

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 1 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461738

研究課題名(和文) 神経幹細胞移植による抑制性神経可塑性誘導の抗てんかん機構の解明と治療応用

研究課題名(英文) We have succeeded in controlling seizures by the transplantation of neural stem cells to the dorsal hippocampus of epileptic mutant EL mice.

研究代表者

村島 善也 (Murashima, Yoshiya)

首都大学東京・人間健康科学研究科・客員研究員

研究者番号：50182118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経幹細胞を背側海馬に移植することによって、てんかん発作がコントロールできたてんかんミュータントELマウス脳と移植した細胞をin vitroで培養し続けた細胞分化の差に注目し、てんかん脳を持つ神経可塑性の異常とその正常化過程を明らかにした。てんかん原性確立の際には様々な遺伝子の発達時期特異的発現が認められている。これがてんかん脳の神経可塑性異常の根拠である。一方、神経幹細胞をてんかん焦点の海馬に移植するとその分化誘導度に関わらず、抑制性神経細胞が誘導され、てんかん発作は消失した。これは神経可塑性の正常化といえる。この現象を解明し、治療に応用すれば、難治てんかん治療の飛躍的進歩が望める。

研究成果の概要(英文)：Pluripotent embryonic stem (ES) cells may differentiate into neurons in vitro. It has been shown that astrocyte-derived factors promote mouse ES cells to differentiate into neurons. Cultured in astrocyte-conditioned medium (ACM) under free-floating conditions, within 4 days, colonies of undifferentiated mouse ES cells give rise to floating spheres of concentric stratiform structure with a periphery of neural stem cells, which are termed NSS. Culturing the spheres on an adhesive substrate in ACM promotes neurogenesis, and cells in the spheres differentiate into neurons within 5 days. The mechanism was examined how neural stem cells (NSCs) transplanted to the hippocampus of EL brains differentiate into inhibitory neurons and play a role of preventing seizures. that brain regions involved in seizure formation, such as hippocampus and parietal cortex in EL mice, have a potency to control seizures by inducing inhibitory GAD neurons.

研究分野：神経可塑性

キーワード：神経幹細胞 移植 抑制性神経系 神経可塑性 抗てんかん機構

## 1. 研究開始当初の背景

てんかんの定義は「皮質神経細胞の過剰興奮が同期して起こりこれが、繰り返し反復出現する。」ことである。てんかんが発達過程を経て発作を獲得する過程を「てんかん原性」と言うが、てんかん原性確立の際には様々な遺伝子の発達時期特異的発現が認められている。これがてんかん脳の**神経可塑性異常の根拠**である。一方、神経幹細胞をてんかん焦点の海馬に移植するとその分化誘導度に関わらず、抑制性神経細胞が誘導され、てんかん発作は消失した。これは**神経可塑性の正常化**といえる。この現象を解明し、治療に応用すれば、難治てんかん治療の飛躍的進歩が望める。

このような発達特異的現象を解析するには、**発達過程で徐々に発作閾値が低下してゆき、てんかん原性を獲得してゆく神経可塑性の異常を有するてんかんミュータントである EL マウスが疾患モデル実験動物として最もふさわしい。**

神経変性疾患、認知症、てんかんなどの、難治性精神神経疾患の根拠的治療として、神経系細胞を脳に移植することにより、障害された脳機能を回復再建する細胞移植治療の可能性が注目され現実化しつつある。しかし、これらの疾患の病態と発症メカニズムが未だ十分には解明されておらず、その応用は極めて限定されている。これらの再生医療において、移植用細胞の供給源として有力視されているのが**無限の自己増殖能と多分化能を持つ「初期胚の細胞に由来する胚性幹細胞**

**(embryonic stem:ES)細胞**である。本法には、拒絶反応と卵細胞を用いる倫理的問題が提示されているが、分化度の調節により拒絶反応は回避可能であり、今や、iPS 細胞から卵細胞の誘導が可能となっており倫理問題もクリアできる。なにより本法は iPS 細胞と異なり、**癌化の恐れが全く無く、次世代への遺伝的安全性も確認されている。**

本研究では単に細胞移植の臨床応用を最終目的としているのではなく、**移植を受けるホストの脳の神経可塑性機構の異常を正常化させる条件とそのメカニズムを解明**することを大きな目的としている。再生医療において最も重要なことは、無くなったものを補うだけでなく、**無くなった機構を明らかにさせ、生体が持っている再生機能を最大限に活用**することにより、出来るだけ侵襲の弱い方法で、難治てんかん治療を目指していることである。

## 2. 研究の目的

**先端技術**を駆使しにより、てんかんの病態を明らかにし、とりわけ難治てんかんの治療法を開発することは、てんかんを含むいれん性疾患が、全人口の 10%にもものぼることからも急務である。

本研究計画の目的は**神経幹細胞を背側海馬に移植することによって、てんかん発作がコントロールできたてんかんミュータント EL マウス脳と移植した細胞を in vitro で培養し続けた細胞分化の差に注目し、てんかん脳の持つ神経可塑性の異常とその正常化過程を明らかにし、新しい治療法を開発することにある**

研究代表者が、てんかんミュータント EL マウスを用いて、これまで、てんかん原性確立過程において、その発達時期特異的発現を認めているのは以下の通りである。

1. **抑制性神経伝達物質とその合成酵素 (GABA, Glutamate decarboxylase(GAD))**
2. **ミトコンドリア関連エネルギー代謝酵素 (Glucose-6-phosphate dehydrogenase)**
3. **フリーラジカル関連酵素 (Superoxide dismutase(SOD)/Mn-SOD, Cu,Zn-SOD, Nitric oxide synthetazse(NOS)/nNOS,eNOS,iNOS)**
4. **最初期発現遺伝子 (IEG/c-fos, zif, jun)**
5. **神経細胞死 Apoptosis 関連遺伝子 (Bax, Bcl-2, BclxL)**
6. **神経栄養因子 (BDNF, NT-3, FGF-2)**
7. **細胞新生関連遺伝子 (Cyclin A,B,D,E, CDK-1,2,3)**
8. **Cytokine 関連遺伝子 (Interleukin(IL)-1alpha,IL-1beta, IL-6, IL-receptor, IL-receptor antagonist, TNF-alpha)**
9. **Neurosteroid 関連遺伝子 (Allopregnone,5-alpha reductase,3-beta hydroxysteroid, dehydrogenase, Aromatase, P450scc)**
10. **GABA A receptor subunit 関連遺伝子 (alpha 1,2,4,beta 2,3, gamma3,delta)**

1-10 については、既に昨年度までの研究費によって成果を報告した。これからの 4 年間で**神経幹細胞移植しててんかん発作が消失した EL マウス脳を用いて上記項目について、てんかん焦点部位 (EL マウスでは、頭頂皮質に始まり、海馬で全般化する) での、神経可塑性回復に対応する遺伝子発現を検討し、てんかん原性確立前の鍵となる遺伝子を同定し、発症前治療の基礎を確立する。**

## 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点と意義

従来より、てんかん発作後には発作自体の傷害作用のため、神経細胞死が起こり、グリオシスがおこるといふ仮説が広く受け入れられていた。しかし、てんかんミュータント脳では、まだ発作も起こしていない脳の中で、既に発作が起きる準備が細胞レベルで進行している。中枢神経系のみならず、免疫系 (Cytokine)、内分泌系 (Neurosteroid) のシグナル伝達も生体のホメオスターシスと関与して

んかんを起こす。GABA A 受容体 subunits は脳内 neurosteroids によって、その再構成が起こり、発達過程において、未熟脳においては、てんかん原性への関与、及びその結果生じた過剰興奮への抑制作用という異なる作用を有する。**まずてんかん発作消失が新たな抑制性神経ネットワーク新生によるものであることを同定した上でてんかん治療の基礎を築くのが本研究の学術的特色である。**これによって、**最小限の侵襲により、移植治療が長期にわたる服薬と精神症状で苦しめられてきたてんかん患者にとって根治治療の可能性が生まれ、その波及効果はきわめて大きいと言える。**

### 3. 研究の方法

**材料:** 1954 年旧国立予防衛生研究所今泉部長が脳水腫 II 系 DDY マウスより分離した、局在関連性 2 次性全般化てんかんである EL マウスを用いる。Jackson's Laboratory (USA) にも分与されているが、現在生産コロニーを維持しているのは世界的にも当研究代表者の施設のみである。この日本で開発され一貫して研究代表者によって系統育種されてきた EL は、遺伝形式が常染色体性優性遺伝形式で、浸透率が 100% である。従ってまずこのマウスの安定供給のための飼料、ケージ、系統維持室の管理費などの経費が毎年必要となる。特に SPF 維持のための頻繁な感染モニタリングも必須である。

**方法:** 週 1 度の発作誘発刺激を生後 5 週齢より与え続けた EL の頭頂皮質、海馬を用いる。発達の影響を調べるため、5, 8, 10, 12, 15, 19, 28 週齢の雄マウスを用い 10% homogenate を作成する。

**幹細胞分化のマーカー検索**として、monoclonal Anti Nestin, NeuN, Microtubule Associated Protein2 (MAP2) を用いる。移植細胞にはあらかじめ、Green Fluorescent Protein (GFP) の遺伝子を組み込んであるものを用いる。

抑制性神経細胞とそのネットワーク検索には、GAD65, 67 の両方で細胞質と神経終末を蛍光免疫組織化学により、染め分け**ネットワークの構成を視覚化**する。In vitro では PCR 法により、発現された遺伝子も定量する。タンパクについては、Western blotting の手法により各因子を NIH image with Macros によって半定量を行う。

発達過程に基づく遺伝子発現の解析には以下 3 種の定性定量法を用い総合的に解析する。

Western Blotting に用いる抗体は Ab cam, Santa crus 社製の抗体で各異なる抗原部位を認識する抗体を複数用いる。これはもともと発現量が少ないため、非特異的なバンドから特異的なバンドを精密に同定するた

め必要である。使用マウスは対照の DDY マウスともは各週齢 10 匹ずつ、発達段階 7 段階、脳内部位 2 カ所で検討するので計 140 サンプルとなる。これらについて、最低 5 回の再現性を見ると、12 穴使用ゲルを用いても 100 回近い Blotting を行うことになる。緩衝液、マーカーなども含み hyperfilm も 200 枚近く必要となる。

PCR を行うための template 作成費用が必要となる。上記により発現の亢進、低下が認められたものについては、**蛍光免疫組織化学法**により、subcellular の発現の変化を同定する。海馬 Dentate gyrus に多くの局在が予想される。感度を上げるため、断頭後脳を取り出し、-20 度下でエタノール固定する。これから 5 micrometer の厚さでクライオトームにて切片を得る。これはパラフィン固定したものより感度が高いことを予備実験で確認しているためである。また薄い切片を用いた方がやはり高感度が得られたからである。カウントに際しても 1 切片の断面上に 1 細胞以上含まれることは無くより正確に計測ができる。新生細胞では細胞種が特定できないため、ニューロン特異的 neu N, グリア細胞に特異的 GFAP, 機能神経細胞に特異的な PSA (Poly sialic acid) をマーカーとして、FITC ラベリングを用い、多重染色を行う。

上記の項目は全て、移植マウス群のみならず、発達過程を追って、まだ発作を起こしていない幼弱な 5 週齢から、頻繁に発作が誘発される 28 週齢にまでわたって、検討する。これによって、てんかん発作発現前の脳が、いかに、遺伝子発現が変化し、さらにその局在が変化してゆき、てんかん原性を獲得してゆくのか、そしてそれが幹細胞移植により変化するかを明らかにすることができる

### 「神経幹細胞移植がてんかん発作のみならず行動の正常化を起こすことを明らかにする」

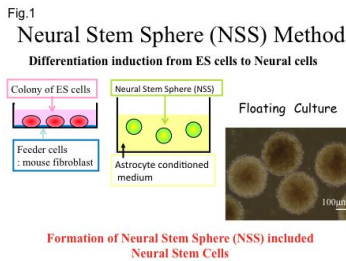
**方法:** 週 1 度の発作誘発刺激を生後 5 週齢より与え続けた EL の頭頂皮質、海馬を用いる。発達の影響を調べるため、5, 8, 10, 12, 15, 19, 28 週齢の雄マウスと神経幹細胞移植群について、赤外線式行動モニタリングを行い、EL で認められる深夜の過剰運動亢進が抑えられるかどうかを観察する。この方法は各個体についての運動量を 1 週間近く連続で定量できるため、移植により単にてんかん発作が消失しただけでなく、**異常行動も消失したかが同定可能である。**

**「移植を受けた個体の次世代が遺伝的影響を受けない安全性を検証する」**

方法：EL マウスは5周齢までは全く発作を起こさない。最初の発作は8-12週齢の間に起こす。そこで神経幹細胞移植群の雄雌を交配させ、そのF1を得これについて、**神経変性などの異常がないか、致死性がないか、**またnaiveなELと遺伝子発現の差がないかを検討した。

**4. 研究成果**

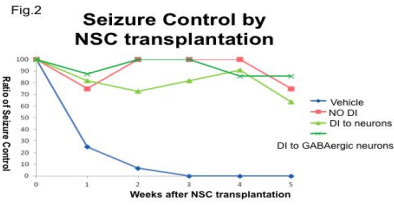
さまざまな細胞への分化機能を持った胎生幹(ES)細胞は *in vitro* でニューロンに分化する事ができる。アストロサイト由来の因子により、マウス ES 細胞がニューロンに分化する事が明らかにされている。astrocyte-conditioned medium (ACM) 溶液下において ES 細胞を浮遊状態で培養すると、4日以内に、未分化なマウス ES 細胞は、周辺表面に密な層状の神経幹細胞塊を形成した球形マリモのような形をした Neural Stem Sphere (NSS) となる。このNSSをACM中において浮遊状態ではなく、固定した培養ベッド上で培養すると神経発生が起こり、さらに5日以内にニューロンに分化するのである。極めて効率の良いニューロン分化方法と言える(Fig. 1)。



EL マウスは2次性全般化発作を起こすてんかん mutant である。遺伝様式は常染色体優勢遺伝であり、浸透率は100%である。辺縁系の梨状皮質、内嗅皮質に発作は始まり、頭頂皮質を経て、海馬において伝搬全般化する。この頭頂皮質の極めて限局した領域にGABA 作動性抑制性ニューロンの脱落部位がある事が知られている。そこでこのEL マウスを用いて、週一回の強直間代発作を起こすようになったアダルト EL マウス脳海馬に移植された神経幹細胞(NSCs)が如何に抑制性ニューロンに分化し、てんかん発作を抑制するのかそのメカニズムについて *in vivo*, *in vitro* 両面から検討した。

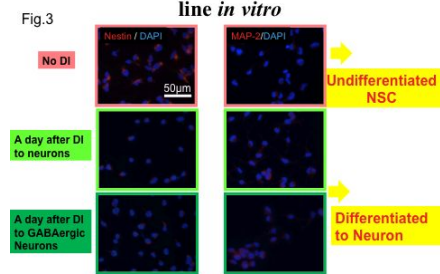
分化誘導をかけていない NSCs, ニューロンに分化誘導をかけた NSCs (nNSCs), GABA作動性ニューロンに分化誘導をかけた NSCs (gNSCs) 3種類の細胞を移植した。いずれもNSS-由来のNSCs から24時間の分化誘導をかけて得たものである。移植細胞数は $1 \times 10^4$ を調製し、両側の背側海馬にハミルトンシリ

ンジにて注入した。対照にはsham-operated し、ACM由来の培養液のみを注入したELマウスを用いた。移植5週後てんかん発作がコントロールされたか否かを判定した (Fig. 2)。

