

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791230

研究課題名(和文) てんかんミュータント由来胚性幹細胞を用いた胎生期てんかん原生の解明と治療への応用

研究課題名(英文) Establishment of in vitro system to elucidate the mechanism underlying epileptogenesis in EL mice at an early neurodevelopmental stage and its therapeutic application

研究代表者

大津 昌弘 (OTSU, Masahiro)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：20510019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：樹立したELマウス由来ES細胞の分化誘導においては、NSS法を適宜改良して用いた結果、浮遊培養(4日間)に伴い、効率良くEmx1陽性神経系細胞へと分化した。また、浮遊培養を更に継続した場合、分化した神経幹細胞が神経細胞のみならず、アストロサイトへと分化する傾向が強い事が示された。この多分化能に関わる性質は、C57BL/6由来のES細胞とは異なった。よって、増殖因子等を積極的に加えていないNSS法での浮遊培養条件においては、神経系細胞への終末分化に関わる因子への応答性などELマウス由来NSCの生物学的特徴を反映したものと推測した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to establish in vitro system to detect and recapitulate the unusual phenomena which could cause iktogenesis and epileptogenesis in EL mice at an early stage of neurodevelopment. To develop this system, EL-mice derived embryonic stem cells (EL-ESCs) were established. To analyze the processes of neural differentiation of EL-ESCs by modified NSS method which is a simple method to induce uni-directional differentiation of ESCs into neural stem cells (NSCs), EL-ESCs uni-directionally differentiated into NSCs as well as HK-ESCs which are derived from B57BL/6 mice as control. However, long term culture (at least 6 days under differentiation condition) promoted astrocytogenesis of EL-ESCs-derived NSCs, whereas NSCs derived from HK-ESCs mainly generating neurogenesis in this period. By contrast, NSCs established from both EL-ESCs and HK-ESCs normally proliferated under the proliferative condition.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：胚性幹細胞(ES細胞) ヒト側頭葉てんかん 自然発症モデル ELマウス てんかん原性獲得 神経幹細胞 神経発達異常

1. 研究開始当初の背景

(1) てんかんとは、「皮質神経細胞の同期的な過剰興奮が発作となり、これが反復的に発生する」ことである。

てんかんの有病率は総人口の 1% 近くにとり、症候性てんかんのうち外科的処置の適用が困難な難治てんかんの場合、多くの場合、特有の精神障害を伴い、抗てんかん薬 (Anti Epileptic Drugs: AEDs) を生涯にわたって服薬しなければならず、根治療法は無い。したがって、発作及びてんかんの発症メカニズムの解明は、効果的な治療法開発に繋がり、対処療法に関わる様々な医療費の削減のみならず、てんかんが初発する前に適切な措置を取り、発症を防ぐ「予防医療の観点」からも極めて重要である。ただし、てんかん患者を対象とした研究は重要ではあるが、ゲノムに加えて発作履歴や抗てんかん薬の服薬履歴、年齢等の様々な要因が患者ごとに異なる上に、神経病理的所見の解釈に注意が必要な場合が多い (Mistry M. et al., Neuroscience 167: 384, 2010) ことから、モデル動物等を用いた再現性の高い研究アプローチが突破口となると思われる。

(2) EL マウスは、日本で樹立されたヒト側頭葉てんかんの自然発症モデル動物である。

EL マウスは、日本で樹立されたヒト側頭葉てんかんの自然発症モデル動物である (今泉ら、Exp. Anim. 8: 6, 1959)。脳波上で発作発射が確認されるなどの臨床的所見に加えて、発作の起始点である頭頂皮質での興奮性神経伝達物質グルタミン酸/抑制性神経伝達物質 GABA 作動系の不均衡異常部位の存在、発作の伝播・全般化に関わる海馬における DNA フラグメンテーションなどの様々な生化学的・神経病理学的所見においてもヒト側頭葉てんかんと共通する優れたモデル動物として注目を集めている (Murashima YL et al., Neurosciences 18: 63, 1992, Todorova MT,

et al., Epilepsia 40: 1697, 1999)。EL マウスは、生後 3 週目からの放り上げ刺激 (発作誘発刺激) により、8 週目から強直間代性けいれんを主とする発作を獲得する。その上、反復性の発作によって、てんかんの発作自体が起こりやすくなる「異常可塑性」と呼ばれる異常な学習過程を再現できる特徴を持つ。この優れたモデル動物を用いて、これまでに EL マウスのてんかん焦点となる頭頂皮質の限られた領域において GABA 量とその生合成酵素活性の低下及び、海馬におけるそれらの増加など、発作原性・てんかん原性獲得に関わる異常が発作初発前の生後 3 週齢から確認されている ((Murashima YL et al., Epilepsy Res 26: 3, 1996)。

しかし、発作初発前から発作につながる素因が細胞自体に存在するものと考えられるものの、その異常が神経発生過程 (幹細胞増殖期: 神経系細胞の総数を増加させる為の対称分裂期、もしくは神経系細胞分化期: 種々の機能性細胞への分化につながる非対称分裂期) のいつ頃から生じるのか、又、神経細胞のみならず、神経幹細胞やグリア細胞にも異常があるのか等、多くの不明な点がある。更に、これを解析するには神経回路を一部保持する脳スライス切片培養系及び、分化・成熟化した細胞群を得られる初代培養系では初期神経発生過程の再現が困難であり、新たな研究のアプローチが必要である。

(3) ES 細胞や、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は無限の自己増殖能と全ての体細胞への分化能を持つ。

ES 細胞や、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は無限の自己増殖能と全ての体細胞への分化能を持つ。その為、細胞移植治療などの再生医療における応用利用が期待されている (Evans M., Nat Rev Mol Cell Biol. 12: 680, 2011)。更に iPS 細胞は、発病者由来の体細胞を初期化して iPS 細胞を樹立、疾患に

関わる体細胞へと分化誘導することで疾患モデル細胞を調製することが可能である。このようにして得られたモデル細胞は発症過程を *in vitro* で再現でき、研究の困難だった難病の発症メカニズムの解明において強力な解析ツールとなる (Yamanaka S, et al., Nature 465: 704, 2010)。

2. 研究の目的

これまでに、研究代表者らはマウス及び、ヒト ES 細胞から神経細胞を短期間で大量に分化誘導する培養法 (Neural Stem Sphere (NSS) 法) を開発した。また、研究代表者らは NSS 法がマウス胚における初期神経発生を *in vitro* で忠実に再現する培養システムであることを報告している (Otsu M, et al., Neurosci Res 69: 314, 2011)。更に、この培養法を応用することで、均質な神経幹細胞を大量に調製出来る事、この神経幹細胞から神経細胞及び、グリア細胞を選択的に分化誘導・調製出来ることを研究代表者らは報告している。その上、長期培養により、ES 細胞は GABA 作動性神経細胞等の機能性神経細胞へも分化する。そこで、これらの ES 細胞培養技術及び、神経系細胞への分化誘導技術を応用して、EL マウスの発作及びてんかん原性獲得に関わる初期神経発達期の異常を *in vitro* で再現しようと試みた。

3. 研究の方法

(1) EL マウス由来 ES 細胞から神経幹細胞・神経細胞への分化誘導培養

EL マウスの桑実胚を子宮から単離後、フィーダー細胞上で LIF 含有 ES 細胞用培地を用いた培養を行い、ES 細胞 (ELESCs) を樹立した。形成された ELESCs のコロニーを、フィーダー細胞上からコラゲナーゼ処理によって分離して、培地等で洗浄後、塊のまま、非接着性ディッシュ中のアストロサイト条件培地 (ACM) の中に移して浮遊培養した。こ

