

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25505008

研究課題名(和文) 腫瘍随伴間脳視床下部障害に対する胚性幹細胞による再生治療の開発

研究課題名(英文) Regenerative therapy for hypothalamic disorders from neoplasms

研究代表者

長崎 弘 (NAGASAKI, Hiroshi)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：30420384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳腫瘍による視床下部機能障害に対するマウスES由来視床下部細胞系を利用した再生治療の基盤研究を実施した。まず、分化誘導法の高効率化、安全性の向上のためマウス視床下部細胞の純化法を開発した(特許出願中)。未分化細胞に特異的に発現する表面抗原を同定し、それに対する抗体ビーズで細胞を除去したところ視床下部細胞の回収率は約2倍に上昇し、生存率も改善された。VEGFおよびROCK阻害剤を添加するなどの移植法の改良により移植組織は30日以上生存した。しかし疾患モデルマウスを用いた薬効確認実験においては、有意な治療効果は認められなかった。さらなる改良を目指して検討を続ける。

研究成果の概要(英文)：We have executed a basic research for regenerative therapy utilizing mouse embryonal stem cell aimed at hypothalamic dysfunctions caused by brain neoplasms. First, we have developed a novel method to purify hypothalamic precursors. We have identified surface antigens on immature cells, which were removed by antibody-conjugated beads. This purification method doubled the efficacy and viability of the hypothalamic precursor cells. To improve the micro-circumstance of the grafted cells, VEGF, ROCK inhibitors and matrigel were utilized in the cell-transplantation procedure, which prolonged the grafted neurons more than a month. However, these regenerative therapies on the disease-model mice did not reach the therapeutic goals. Further research would be required to achieve the therapeutic effects.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：再生医療 視床下部障害

1. 研究開始当初の背景

間脳-視床下部領域の腫瘍性病変 (頭蓋咽頭腫: 図1, 毛様細胞性星細胞腫, 胚細胞腫瘍, 髄芽腫) あるいはリンパ球性漏斗下垂体炎等の炎症性疾患は、下垂体ホルモン異常や視床下部性肥満、摂食障害を示す間脳症候群、視索上核や下垂体茎の障害による尿崩症、あるいは低 Na 血症を示す脳性塩類喪失症候群、低体温、短期記憶障害、睡眠過多、性欲亢進または低下など、障害部位に応じた、多様な視床下部機能障害が起こる。病変が大きいほど、また放射線治療を行なう場合は高線量であるほどその可能性は高くなる。これらの障害は腫瘍の外科的切除や化学療法、放射線療法により軽快することもあるが、欠損治癒あるいは後遺症として患者の QOL を著しく損なう場合も少なくない。生活指導や対症療法には限界があり、根治的な再生治療が切望されている。

2008年に、理化学研究所(理研CDB)の笹井芳樹グループディレクターらが、マウス胚性幹細胞(ES細胞)から視床下部組織への器官形成に成功した(綿谷ら, PNAS 2008)。研究グループでは、それまでに開発していた大脳分化誘導のための無血清浮遊培養法(SFEBq法)を改良し、視床下部前駆細胞の分化誘導を可能とした。更に視床下部の背側部のペプチド産生細胞群(バゾプレシン、オレキシン、メラニン凝集ホルモン等)あるいは視床下部の腹側部の細胞群(NPY, CART, POMC等)へ選択的に分化させることにも成功した。

我々は理研CDBとの共同研究でES-hypo誘導系における神経ペプチド発現について基礎的検討を行い、その上で中枢性尿崩症の再生治療法への応用を検証している。Brattleboro rat 系統はバゾプレシン遺伝子変異により100-200ml/日もの多尿を呈する中枢性尿崩症のモデル動物であるが、その視床下部視索上核領域にES-hypoを移植したところ、尿量を1割程度抑制できるという治療効果を得ている。本研究ではこれを更に発展させ、ほとんど全ての視床下部ニューロンを含むES-hypoの更なる可能性を検証することにより、治療対象疾患の拡大を目指すものである。

2. 研究の目的

間脳視床下部領域の脳腫瘍による視床下部機能障害に対する再生医療法を開発する。本研究では前臨床研究としてProof of Conceptを確立する。そのため視床下部領域破壊動物を疾患モデルとし、ES-hypoを移植して治療効果の確認を行うことにより、再生治療の技術基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

以下の課題について検討を行った。

- (1) 視床下部障害モデル動物の作成
- (2) 細胞移植法の開発
- (3) ES-hypo 分化誘導の高効率化
- (4) ES-hypo 移植治療の効果判定

4. 研究成果

(1) 視床下部障害モデル動物の作成

GTG 腹腔内投与により、1ヶ月ほどで体重及び摂食量が20%増加する、視床下部性肥満マウスを作成することができた。このマウスは視床下部弓状核のPOMCニューロンが脱落することにより、過食となる。よって摂食を抑制することができれば視床下部の機能を再生できたことになる。

(2) 細胞移植法の開発

大脳皮質にES-hypo細胞を移植するにあたり、拒絶反応の抑制、移植細胞の分化度、微小環境、移植手技をそれぞれ検討し、最適化を行った。移植術後4週間で移植片を摘出し、免疫組織学的検討により、組織の生存、分化度を評価した。結果として、タクロリムスを飲料水に混和して免疫抑制する・視床下部誘導後30日前後のES-hypoを使用する・VEGF, ROCK 阻害剤を移植時にマトリゲルと共に使用する・脳定位手術で細胞を注入する際、酵素的に細胞を単離しない、などの条件が、最も生着率及び分化度が良いことがわかった。

(3) ES-hypo の移植方法および細胞環境の検討

分化誘導法の高効率化、安全性の向上のためマウス視床下部細胞の純化法を開発した。20~30%の割合で、移植後に悪性胚細胞腫が出現したため、安全性の確立のため、未分化細胞の除去が必要と考えられた。このため未分化細胞に特異的に発現する表面抗原を同定し、それに対する抗体ビーズで細胞を除去したところ視床下部細胞の回収率は約2倍に上昇し、生存率も改善した。移植後60日で移植組織を組織学的に検討したが、未分化細胞及び悪性細胞は認められなかった。また、この純化法により、視床下部ニューロンの発現率は2倍から10倍以上に増加した。この純化方法について近日中に特許出願する予定

である。

(4)ES-hypo 移植治療の効果判定

(3)の方法で純化して、得られた ES-Hypo を、(2)の方法により、GTG 誘発視床下部障害マウスの視床下部腹内側核領域に移植した。30日間観察期間の後、断頭し、脳より移植組織を摘出して組織学的検討を行った。これにおいて組織の生着及び、POMC ニューロンへの分化が認められた。未分化細胞、悪性腫瘍は認められなかった。しかし、有意な摂食抑制という治療効果は認められなかった。さらなる改良を目指して今後の検討を続ける。

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)

Hiroshi Nagasaki, Yu Kodani, Hidetaka Suga. Induction of Hypothalamic Neurons from Pluripotent Stem Cells. *Interdisciplinary Information Sciences*, Vol. 21, No. 3 (2015) 1-6 査読あり

[学会発表](計 11 件)

Yu Kodani, Hidetaka Suga, Naoki Yamamoto, Yoko S. Kaneko, Akira Nakashima, Hiroshi Nagasaki A novel purification method for mouse ES cell-derived hypothalamic progenitors 2016年3月22日(火) -24日(木) 札幌コンベンションセンター第93回日本生理学会大会

小谷 侑、須賀英隆、山本直樹、金子葉子、中島 昭、長崎 弘 表面抗原を利用したマウス ES 細胞由来-視床下部前駆細胞の純化法 第15回日本再生医療学会総会 2016年3月17日(木) -19日(土) 大阪国際会議場

小谷 侑、須賀英隆、金子葉子、中島 昭、長崎 弘 マウス ES 細胞由来-視床下部培養系における MCH ニューロンの免疫組織化学的解析第62回中部生理学会地方会 2015年11月13-14日 富山大学五福キャンパス

長崎 弘 Induction of hypothalamic neurons from pluripotent stem cells

日本神経内分泌学会国際サテライトシンポジウム 2015年9月18-19日東北大学民隆会館

長崎 弘、須藤 湧太、小谷 侑、須賀英隆、山本直樹、金子葉子、中島 昭、太田 明 マウス ES 細胞由来-視床下部培養系における NERP1 の作用 (口頭)

第88回日本内分泌学会学術総会 2015.4.23-25 ホテルニューオータニ東京

須藤湧太、長崎弘、小谷侑、山本直樹、須賀英隆、金子葉子、中島昭、太田明 マウス胚性幹細胞由来バゾプレシン細胞のライプセルイメージング (口頭: 研修医・医学生セッション) 第88回日本内分泌学会学術総会 2015.4.23-25 ホテルニューオータニ東京

Yu Kodani, Hiroshi Nagasaki, Hidetaka Suga, Yoko Kaneko, Akira Nakashima, Akira Ota Influence of endogenous Akt/-catenin signaling in hypothalamic differentiation from mouse embryonic stem cells 第92回日本生理学会大会 2015年3月21日(土) -23日(月)神戸国際会議場・展示場

Hiroshi Nagasaki, Yu Kodani, Naoki Yamamoto, Hidetaka Suga, Yoko Kaneko, Akira Nakashima, Akira Ota Calcium imaging of vasopressin neuron in the hypothalamic culture derived from mouse embryonic stem cell 第92回日本生理学会大会 2015年3月21日(土) -23日(月)神戸国際会議場・展示場

長崎 弘、小谷 侑、須賀英隆、山本直樹、金子葉子、中島 昭、太田 明 遺伝子改変によるマウス胚性幹細胞由来バゾプレシン細胞の蛍光標識 第61回中部日本生理学会 2014年11月7,8日名古屋市立大学桜山キャンパス

長崎 弘、小谷 侑、金子葉子、中島 昭、
須賀 英隆、太田 明 ES 細胞由来-視床
下部培養系における MCH ニューロンの特徴
第 8 7 回日本内分泌学会学術総会
2014.4.24-26 福岡国際会議場・福岡サンパ
レス

¹¹小谷 侑、長崎 弘、須賀英隆、綿谷武
史、金子葉子、中島昭、大磯ユタカ、笹井
芳樹、太田明 ES 細胞由来-視床下部培養
系における MCH ニューロンの形態および組
織学的特徴 第 91 回日本生理学会大会
2014年3月16日(日)-18日(火) 鹿児島大
学 郡元キャンパス

〔図書〕(計 0 件)

〔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：該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

長崎 弘(NAGASAKI Hiroshi)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：30420384

(2)研究分担者

小谷 侑(KODANI Yu)
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号：60644622

須賀 英隆(SUGA Hidetaka)
名古屋大学・医学部・助教
研究者番号：20569818

(3)連携研究者

大磯ユタカ(OISO Yutaka)
名古屋大学・医学部・教授
研究者番号：40203707

太田 明(OTA Akira)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：10247637