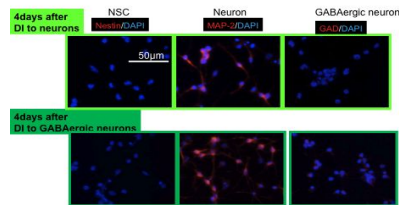


さらにその脳を取り出し、免疫組織化学法(IH)によって、移植細胞のマーカーである green fluorescent protein (GFP), GABA作動性抑制性神経細胞のマーカーである glutamate decarboxylase (GAD), ニューロンのマーカーである Neu-N を用いて分化細胞の性格を特定した(Fig. 3,4)。

**Characterization of the transplanted cell**

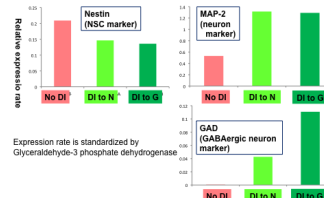


**Characterization of differentiated cell types**

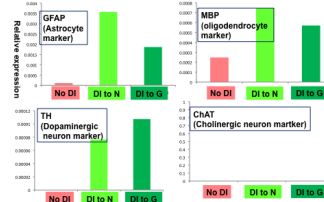


また同時に移植に用いたのと全く同じロットの細胞について、*In vitro* でNSCs, が如何に分化していくかIHによってその種類を、PCR法によりその発現遺伝子量の半定量分析を行った (Fig. 5,6)。

**Characterization of expressed Genes**

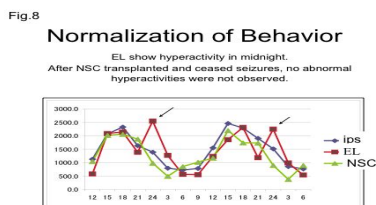


**Post DI Characterization of cell types**





NSCs 及びその分化細胞を移植したELマウス群では発作を認めなくなったが、対照群では全てに強直間代発作の残存を認めた。さらに夜間に過剰活動を示す midnight hyperactivity はELマウスの行動異常の特徴であるが、これも移植群では消失した(Fig. 8)。



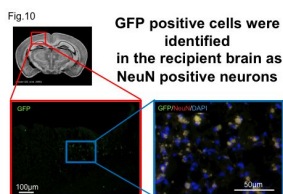
すなわち本法による移植治療は単にてんかん発作をコントロールしたばかりでなく、いわゆるてんかん性精神障害とも言うべき発作に伴う行動異常も消失した。移植術を受けたELマウスにとって、てんかんは「根治」したと言える。

しかしこれで安全性が担保されていないければ話にならない。そこで、更に後世に与える遺伝的影響を調べるため F<sub>1-7</sub>の全例についてその発作感受性について検討したが、発作がコントロールされるのは1代限りであり F<sub>1</sub>以降は移植手術前のPと変わらなかった。また神経変性や癌化と行った異常も第7世代に至るまで1例も認めなかった。特に移植効果を上げるため過剰の細胞を移植すると、過誤腫の形成を認める事が多いが、移植細胞数を最小量にとどめた事もあり、遅延性の腫瘍形成も認めなかった。遺伝的また神経学的特性も術前のPと変わりはない。(Fig. 9)。

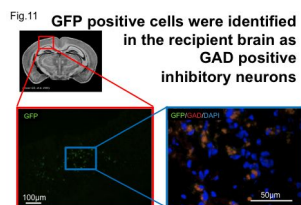


以上より移植に対する安全性の担保は我々のプロトコールでは確実と言える。

GAD 陽性の移植 (GFP 陽性) ニューロン (NeuN 陽性) は NSCs, nNSCs and gNSCs のいずれの群に於いても認められた。しかし、in vitroでは gNSCs 分化誘導をかけた群のみがGAD 陽性ニューロンに分化し、極めて高いGAD 遺伝子発現をPCRで示した



(Fog.10,11)



すなわち、非GABA作動性 NSCs でもGABA作動性NSCs でも移植を受けたEL マウス脳ではin vivoでGAD 陽性抑制性ニューロンが誘導された訳である。この事実は、ELマウスでは、GABA作動性ニューロンを欠損している極めて限局した頭頂皮質直下の背側海馬にNSCsを移植されると、そのホストの局所領域が神経幹細胞を必要とする抑制性GABA作動性ニューロンに分化誘導する力がある事を示している。まさにホストとグラフトの相互関係によりこの移植が発作のコントロールを成功に導いたと言える。ヒトてんかんの治療に応用する際にも、個々の患者のヒトが脳内のどの部位にどのような機能異常を有するのか、またそれが局所環境下に於いて、用いたグラフトによって克服できるのかを検討した上で行なわねばならない。確かに障壁は容易ではない。しかし確実に未来は開かれている。

## 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 3 件 )

Murashima YL

Transplantation of pluripotent embryonic stem cells as donor cells to suppress seizures Review article

Epilepsy and Seizure 2017 in press

Murashima YL

Anti-carcinogen 6MITC derived from wasabi control seizures in epileptic mutant EL mice at very low dosage.

Epilepsy and Seizure 8(1) 1-8, 2016

Murashima YL

Transplantation of pluripotent embryonic stem cells as donor cells to suppress seizures in epileptic mutant EL mice

Hokkaido Epilepsy Res. 13(1) 1-12, 2013

[ 学会発表 ] ( 計 8 件 )

Murashima YL

Biomarker of epilepsy (BME) from the aspects of development -The change of Nerve growth factors (NGFs) and Bcl families during development- 4 Nov 2016 50th. Japan Epilepsy Society Grand ship

Shizuoka, Shizuoka, Japan

Murashima YL

NCAM poly-sialization, apoptotic Bcl family activation and NGFs related with cytokine systems regulation as biomarkers in epilepsy, suggested by the epileptic mutant EL mice. The 10<sup>th</sup>. International Conference on Complex Medical Engineering(CME) 6 Aug.2016 Utunomiya Conf Center, Utsunomiya, Tochigi, Japan

Murashima YL

Biomarker of epilepsy (BME) from the aspects of epileptogenesis -The change of cytokine and NCAM poly-sialization during epileptogenesis- 30 Oct 2015 49<sup>th</sup>. Japan Epilepsy Society Nagasaki Blick Hall, Nagasaki, Japan

Murashima YL

Biomarker of epilepsy (BME) from the aspects of development. 29<sup>th</sup>. Aug-11<sup>th</sup> Sep2015

XIIWONOEP/ILAE

Heybeliada Island, Istanbul, Turk

Murashima YL

Transplantation of pluripotent embryonic stem cells to the dorsal hippocampus in the EL brain to suppress seizures 2 Oct 2014 48<sup>th</sup>. Japan Epilepsy Society

Keio plaza Hotel, Tokyo, Japan

Murashima YL

Transplantation of pluripotent embryonic stem cells as donor cells to suppress seizures. -The future and problems of stem cell transplantation to the brain-

Miyazaki Epilepsy Conference 3<sup>rd</sup>. Jul 2014

Sea gaia Miyazaki, Miyazaki, Japan

Murashima YL

Anti-carcinogen 6MITC derived from wasabi control seizures in epileptic mutant EL mice at very low dosage. 2<sup>nd</sup>. Oct 2013 47<sup>th</sup>. Japan Epilepsy Society

Convention Center, Kitakyusyu, Japan

Murashima YL

Biomarker of epilepsy (BME) from the aspects of ictogenesis and epileptogenesis -The change of cytokine and NCAM poly-sialization during epileptogenesis- 19<sup>th</sup>.-21<sup>st</sup>.Jun 2013

XIIWONOEP/ILAE Lake Roche, Montreal Canada

〔図書〕(計 1 件)

村島善也

EL マウスで神経幹細胞移植を用いた抑制性神経可塑性導入による

てんかんの治療、その可能性と問題点

てんかん研究の最前線

pp32-38 Medical Tribune, Tokyo, Japan 2016

〔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  
村島 善也 (YOSHIYA L. MURASHIMA)  
首都大学東京人間健康科学研究科

客員研究員  
研究者番号：50182118

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )