

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791229

研究課題名(和文) ES細胞由来神経幹細胞を用いた、脳性麻痺に対する革新的な神経再生療法の開発

研究課題名(英文) Stem cell therapy for neonatal hypoxia-ischemia

研究代表者

朱 鵬翔 (Zhu, Pengxiang)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40380216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：小児脳性麻痺に対する新しい神経再生治療法の開発を目的とし、生後6日目のSCIDマウスの片側総頸動脈を永久閉塞後、一時間の低酸素負荷を行い、脳性麻痺モデルマウスを作成した。そして胚性幹細胞より分化誘導して作成した神経幹細胞を、障害半球の脳実質に注入した。その結果open fieldを用いた行動評価では、未治療群に比して治療群で有意な改善効果を認めた。さらに組織学的検討で障害半球における神経障害が治療群では有意に改善した。この結果は移植したES細胞由来神経幹細胞が、脳性麻痺モデル動物の神経障害を改善することを示唆しており、小児脳性麻痺に対する胚性幹細胞を用いた神経再生療法の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neonatal hypoxic-ischemic insult is one of the most significant cause of pediatric encephalopathy and spastic cerebral palsy. Although the developing brain's plasticity allows for remarkable self-repair, severe disruption of normal myelination and cortical development upon neonatal brain injury are likely to generate life-persisting sensory-motor and cognitive deficits in the growing child. Currently, no treatments are available that can address the long-term consequences. Thus, regenerative medicine appears as a promising avenue to help restore normal developmental processes in affected infants. Here we have demonstrated that neural stem cells derived from embryonic stem cells have shown protective effects on hypoxic-ischemic insults. Our results have suggested that stem cell therapy has proven effective in promoting functional recovery in animal models of neonatal hypoxic-ischemic injury and therefore represents a hopeful therapy for this unmet medical condition.

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：新生児医学 脳性麻痺 再生医学 胚性幹細胞 神経前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

小児脳性麻痺は、生後4週までに何らかの原因で受けた脳の損傷によって引き起こされる運動機能障害を示す症候群である。脳性麻痺の発症率は、出生児千人に対しおよそ2人であり、小児脳障害の中で最も発症頻度が高い疾患である。

脳性麻痺は一旦発症すると生涯にわたり身体・精神の機能およびQOL(生活の質)を著しく損なう難治性の神経疾患である。しかしながら、脳性麻痺に対する根本的な治療法はなく、リハビリテーション等の対症療法を行っているのが現状である。更に脳性麻痺の子供の90%以上が成人となるので、脳性麻痺患者の介護を含めた医療費は膨大なものとなっている。従って、脳性麻痺の治療法の開発は社会的にも重要な課題と考えられる。

2. 研究の目的

近年脳性麻痺に対する根本的な治療法の試みとして、各種組織幹細胞を用いた再生治療が試みられている。幹細胞のうち、胚性幹細胞(ES細胞)は全ての幹細胞に分化する万能幹細胞であり、理論上無限の増殖能を持ち、目的の幹細胞に分化・誘導することで、十分な量の幹細胞を確保することが可能である。従ってES細胞から神経幹細胞への分化誘導を確実に行うことが可能になれば、(倫理上の問題を別にすれば)ES細胞は臨床上大変有用な幹細胞と考えられる。

最近ES細胞を特殊コートをした培養プレートで分化専用培地で培養すると、浮遊したES細胞同士が凝集して浮遊細胞塊を形成し、約8割のES細胞が神経幹細胞に分化することが見いだされた。この手法はSFEB(serum-free floating culture of embryoid body-like aggregate)法と名付けられ、報告されている(Nature Neurosci. 8:283-296, 2005)。またNodalシグナルやWntシグナルは初期の神経分化に対して抑制的に働くことが知られているので、SFEB法を改良し、ES細胞のNodalおよびWntシグナルをLefty-A及びDKK(Dickkopf)-1にて阻害してやるとほぼ全てのES細胞が神経幹細胞に分化することが見いだされた(PNAS USA. 105:11796-801, 2008)。更に終脳

(大脳)に特異的な転写因子であるFoxG1を発現している神経幹細胞をFACS sorterにて分離することで、大脳特異的神経幹細胞を100%分離することが可能となった(Cell Stem Cell 3:519-32, 2008)。

そこで本研究はマウスES細胞から分化誘導して作成した大脳特異的神経幹細胞を脳性麻痺モデルマウスに移植し、小児脳性麻痺に対する革新的な神経再生療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

1) 動物:

本実験にはSCIDマウス新生児を用いた。実験動物をその母親と一緒に一定の明暗サイクル及び温度(22±1)条件下に飼育し、餌と水は自由摂取とした。以下の実験は愛媛大学医学部倫理委員会の承諾を得た後、愛媛大学医学部動物実験指針に則り行われた。

