

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500381

研究課題名(和文) 移植神経細胞を介した神経回路網の再構築を基盤とした新規細胞治療モデルの開発

研究課題名(英文) The development of novel cell-replacement therapy based on reconstruction of neural network via transplanted neural cells

研究代表者

出口 誠 (IDEGUCHI, Makoto)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：10452640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ES細胞からMS5ストローマ細胞との共培養により誘導した神経前駆細胞は前脳背側の遺伝子プロファイルを有し、その特異的存在部位である前脳背側、皮質深層へ移植される事により正常解剖に準じた正確な軸索伸長が観察された。逆にその部位特異的な遺伝子プロファイルを有しない細胞、脊髄神経前駆細胞を皮質深層へ移植されても、正常解剖に準じた正確な軸索伸長を示さなかった。この事実は実際に神経細胞移植による細胞代替・補充療法を行う事を想定した場合、その機能部位特異的な遺伝子プロファイルを有する神経前駆細胞を誘導し、更にその部位特異的に正確に移植する必要性がある事を示す結果である。

研究成果の概要(英文)：Neural progenitor cells derived from ES using MS5 stromal cells-coculture method possess gene profiling of forebrain-dorsal portion. These neural progenitor cells transplanted into the deep cortical layer of dorsal forebrain extended many axons into target area of white matter based on normal neural anatomy. On the other hand, spinal-neural progenitor cells that do not possess the area-specific gene profiling did not reveal correct axonal projection based on normal neural when transplanted into cortical deep layer. These results showed that the significance of neural induction possessing area-specific gene profiling in central nervous system and of transplantation of these progenitor cells into their preferable area for survival, differentiation and making correct neural network in case of progressing a practical cell replacement or alternative therapy using neural progenitor cells-implantation.

研究分野：脳神経外科学

 キーワード：胚性幹細胞 大脳皮質錐体細胞 領域特異的軸策投射 神経回路網 領域特異的遺伝子プロファイリン
ゲ

1. 研究開始当初の背景

世界でも比類なき高齢化社会を迎えている我が国において、様々な神経損傷・変性疾患に対するこれまでの医療を根本的に変革する可能性のある幹細胞を用いた再生医療は大いに期待される。中でも iPS 細胞は世界に先駆けて我が国において樹立され、医療用ソースとして期待も高まっている。今後実際に臨床応用されていく上で、その有効性を十分に証明する必要がある。これまで、胚性幹細胞を至適条件下で神経細胞へ分化誘導を行うと、遺伝子発現プロファイル上も形態学的にも生体内大脳皮質錐体細胞とほぼ同等の神経細胞へ分化可能である事を証明してきた (Ideguchi M, et al., J Neurosci. 2010)。この成果を踏まえた上で、次の段階としてこの細胞を実際の生体内へ移植し、宿主細胞と同等に神経回路網を形成し、正確に機能させる事を証明する事をこの研究の最終目的とする。

2. 研究の目的

(1) 大脳皮質各部位は、それぞれ対応する白質領域と特異的に神経回路網を形成する。この特異的な軸索投射、神経回路網形成能力を移植された ES 細胞由来神経前駆細胞 (ES-NPCs) が同等に有するのか否かを明らかにする。

(2) 次に ES-NPCs が各皮質領域特異的に正確な軸索投射性錐体細胞へ分化し、かつ適切な神経回路網を形成する上で、大脳皮質錐体細胞に特異的な発現遺伝子プロファイルを有する事の重要性について検討する。ES 細胞を分化誘導する上でレチノイン酸の濃度を調整する事により、前脳～中脳～後脳、背側～腹側、頭側～尾側 (脊髄) のそれぞれの領域特異的な発現遺伝子プロファイルを有する神経前駆細胞への誘導が可能である (Fig.1) (Okada Y, et al., Dev Biol. 2004)。この領域特異的なそれぞれの神経前駆細胞

を運動野大脳皮質に移植する事により、分化能、神経回路網形成能に差が出るのか否かを検討する。

Figure 1

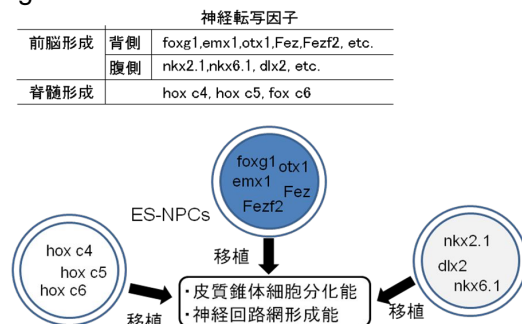


3. 研究の方法

(1) まず GFP (Green Fluorescence Protein) ES 細胞株を用い、マウスストローマ細胞株との共培養法 (Barberi, T., et al., Nat Biotechnol, 2003) を改変した方法を用いて神経分化誘導を行う。次に P3 マウス大脳各部位 (運動野、感覚野、視覚野) の皮質深層 (第 5 層) へ移植し、3 週間後に GFP 蛋白に対する DAB を用いた免疫染色法により軸索投射の特異性を評価する。

(2) 次に ES-NPCs の遺伝子発現プロファイルが、移植後宿主脳内において神経分化、神経回路網形成能にどの様に影響するのか検討する。具体的には、胚様体・レチノイン酸添加による神経分化誘導法 (Okada Y, et al., Dev Biol. 2004) を用いて、脊髄運動神経前駆細胞を誘導する。次に RT-PCR 法を用いて、脊髄神経に特異的な遺伝子のみを発現し、前脳形成に必要な神経転写因子の発現が無い事を確認する (Fig.2)。

Figure 2



(3)最後に、レチノイン酸誘導脊髄神経前駆細胞を運動野、感覚野、視覚野の各皮質深層へ移植し、GFP 蛋白に対する免疫染色を用いて、遺伝子発現の特異性が実際の形態学的な分化能、及び神経回路網形成能にどのような影響を及ぼすのか評価する。

4. 研究成果

(1)まず、マウスストローマ細胞株との共培養により神経分化誘導し前脳背側の遺伝子プロファイリング (Otx1, Emx1, Fez, FoxG1) を有する ES-NPCs を運動野、感覚野、視覚野各皮質深層へ移植した。結果、ES-NPCs は皮質深層に生着して大脳皮質錘体細胞へ分化し、部位特異的な軸索伸長効果を示した。つまり、運動野からの軸索は脳内から脊髄錐体路、橋腹側まで伸長し、感覚野からは視床・上丘腹側、視覚野からは上丘背側への伸長が見られた (Fig. 3)。

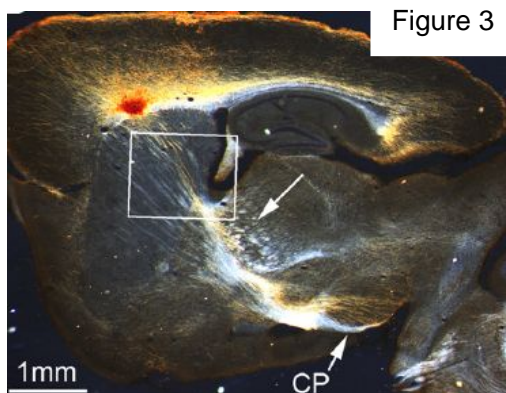


Figure 3

(2)Okada らの報告を参考に ES 細胞を胚様体形成させつつ比較的高濃度のレチノイン酸で処理し、神経分化誘導を行った。これを前脳系の転写因子について RT-PCR を行った所、前脳背側に規定される神経転写因子を全く発現していない事が示された (Fig. 4)。

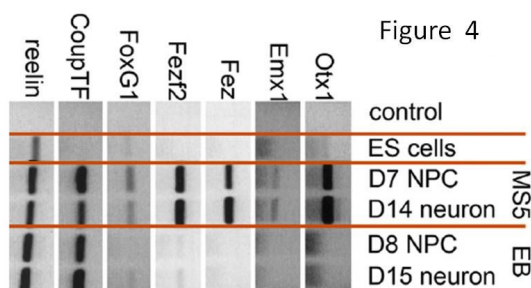


Figure 4

この胚様体・レチノイン酸誘導脊髄神経前駆細胞を、ES-NPCs と同様に、大脳皮質各部位 (運動野、感覚野、視覚野) へ移植した。その結果、細胞の生着から成熟した神経細胞への分化はみられたものの、軸索伸長はほとんどみられず、また伸長した軸索も解剖学的に正確な投射部位に従わず、全く無目的なものであった (Fig. 5)。

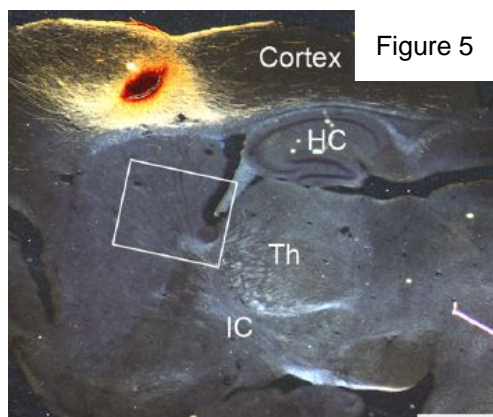


Figure 5

以上より、ES 細胞から MS5 ストローマ細胞との共培養により誘導した神経前駆細胞は前脳背側の遺伝子プロファイルを有し、その Niche である前脳背側、皮質深層へ移植される事により正常解剖に準じた正確な軸索伸長が観察された。また、部位特異的な特徴を示す遺伝子プロファイルは、その移植される細胞の Niche では無い部位へ移植されても、正常解剖に準じた正確な軸索伸長を示さなかった。つまり、この事実は実際に神経細胞移植による細胞代替・補充療法を行う事を想定した場合、その機能部位特異的な遺伝子プロファイルを有する神経前駆細胞を誘導し、更にその部位特異的に正確に移植する必要性がある事を示す結果である。この研究結果は将来的な神経細胞移植療法の発展に寄与すると考えられる。

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1件)

Ideguchi M, Shinoyama M. et al.,
題 目 : Cortical region-specific
engraftment of embryonic stem
cell-derived neural progenitor cells
restores axonal sprouting to a subcortical
target and achieves motor functional
recovery in a mouse model of neonatal
hypoxic-ischemic brain injury.
雑誌名: Frontiers in Cellular Neuroscience
査読有、7 巻、2013、p128
DOI: 10.3389/fncel.2013.00128

〔学会発表〕(計1件)

出口誠

演題: ES 細胞由来神経前駆細胞を用いた低
酸素性虚血性脳症モデルマウスに対する細
胞療法

第 15 回日本再生医療学会総会

2016 年 3 月 18 日

大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

〔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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

出口 誠 (IDEGUCHI , Makoto)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号 : 1 0 4 5 2 6 4 0

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし