

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591303

研究課題名(和文)人工多能性幹細胞由来神経堤細胞による糖尿病性多発神経障害の細胞移植療法の検討

研究課題名(英文)Effects of transplantation of neural crest cells derived from iPS cells on diabetic polyneuropathy in mice

研究代表者

中村 二郎(Nakamura, Jiro)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：40283444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性多発神経障害(DPN)に対する細胞移植療法の有用性を神経堤細胞(NCC)を用いて検討した。eGFP発現C57BL/6マウス由来の人工多能性幹細胞(iPSC)より分化・誘導されたNCCと想定される抗p75抗体陽性細胞(p75+)は、NCCマーカーのみならず神経栄養因子及び血管栄養因子を発現していた。p75+は神経細胞、シュワン細胞および平滑筋細胞へ分化した。糖尿病マウス(DM)の下肢筋肉へのNCC筋注移植により、DMで低下した知覚機能、神経伝導速度、足底血流、表皮内神経線維密度および毛細血管数が有意に改善した。以上より、iPSC由来NCC移植はDPNに有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have shown that transplantation of neural crest cells (NCCs) is effective on spinal cord injury. Here we used NCCs from aged mouse iPS cells for treatment of diabetic polyneuropathy. iPS cells were differentiated on PA6 cells with BMP4, and p75 positive cells were defined as NCCs. NCCs were transplanted into hind limb skeletal muscles of STZ-diabetic mice. Transplanted NCCs differentiated into vascular smooth muscle cells or Schwann cells in plantar skin or soleus muscle. Impaired nerve functions in diabetic mice were ameliorated by the transplantation of NCCs. In addition, transplantation of NCCs increased intraepidermal nerve fiber densities, plantar skin blood flow and capillaries in DM. These results suggest that transplantation of NCCs derived from iPS cells could have therapeutic effects on DPN through paracrine actions of growth factors secreted by NCCs and differentiation of NCCs into Schwann cells and vascular smooth muscle cells.

研究分野：医学薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病性多発神経障害 細胞移植 人工多能性幹細胞 神経堤細胞

1. 研究開始当初の背景

DPN の発症・進展メカニズムとしては、高血糖に伴う代謝障害(ポリオール代謝亢進、PKC 活性の変化、AGE 蓄積、酸化ストレス亢進など)、糖尿病性細小血管障害に伴う末梢神経組織における血流障害および神経栄養因子の低下が重要であり、これら3つの因子が相互に作用しながら DPN が発症・進展すると考えられている。

代謝障害の観点から開発された様々な薬剤の有用性に関する検討が行われた中で、アルドース還元酵素阻害薬の基礎的および臨床的有効性が報告され、epalrestat が日常診療の場で汎用されている。しかしながら、進行した DPN に対する効果は不十分であり、更なる治療法が必要とされている。

血流障害に注目した治療法として VEGF 遺伝子治療の有効性がヒトにおいて報告されたが、遺伝子治療を行った下肢の対側でも症状が改善するなどといった矛盾や angiogenesis との相関が認められないといった問題が残されており、広く臨床に応用するためには更なる研究の積み重ねが必要と考えられている。

近年我々は、種々の細胞移植療法の DPN 改善効果を検討してきた。これまで用いた移植細胞は、血管内皮前駆細胞、骨髄由来間葉系幹細胞、骨髄単核球および ESC 由来 flk1 陽性細胞であるが、いずれも VEGF、FGF2 などの血管新生および血管拡張作用を有する因子の産生に富み、主に神経栄養血管の血流障害改善効果を介した DPN の改善を狙ったものであった。一方、神経栄養因子の欠乏に焦点を合わせ、直接的な神経再生を目指した新たな細胞移植療法の有用性が想定される。神経栄養因子は、末梢神経系においては Schwann 細胞に発現が認められている。神経再生即ち軸索伸長には Schwann 細胞が重要であり、Schwann 細胞は神経軸索を被覆し、活動電位の伝導や神経軸索保護などの機能を有して

いる。分化した Schwann 細胞は、急性の比較的大きな神経損傷時以外は遊走能に富む細胞ではないことから、細胞移植療法に用いる細胞としては適していないと考えられるが、Schwann 細胞の分化過程において活発な遊走能を保有する NCC は、Schwann 細胞の他、primary sensory neuron、smooth muscle cell、neural crest stem cell、mesenchymal stem cell にも分化するとされており、NCC 移植が DPN の病態改善効果を発揮する可能性が想定される。

2. 研究の目的

DPN に対する予防および機能改善を目的とした治療法は確立されておらず、対症療法の領域において若干の進展がみられるのが状況である。そこで本研究では、DPN の予防と機能改善を目的とし、高齢 mouse より iPSC を作出し、更に NCC に分化・誘導した後に DPN 発症マウスに移植し、その有用性を検討する。

3. 研究の方法

1) eGFP 発現 old mouse からの iPSC の作出：移植後の細胞の tracing のため、eGFP 発現 C57BL/6 mouse を使用した。DPN の患者の多くが高齢者であることより、18 カ月齢以降の高齢 mouse の皮膚・骨髄を採取し、iPSC の作成を行った。iPSC の腫瘍原性については未解決であるため、本研究では効率を重視し導入遺伝子には既に kit 化された Yamanaka らの 4 因子を用いた。

2) Mouse embryonic stem cell (以下 mESC) の NCC への分化誘導法の mouse iPSC における再現：既報に基づき、mESC (C57BL/6 mouse 由来株 BRC6 及び eGFP 発現 C57BL/6 mouse 由来株 B6G-2) 及び作成した iPSC をそれぞれ PA6 cell を feeder とし BMP4 を添加し 4~10 日間培養した。APC conjugated anti-p75^{NTR} antibody 反応後、FACS 法にて細胞を分離し、flow cytometry 法にて CD15、CD24、CD29 の発現を、RT-PCR 法にて p75^{NTR}、Ncx、dHand、

snail, slug, SOX10, PAX9, Msx-1 の発現を確認した。

3) Mouse iPSC より分化誘導した NCC の *in vitro* での Schwann 細胞への分化能の確認：既報に従い、neuregulin-1, dexamethasone, retinoic acid, FGF2, cholera toxin, endothelin-3 を添加し Schwann 細胞への分化誘導を行った。Schwann 細胞の確認には、免疫染色法、western blotting 法、RT-PCR 法にて GFAP, S100b, P0, CNPase の発現を検討した。

4) NCC 由来 Schwann cell の血管新生因子及び神経栄養因子産生能の確認：*In vitro* で、分離した NCC 及び NCC より分化した Schwann 細胞に対し、RT-PCR 法、western blotting 法、ELISA 法を用い、VEGF, FGF2, HGF, PDGF, NGF, NT-3, GDNF, BDNF, CNTF, LIF の産生を評価した。

5) Streptozotocin 誘発糖尿病 mouse において DPN 発症後に NCC を下肢筋肉内へ移植し、DPN に対する治療効果の判定：病理学的変化を伴う神経障害を発症するには比較的長期間（糖尿病罹病期間 4-5 ヶ月以上）を要するため、本研究においても糖尿病罹病期間 2-12 ヶ月の streptozotocin 誘発糖尿病 mouse を使用した。Mouse の一側の下肢筋肉内に $1 \times 10^5 \sim 10^7$ 個の p75^{NTR} 陽性細胞を移植し、対側下肢には生理食塩水を投与した。4 週後、DPN の治療効果の判定にあたり、生理学的検査として NCV, 知覚電流閾値, thermal plantar test, tactile monofilament test、神経内及び皮膚血流量を評価した。

6) NCC の移植後の分布及び分化の評価：回収した組織片に対し、蛍光免疫染色法により GFP と Schwann 細胞 marker (GFAP, S100b, P0) が共発現しているか否か、神経軸索との contact を b-III-tubulin, peripherin, PGP9.5 などの neural marker を用いて評価した。また、血流障害への関与を評価するため smooth muscle cell への分化については α -SMA に対

する免疫染色法を施行し確認した。

4. 研究成果

1) iPSC から NCC への分化誘導と血管新生因子及び神経栄養因子産生：NCC と想定される抗 p75 抗体陽性細胞 (p75+) は、神経堤細胞マーカーである Snail, Sox10 および PAX3 を発現していた。さらに、p75+ は neurotrophic factors (NGF, NT3, GDNF, BDNF) および angiogenic factors (VEGF, bFGF) を発現しており、分化誘導前の iPS 細胞と比べてそれらの mRNA 発現量が著明に増加していた。

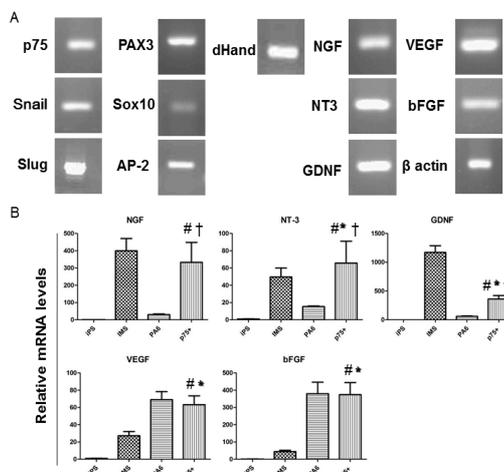


図1 神経堤細胞マーカーおよび栄養因子の発現

2) iPSC より分化誘導した NCC の *in vitro* での Schwann 細胞への分化：*in vitro* において、p75+ の neuron, glia cell および平滑筋細胞への分化が認められた。

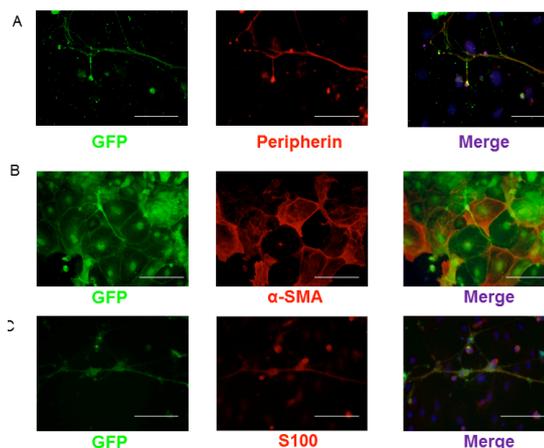


図2 p75+の分化能

3) Streptozotocin 誘発糖尿病 mouse において DPN 発症後に NCC を下肢筋肉内へ移植し、

DPN に対する治療効果の判定：NCC 移植により、DM で低下した下肢知覚機能や下肢 MNCV、SNCV および足底血流が改善するとともに、DM で低下した表皮内神経線維密度や毛細血管数が有意に増加した。

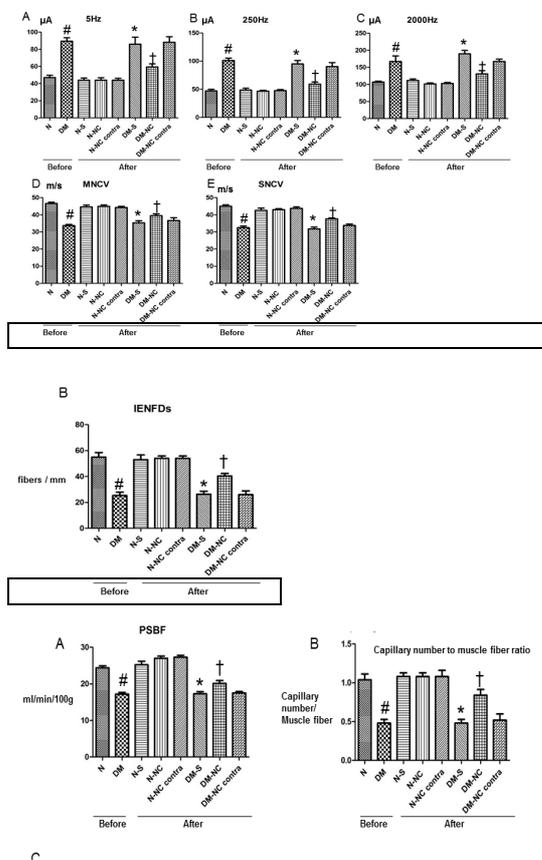


図3 神経障害に対する NCC 移植の効果

4) NCC の移植後の分化の評価：NCC を移植した部位の筋肉組織において、蛍光免疫染色法により GFP と Schwann 細胞の marker である S100 あるいは smooth muscle cell の marker である α -SMA が共発現している細胞が認められ、移植された NCC が移植後に Schwann 細胞および smooth muscle cell に分化した可能性が示唆された。

