 は、C 群では、Day 6, 7 で発現がみられた。MI 群では、Day 5 から強い発現がみられた。

1 - 3) 神経幹細胞分化関連因子の mRNA 発現

E-cadherin は、Set 0 では発現がみられた (図 4)。C 群では、Day 1 から Day 4 まで発現が維持されていたが、Day 5 から Day 7 では発現が減弱した。MI 群では、Day 1 から Day 3 まで発現がみられ、Day 4 から減少し、Day 5 から Day 7 ではほとんどみられなかった。N-cadherin は、C 群では、Day 5 で発現がみられ、Day 7 まで継続的に発現が増加した。一方、MI 群では、Day 4 から発現がみられ、Day 5 から Day 7 で、C 群と比較して強い発現がみられた。

1 - 4) NICD のタンパク質発現

Set 0, Day 1 から Day 7 の C, MI 各群の NICD のタンパク質発現を解析した。Set 0 では弱い発現がみられた。C 群では、Day 1 では、強い発現がみられたが、その後は減弱した。一方、MI 群では、Day 1 で強い発現がみられ、Day 4 まで C 群よりも強い発現が維持された。

2 - 1) 細胞移植後の運動機能評価

運動機能評価では、C 群と比較して T 群、E 群で運動機能の改善がみられた (図 5)。さらに、TE 群がすべての群で最も運動機能が改善した。

2 - 2) 損傷部における組織学的解析および遺伝子発現

免疫組織学的解析では、生着細胞数は T 群と TE 群で有意な差は認められなかった (図

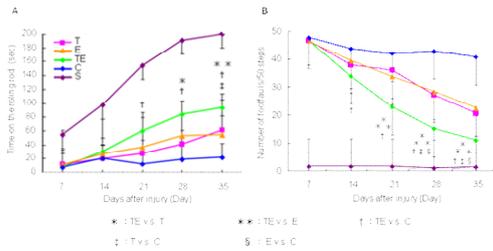


図 5. 運動機能評価 (発表論文 1)
 グラフ A は rotarod test, グラフ B は beam walking test の結果を示す.

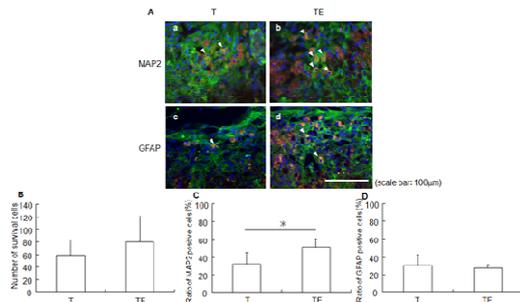


図 6. 損傷部の組織学的解析 (発表論文 1)
 A は T 群および TE 群における MAP2 および GFAP の免疫染色像の代表例を示す. グラフ B は生着細胞数, グラフ C は MAP2 陽性率, グラフ D は GFAP 陽性率を示す.

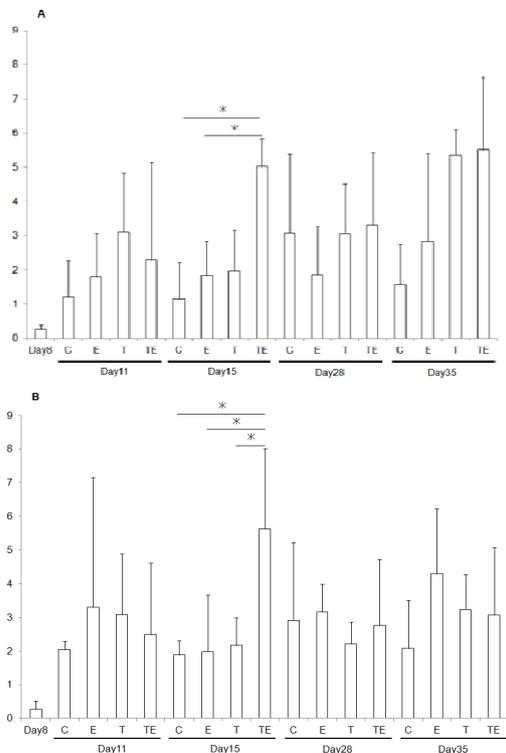


図 7. 損傷部の遺伝子発現 (発表論文 1)
 グラフ A は BDNF, グラフ B は GAP43 の遺伝子発現の結果を示す.

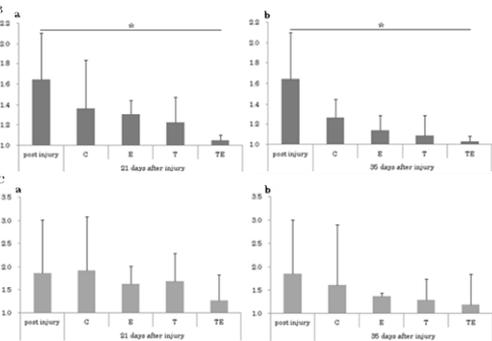
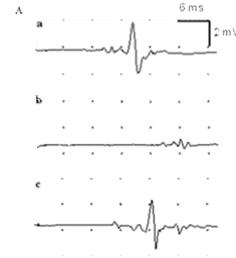


図 8. 電気生理学的解析 (発表論文 1)
 A-a は損傷前, A-b は損傷直後, A-c は損傷後 35 日の TE 群の波形の代表例を示す. グラフ B は損傷後 21 日 (a) と 35 日 (b) の潜時, グラフ C は損傷後 21 日 (a) と 35 日 (b) の持続時間を示す.

6B) MAP2 の陽性率は, TE 群で T 群と比較して高かった (図 6C,D). 損傷領域における BDNF や GAP43 は, 回復初期過程の損傷後 15 日 (運動開始後 7 日 / 移植後 8 日) において TE 群で最も強い発現を示した (図 7).

2 - 3) 電気生理学的解析

損傷後 21 日と 35 日において, MEP は, 波形の潜時および持続時間ともに TE 群で最も改善した (図 8). 特に潜時は, TE 群で有意に改善した.

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 3 件)

- 1) Imura T., Matsumoto M., Fukazawa T., Khalesi E., Sun Y.N., Takeda M., Uwatoko H., Nakata K., Tanimoto K., Kajiume T., Kawahara Y., Yuge L.: Interactive effects of cell therapy and rehabilitation realize the full potential of neurogenesis in brain injury model. *Neurosci Lett*, 555: 73-78, 2013, 査読有, doi: 10.1016/j.neulet.2013.09.009.
- 2) Mitsuhashi T., Takeda M., Yamaguchi S., Manabe T., Matsumoto M.,

- Kawahara Y., Yuge L., Kurisu K.: Simulated Microgravity Facilitate Cell Migration And Neuroprotection After Bone Marrow Stromal Cell Transplantation In Spinal Cord Injury, *Stem Cell Research & Therapy*, 4: 35, 2013, 査読有, doi: 10.1186/scrt184
- 3) Matsumoto M., Imura T., Fukazawa T., Sun YN., Takeda M., Kajiume T., Kawahara Y., Yuge L.: Electrical stimulation enhances neurogenin2 expression through β -catenin signaling pathway of mouse bone marrow stromal cells and intensifies the effect of cell transplantation on brain injury. *Neurosci Lett*, 533: 71-76, 2013, 査読有, doi: 10.1016/j.neulet.2012.10.023.
- [学会発表](計 16 件)
- 1) 猪村剛史, 上床裕之, 中田恭輔, 大倉優之介, 古川拓馬, 富安真弓, 小畑侑子, 大鶴直史, 河原裕美, 光原崇文, 武田正明, 山口 智, 栗栖 薫, 弓削 類: 無血清培養したヒト頭蓋骨由来骨髄間質細胞の増殖能および分化能の検討. 第 13 回日本再生医療学会総会, 京都, 2014 年 3 月 4 日
- 2) 大倉優之介, 上床裕之, 武田正明, 籬拓郎, 中田恭輔, 深澤賢宏, 猪村剛史, Khalesi Elham, 古川拓馬, 山口 智, 河原裕美, 栗栖 薫, 弓削 類: ヒト骨髄間質細胞の神経分化誘導および移植実験 - 頭蓋骨と腸骨での比較・検討 -. 第 13 回日本再生医療学会総会, 京都, 2014 年 3 月 4 日
- 3) Uwatoko H., Mitsuahara T., Magaki T., Ookura Y., Nakata K., Matsumoto M., Fukazawa T., Imura T., Sun YN., Furukawa T., Kawahara Y., Kurisu K., Yuge L.: Human cranial bone derived stem cells have multipotency and the remarkable capacity of neural differentiation. 11th International Society for Stem Cell Research (ISSCR), Boston, MA, USA, June 14, 2013
- 4) 猪村剛史, 松本昌也, 深澤賢宏, 孫 亜楠, Khalesi Elham, 上床裕之, 中田恭輔, 河原裕美, 弓削 類: 神経幹/前駆細胞移植後のリハビリテーションによる脳内変化の検討. 第 48 回日本理学療法学会大会, 名古屋, 2013 年 5 月 26 日
- 5) 上床裕之, 光原崇文, 大倉優之介, 松本昌也, 中田恭輔, 深澤賢宏, 猪村剛史, 孫 亜楠, Elham Khalesi, 古川拓馬, 河原裕美, 山口 智, 栗栖 薫, 弓削 類: ヒト骨髄間質細胞の神経分化誘導 - 頭蓋骨と腸骨での比較・検討 -. 第 48 回日本理学療法学会大会, 名古屋, 2013 年 5 月 25 日
- 6) 大倉優之介, 松本昌也, 深澤賢宏, 猪村剛史, 孫 亜楠, 上床裕之, 中田恭輔, Elham Khalesi, 古川拓馬, 河原裕美, 光原崇文, 山口 智, 栗栖 薫, 弓削 類: 臨床応用に向けたヒト頭蓋骨由来骨髄間質細胞の多分化能の検討. 第 48 回日本理学療法学会大会, 名古屋, 2013 年 5 月 25 日
- 7) 猪村剛史, 松本昌也, 深澤賢宏, 孫 亜楠, Khalesi Elham, 上床裕之, 中田恭輔, 河原裕美, 弓削 類: 神経幹/前駆細胞移植後のリハビリテーションが損傷脳に与える影響-脳損傷モデルマウスでの検討-. 第 9 回神経理学療法研究部会学会集会, 新潟, 2012 年 12 月 1 日
- 8) Matsumoto M., Imura T., Sun YN., Fukazawa T., Morikawa K., Uwatoko H., Nakata K., Khalesi E., Kawahara Y., Yuge L.: Electrical stimulation enhanced neurogenin 2 expression of mouse bone marrow stromal cells and intensified the effect of cell transplantation into brain injury. 10th International Society for Stem Cell Research (ISSCR), Yokohama, Kanagawa, June 15, 2012
- 9) Yuge L.: Microgravity Facilitates Stem Cell Proliferation and Neural Differentiation after Cell Transplantation in Neurological Disorder Models. 10th International Society for Stem Cell Research (ISSCR), Yokohama, Kanagawa, June 15, 2012
- 10) 猪村剛史, 松本昌也, 深澤賢宏, 森川久美, 孫 亜楠, Khalesi Elham, 河原裕美, 弓削 類: 細胞移植後の運動が神経機能再生へ与える影響. 第 11 回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012 年 6 月 13 日
- 11) 松本昌也, 猪村剛史, 孫 亜楠, 深澤賢宏, 森川久美, Khalesi Elham, 上床裕之, 中田恭輔, 河原裕美, 弓削 類: 電気刺激を用いた, 細胞移植に有効なマウス骨髄間質細胞の神経分化誘導法. 第 11 回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012 年 6 月 13 日
- 12) 猪村剛史, 松本昌也, 深澤賢宏, 森川久美, 孫 亜楠, Khalesi Elham, 河原裕美, 弓削 類: 運動が外来性神経幹/前駆細胞に与える影響 - 脳由来神経栄養因子に着目して -. 第 47 回日本理学療法学会大会, 神戸, 2012 年 5 月 26 日
- 13) 松本昌也, 猪村剛史, 孫 亜楠, 深澤賢宏, 森川久美, 上床裕之, 中田恭輔, 弓削 類: 骨髄間質細胞の神経分化程度と脳損傷モデルマウスへの移植効果の差異. 第 47 回日本理学療法学会大会, 神戸, 2012 年 5 月 26 日
- 14) 上床裕之, 松本昌也, 深澤賢宏, 猪村剛

史, 森川久美, 孫 亜楠, 中田恭輔, 河原裕美, 光原崇文, 山口 智, 栗栖 薫, 弓削 類: ヒト頭蓋骨由来骨髄間質細胞の神経分化誘導. 第 47 回日本理学療法学会学術大会, 神戸, 2012 年 5 月 26 日

15) 猪村剛史, 松本昌也, 深澤賢宏, 森川久美, 孫 亜楠, Khalesi Elham, 河原裕美, 弓削 類: ES 細胞を用いた再生医療とリハビリテーションの相加効果. 第 8 回神経理学療法研究部会学術集会, 兵庫, 2011 年 12 月 4 日

16) 猪村剛史, 松本昌也, 深澤賢宏, 森川久美, 孫 亜楠, Khalesi Elham, 河原裕美, 弓削 類: 脳損傷モデルマウスに対する ES 細胞由来神経幹細胞移植後のリハビリテーション効果. 第 46 回日本理学療法学会学術大会, 宮崎, 2011 年 5 月 27 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

弓削 類 (YUGE RUI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号: 20263676

(2) 研究分担者

嶋本 顕 (SHIMAMOTO AKIRA)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号: 70432713

(H23~H24 まで分担者)