2) マウスES細胞から神経幹細胞への分化誘導:

Wataya等の方法(PNAS USA. 105: 11796-801, 2008)に従い、SFEB(serum-free floating culture of embryoid body-like aggregate)法にてマウスES細胞から神経幹細胞への分化誘導を行なった。この手法はfeeder cellや血清を全く使用しないので、安定した結果を得られる手法として知られている。

3) 大脳皮質特異的神経幹細胞の単離と未分化細胞の除去:

Eiraku等の方法(Cell Stem Cell 3:519-32, 2008)に従い、大脳に特異的なregional markerであるFoxG1遺伝子座にVenus遺伝子をレポーター遺伝子としてノックインしたES細胞株(FoxG1::venus株)をSFEB法で神経幹細胞に分化させた後、FoxG1遺伝子を発現しVenusの蛍光(緑色)を発している細胞をFACS Sorterにて分離した。これにより大脳皮質特異的神経幹細胞を単離すると同時に、未分化細胞の混入による腫瘍の発生を防ぐことが可能となった。

4) 脳性麻痺モデルマウスの作成:

SCIDマウス生後6日目を用い、片側総頸動脈を永久閉塞後、1時間の低酸素負荷(hypoxia-ischemia stress)を行い脳性麻痺モデルマウスを作成した。

5) 大脳皮質特異的神経幹細胞の移植

低酸素負荷後、上記2 - 3)の方法により作成した、約100万個の大脳皮質特異的神経幹細胞を、開頭した後、総頸動脈を閉塞した同側大脳半球に注入した。

6) 行動評価:

空間認知障害の程度を検討するために、大脳皮質特異的神経幹細胞注入後4週目にOpen field試験を施行した。60cmx60cm四方の亚克力箱に60分間マウスを入れ環境に順化させた。そして引き続き30分間マウスの活動性を5cm間隔で配置した赤外線センサーにて計測した。その後照明をoffとして暗室とし同様に活動性を検討した。

7) 免疫染色:

ペントバルビタールにて深麻酔し、4%のバラフォルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液で経心的に灌流固定した。その後4で一晩、同固定液に浸漬した。その後パウダードライアイスで急速凍結後、Oct compoundに包埋し、cryostatにて厚さ8ミクロンの切片を作成した。その後、10%正常ヤギ血清にて30分間インキュベートした後、一次抗体として抗MAP2抗体(mouse monoclonal Ab: Sternberger)を用いて2時間インキュベートした。次いで二次抗体としてBiotinylated horse anti-mouse IgGを用い30分間インキュベートした。最後にVectastain ABC試薬で30分間インキュベートした後、peroxidase substrate solutionで15分インキュベートした。

8) 統計的処理:

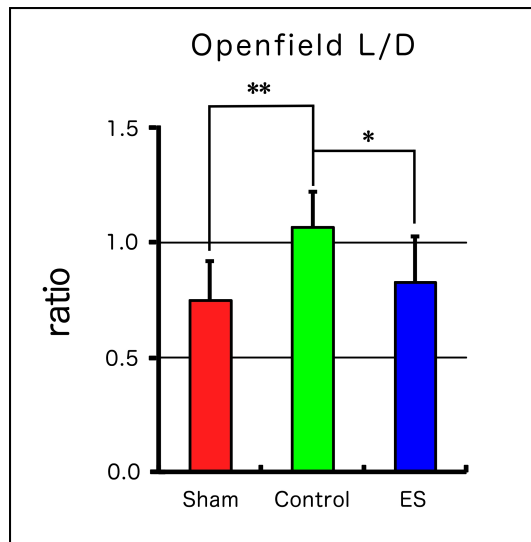
各分析データはOne way analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparison testにて評価し、p値が0.05以下を有意とした。全てのデータはmean ± SDにて表記した

4. 研究成果

1) 行動評価:

図1に示す様に、大脳皮質特異的神経幹細胞移植群(ES群)は非移植群(Control群)に比して有意に、明室での自発運動活性の抑制が改善した(** P < 0.01; * p < 0.05)。sham: sham-operation 群

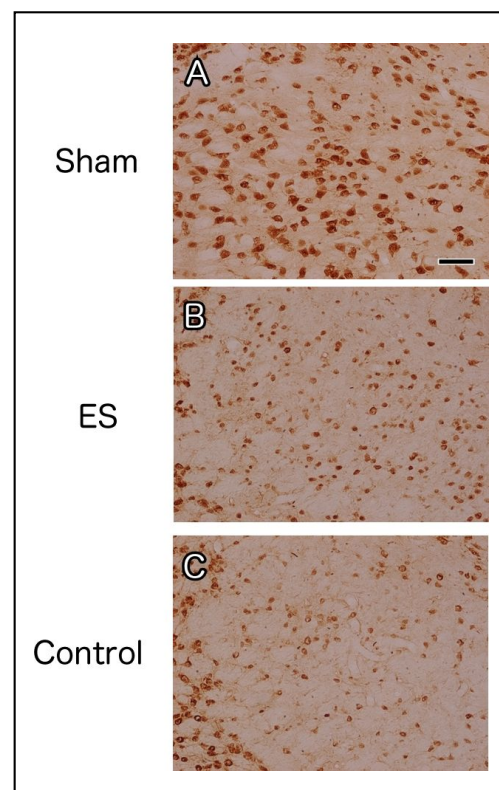
図1: 昼夜の自発運動活性比:



2) 線条体における神経障害

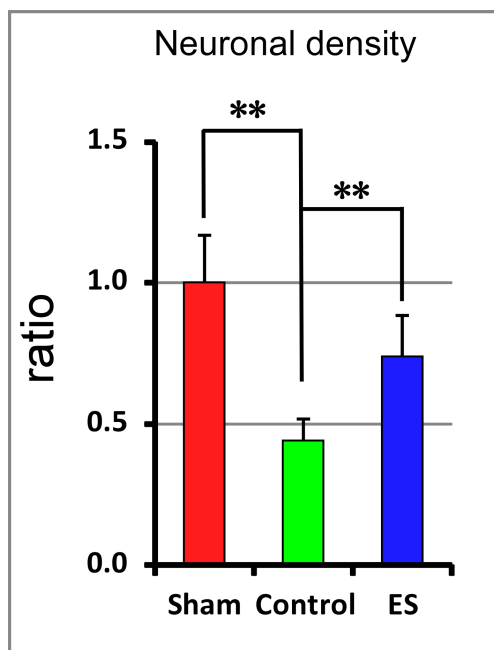
図2に示す様に、移植後1ヶ月目に線条体での神経細胞数をMAP2染色にて確認した。その結果大脳皮質特異的神経幹細胞移植群(ES群)は非移植群(Control群)に比して明らかに神経細胞傷害が軽減していることが明らかとなった。scale bar = 50 μm
sham: sham-operation 群

図2: 線条体におけるMAP2染色



更に図3に示す様に、残存神経細胞密度を検討すると、大脳皮質特異的神経幹細胞移植群(ES群)は非移植群(Control群)に比して、有意に神経細胞密度比の改善を認めた。sham: sham-operation群

図3：線条体における神経密度比



3) 結語：

小児脳性麻痺モデルマウスにES細胞から分化誘導した大脳皮質特異的神経幹細胞を移植したところ、有意に自発運動活性が改善し、低酸素-虚血傷害による神経細胞死の改善を認めた。以上の結果は小児脳性麻痺に対して、神経幹細胞を用いた細胞移植療法が有用であることが示唆された。さらにES細胞から分化誘導した大脳皮質特異的神経幹細胞を用いることにより、大量の神経幹細胞を用意することが可能となり、臨床応用への道を開く結果になると考えられた。

尚、当初我々はICRマウスに大脳皮質特異的神経幹細胞移植を行い実験を行っていた。その結果ICRマウスでは脳皮質特異的神経幹細胞移植を行っても、新生児マウスの低酸素-虚血傷害は改善しなかった。また組織学的にもマイクログリア様のIBa-1陽性細胞の活性化を認めた。この為、免疫系のT・B細胞を欠損しているSCIDマウスを用いて検討を行い、良好な結果を得た。

このことは、細胞移植療法において免疫系の関与が大変重要であることを示唆している。このため、将来的には自己の細胞から作成可能なiPS細胞を用いて、神経幹細胞を作成し、細胞療法を行うことが理想的であると考えられた。

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. Zhu P, Hata R, Ogasawara M, Cao F, Kameda K, Yamauchi K, Schinkel AH, Maeyama K, Sakanaka M.: Targeted disruption of organic cation transporter 3 (Oct3) ameliorates ischemic brain damage through modulating histamine and regulatory T cells. J Cereb Blood Flow Metab. 32: 1897-908, (2012) 査読有

2. Taguchi A, Zhu P, Cao F, Kikuchi-Taura A, Kasahara Y, Stern DM, Soma T, Matsuyama T and Hata R.: Reduced ischemic brain injury by partial rejuvenation of bone marrow cells in aged rats. J Cereb Blood Flow Metab. 31: 855-67, (2011) 査読有

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.m.ehime-u.ac.jp/data/course/list_detail.php?id=201100000037

6. 研究組織

(1)研究代表者

朱 鵬翔 (Zhu Pengxiang)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40380216