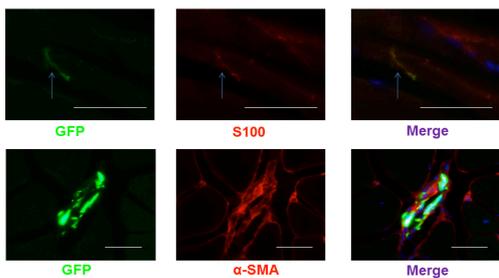


図4 NCC の移植後の分化

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 7 件)

①Himeno T, Kamiya H, Naruse K, Ozaki N, Seino Y, Shibata T, Kondo M, Kato J, Okawa T, Fukami A, Hamada Y, Inagaki N, Seino Y, Drucker D. J, Oiso Y, Nakamura J、Beneficial effects of exendin-4 on experimental polyneuropathy in diabetic mice. *Diabetes*, 査読有, 60, 2011, 2387-2406

②Naruse K, Sato J, Funakubo M, Hata M, Nakamura N, Kobayashi Y, Kamiya H, Shibata T, Kondo M, Himeno T, Matsubara T, Oiso Y, Nakamura J.

Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells improves mechanical hyperalgesia, cold allodynia and nerve function in diabetic neuropathy. *PLoS ONE*, 査読有, 6, 2011, e27458

③Okawa T, Kamiya H, Himeno T, Kato J, Seino Y, Fujiya A, Kondo M, Tsunekawa S, Naruse K, Hamada Y, Ozaki N, Cheng Z, Kito T, Suzuki H, Ito S, Nakamura J, Isobe K. Transplantation of neural crest like cells derived from induced pluripotent stem cells improves diabetic polyneuropathy in mice. *Cell Transplant*, 査読有, 22, 2013, 1763-1783

④ Himeno T, Kamiya H, Naruse K, Cheng Z, Ito S, Kondo M, Okawa T, Fujiya A, Kato J, Suzuki H, Kito T, Hamada Y, Oiso Y, Isobe K, Nakamura J. Mesenchymal stem cell-like cells derived from mouse induced pluripotent stem cells ameliorate diabetic polyneuropathy in mice. *Biomed Res Int*, 査読有, 2013. DOI: 10.1155/2013/259187

⑤成瀬桂子、柴田大河、中村二郎、糖尿病

性神経障害の治療 4 再生医療、月刊糖尿病、査読無、vol.3、2011、pp.88-95

⑥中村二郎、糖尿病性神経障害治療の新たな展開、Modern Physician、査読無、vol.32、2012、pp.995-999

⑦中村二郎、神谷英紀、糖尿病性神経障害に関する最近の話題、Diabetes Journal、査読無、vol.40、2012、pp.121-128

[学会発表] (計20件)

①姫野龍仁、高齢マウス骨髄系樹状細胞由来人工多能性幹細胞により分化した間葉系幹細胞様細胞の糖尿病性多発神経障害に対する治療効果の検討、第54回日本糖尿病学会年次学術集会、2011年5月19日、札幌

②大川哲司、マウス iPS 細胞由来 p75 陽性細胞移植の糖尿病性多発神経障害に対する治療効果の検討、第54回日本糖尿病学会年次学術集会、2011年5月19日、札幌

③秦正樹、歯髄幹細胞の糖尿病性神経障害に対する治療効果の検討、第54回日本糖尿病学会年次学術集会、2011年5月19日、札幌

④大川哲司、マウス iPS 細胞由来神経堤細胞移植の糖尿病性多発神経障害に対する治療効果の検討、第26回日本糖尿病合併症学会、2011年10月14日、大宮

⑤姫野龍仁、高齢マウス由来人工多能性幹細胞より分化誘導した間葉系幹細胞の糖尿病性多発神経障害に対する治療効果の検討、第26回日本糖尿病合併症学会、2011年10月14日、大宮

⑥大川哲司、マウス iPS 細胞由来神経堤細胞移植の糖尿病性多発神経障害に対する治療効果の検討、第26回日本糖尿病・肥満動物学会、2012年2月17日、名古屋

⑦近藤正樹、糖尿病性末梢神経障害に対する骨髄単核球移植治療の効果、第26回日本糖尿病・肥満動物学会、2012年2月17日、名古屋

⑧姫野龍仁、高齢マウス由来人工多能性幹細胞より分化誘導した間葉系幹細胞の糖尿病性多発神経障害に対する治療効果の検討、第26回日本糖尿病・肥満動物学会、2012年2月17日、名古屋

⑨近藤正樹、皮膚線維芽細胞球状凝集化により作製した多能性幹細胞由来神経前駆細胞移植療法(DPN)に対する治療効果の検討、第55回日本糖尿病学会年次学術集会、2012年5月17日、横浜

⑩秦正樹、糖尿病性神経障害に対するヒト歯髄幹細胞移植治療の検討、第55回日本糖尿病学会年次学術集会、2012年5月17日、横浜

⑪神谷英紀、iPS 細胞を用いた糖尿病性多発神経障害に対する治療効果の検討、第27回日本糖尿病合併症学会、2012年11月2日、福岡

⑫近藤正樹、皮膚線維芽細胞球状凝集化により作製した多能性幹細胞由来神経前駆細胞移植療法(DPN)に対する治療効果の検討、第27回日本糖尿病合併症学会、2012年11月2日、福岡

⑬神谷英紀、糖尿病性神経障害の根本的治療と再生を目指して、第56回日本糖尿病学会年次学術集会、2013年5月16日、熊本

⑭大見真衣子、長期糖尿病性神経障害に対する歯髄幹細胞移植療法の治療効果、第56回日本糖尿病学会年次学術集会、2013年5月16日、熊本

⑮近藤正樹、皮膚幹細胞球状凝集体から誘導された神経前駆細胞を用いた DPN 移植治療、第56回日本糖尿病学会年次学術集会、2013年5月16日、熊本

⑯近藤正樹、皮膚幹細胞球状凝集体由来神経前駆細胞を用いた糖尿病性多発神経障害(DPN)移植治療の検討、第28回日本糖尿病合併症学会、2013年9月13日、旭川

⑰ Okawa T, Transplantation of p75

positive cells derived from mouse iPS cells ameliorates diabetic polyneuropathy in mice. The 71st the American Diabetes Association Scientific Sessions, 2011.6.26, San Diego, USA

⑱ Himeno T, Transplantation of mesenchymal stem cell-like derived from mouse induced pluripotent stem cells improves diabetic polyneuropathy in mice. The 71st the American Diabetes Association Scientific Sessions, 2011.6.26, San Diego, USA

⑲ Kondo M, Transplantation of neural progenitor-like cells derived from spheroidal dermal cells improves diabetic polyneuropathy in mice, The 72th the American Diabetes Association Scientific Sessions, 2012.6.10, Philadelphia, USA

⑳ Kondo M, Transplantation of Induced neural crest cells from spheroidal dermal stem cells improves diabetic polyneuropathy in mice, The 73th the American Diabetes Association Scientific Sessions, 2013.6.23 Chicago, USA

〔図書〕(計 3件)

①中村二郎、新興医学出版社、糖尿病診療 up to date、2012、pp.995-999

②神谷英紀、中村二郎、中外医学社、Annual Review 2013 糖尿病・代謝・内分泌、2013、pp.39-45

③神谷英紀、中村二郎、中山書店、Visual 糖尿病臨床のすべて、2013、pp.179-186

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村二郎 (NAKAMURA, Jiro)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：40283444

(2) 研究分担者

磯部健一 (ISOBE, Kennichi)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：20151441

神谷英紀 (KAMIYA, Hideki)
愛知医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70542679

成瀬桂子 (NARUSE, Keiko)
愛知学院大学・歯学部・准教授
研究者番号：30387576

(3) 連携研究者

()

研究者番号：