の浮遊培養によって、ES 細胞コロニーは球状の細胞集合塊 (neural stem sphere: NSS) を形成する。この細胞集合塊の形成過程において ES 細胞は神経系細胞へと分化し、また、この発分化は胚発生における初期中枢神経系発生の時間変化と類似することが分かっている。そこで、EL マウスの初期神経発生過程における異常を検出するために、樹立した ELESCs から神経系細胞への分化の過程を詳細に解析した。異なる培養日数の細胞集合塊から total mRNA を抽出し、鋳型 cDNA を調製した。種々の細胞のマーカ遺伝子の特異的に増幅可能なプライマーを用いてリアルタイム RT-PCR 法を行い、各遺伝子の mRNA 量を定量的に解析した。

(2) EL マウス由来 ES 細胞から神経幹細胞の調製

ACM 中で浮遊培養を 4 日間行って形成された NSS を、マトリゲルコートしたディッシュ上に移して、接着培養した。このとき、神経幹細胞の増殖因子である塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) と上皮細胞増殖因子 (EGF) を含む培養液を用いる事で、接着した NSS の周囲に神経幹細胞を遊走させた。この神経幹細胞を回収し、増殖因子存在下で継代培養することによって均質な神経幹細胞を調製した。神経幹細胞の性質に関する解析は、種々の神経幹細胞マーカーをリアルタイム RT-PCR 法により解析した。

4. 研究成果

(1) 樹立した ELESCs は胚性線維芽細胞のフィーダー上で LIF 含有 ES 細胞用培地を用いることで、未分化に維持、培養する事が出来た。EL マウスの発作及びてんかん原性獲得に関わる初期神経発達期の異常を *in vitro* で検出する為、NSS 法を用いて得られた ES 細胞から神経系細胞へと分化誘導した。まず、ELESCs のコロニーをフィーダーから分離後、アストロサイト条件培地中で浮遊培養した。

浮遊培養に伴い、半球状だったコロニーが球状に変化して、浮遊培養4日目にはNSSと思われる細胞集合塊が形成された。更に浮遊培養を継続したところ、内胚葉、中胚葉、外胚葉系細胞から構成される胚様体の形成時にしばしば観られる不均一な形態の細胞塊や、細胞塊内部での内腔の形成などは観察されなかったことから、NSS法によってELESCsから形成された細胞集合塊は浮遊培養を長期間行っても比較的性質の同じ細胞集団から構成されている事が示唆された。次に、この分化過程を詳細に解析するため、リアルタイムRT-PCR法による遺伝子発現解析を行った。その結果、ES細胞マーカー(Oct4, Nanog)陽性だったELESCコロニーは、浮遊培養4日目までに、神経外胚葉マーカー(Sox1)、神経幹細胞マーカー(Nestin, Pax6, Musashi1)や神経細胞マーカー(NF-H, MAP2)陽性であり、発生領域についてはEmx1陽性のNSSへと変化していた。この間、原始内胚葉マーカー(GATA4)、中胚葉マーカー(Brachyury)の発現には変動が見られないことから、神経系を含む外胚葉系細胞に効率よく分化していた事が示された。浮遊培養を更に6日間から8日間まで継続したところ、神経系細胞であるアストロサイトマーカー(GFAP)の発現量が培養6日目から著しく増加した。その一方、オリゴデンドロサイトマーカー(MBP)については変動しなかった。

(2) 浮遊培養4日目のNSSをFGF-2及びEGF含有神経幹細胞用培地で接着培養した後に、周囲に遊走した神経幹細胞(ELNSCs)を回収して、継代培養して得た神経幹細胞の性質、遺伝子発現解析を行った。その結果、ELNSCsは種々の神経幹細胞マーカー(Nestin, Musashi1, Pax6, FABP7, Hes1)はC57BL/6由来ES細胞から調製したHKNSCsを比較して同程度発現していた。一方、神経幹細胞の増殖やグリア細胞への分化に関わるHes5や神

経幹細胞が神経細胞へと分化する際に、分裂停止等に関わるNecdinの発現はELNSCsで約10倍程度高発現であった。

これらの結果から、ELマウス桑実胚より樹立したES細胞(ELESCs)は、NSS法によって効率よくEmx1陽性の神経系細胞へと分化している事が示された。これまでに報告してきたC57BL/6由来のHKESCsではNSS法によって主に神経上皮細胞にあたる神経幹細胞に分化した後、長期間の浮遊培養に伴い、神経細胞へと分化する。一方、ELESCsは、浮遊培養期間中に神経幹細胞から神経細胞のみならずアストロサイトへと分化する事が確認された。浮遊培養に用いるACMには、アストロサイトから分泌された種々の栄養因子等は含まれると考えられるが、FGF-2やEGFはACM中に添加しておらず、積極的に神経幹細胞を増殖・維持する条件とは言えない。このような条件下でのELESCsの分化傾向の違いは神経幹細胞の幹細胞維持や多分化能の機構に異常があることを暗示するものと言え、大変興味深い。

次に、調製した神経幹細胞(ELNSCs)については、その増殖能や標準的な神経幹細胞マーカーの発現はHKNSCsと同程度の性質を維持していた。一方、Hes5やNecdinなどの神経系細胞への分化に関わる遺伝子発現については違いが見られた。この発現の違いは神経幹細胞の自己増殖能が低下している事を暗示しており、NSS法による分化誘導時に確認されたAstrocytogenesisに代表される分化傾向が神経幹細胞においても確認された事を示すものである。

最近、カイニン酸曝露による過剰興奮で生じるてんかん原性獲得には、生体内の神経幹細胞(Radial neural stem cells: rNSCs)からの神経新生の破綻と神経幹細胞の反応性アストロサイトへの形質変化が関与すると報告された(Cell Stem Cell. 2015 May 7;16(5):488-503)。また、てんかんや自閉症

などの様々な神経症状を示すレット症候群患者由来の体細胞から樹立した iPS 細胞を用いた研究においては、神経幹細胞の神経系細胞への分化に伴って、アストロサイトの割合が多くなるなど神経発生異常が報告されている (Mol Brain. 2015 May 27;8(1):31)。EL マウスに関しては、そのてんかん原性には登頂皮質の一部に限局した GABA 作動系の異常が、二次全般化においては海馬の GABA 作動系の異常が関与することが知られている。今回の研究で確認された、ELESCs の神経分化過程における神経細胞の発生からアストロサイトの発生への早期の転換などは、GABA 作動性神経細胞の供給量低下に直接、関与する可能性も考えられることから、大変興味深い。

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 4 件)

Otsu M, Nakayama T, Inoue N. Pluripotent stem cell-derived neural stem cells: From basic research to applications. World J Stem Cells. 2014 Nov 26;6(5):651-7. doi: 10.4252/wjsc.v6.i5.651. Review. PubMed PMID: 25426263, 査読有

Omori H, Otsu M, Suzuki A, Nakayama T, Akama K, Watanabe M, Inoue N. Effects of heat shock on survival, proliferation and differentiation of mouse neural stem cells. Neurosci Res. 2014 Feb;79:13-21. doi: 10.1016/j.neures.2013.11.005. PubMed PMID: 24316183, 査読有

Akama K, Horikoshi T, Nakayama T, Otsu M, Imaizumi N, Nakamura M, Toda T, Inuma M, Hirano H, Kondo Y, Suzuki Y, Inoue N. Proteomic identification of differentially expressed genes during

differentiation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) embryonic stem cells to astrocyte progenitor cells in vitro. Biochim Biophys Acta. 2013 Feb;1834(2):601-10. doi: 10.1016/j.bbapap.2012.12.002. PubMed PMID: 23232153, 査読有

Isono M, Otsu M, Konishi T, Matsubara K, Tanabe T, Nakayama T, Inoue N. Proliferation and differentiation of neural stem cells irradiated with X-rays in logarithmic growth phase. Neurosci Res. 2012 Jul;73(3):263-8. doi: 10.1016/j.neures.2012.04.005. PubMed PMID: 22561132, 査読有

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大津 昌弘 (OTSU, Masahiro)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号 : 20510019