

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462772

研究課題名(和文) ES細胞由来神経前駆細胞を用いた、脳血管障害の神経再生療法への挑戦

研究課題名(英文) ES derived neuronal stem cells ameliorate ischemic brain injury in mice

研究代表者

秦 龍二 (Hata, Ryuji)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：90258153

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)：虚血性脳血管障害に対して、神経再生療法が有効かどうかを検討するために、マウスES細胞から分化誘導して作成した大脳皮質前駆細胞をマウス脳虚血領域に移植し、その効果を検討した。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視床での神経の虚血性2次変性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、脳血管障害のモデル動物での神経障害を改善することを示唆しており、虚血性神経細胞障害に対するES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)：Stroke is the leading cause of disability and the third cause of death in the world. Despite intense investigations, no therapy that prevents stroke-induced brain damage and neurological dysfunction has emerged. Recently a growing number of evidence supports regenerative medicine is working to restore structure and function of damaged brain tissues. In this study, we investigated the effects of transplantation of the neural stem cell derived from ES cells on cerebral ischemia. Consequently we have demonstrated that neural stem cells derived from embryonic stem cells have shown protective effects on ischemic insults. Our results have suggested that stem cell therapy has proven effective in promoting functional recovery and protecting secondary degeneration of the thalamus in animal models of cerebral ischemia and therefore represents a hopeful therapy for this unmet medical condition, although further investigations must be required to clarify their repair mechanisms in the brain.

研究分野：神経科学

キーワード：脳血管障害 神経再生 ES細胞

1. 研究開始当初の背景

近年再生医学の進歩はめざましく、胚性幹細胞 (ES 細胞)、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)、更には組織幹細胞 (= 神経幹細胞など) を用いた再生医療が試みられている。幹細胞は自己増殖能と多分化能を持ち、多種多様な組織になりうる潜在能力を有する細胞である。同時に、幹細胞は様々な栄養因子を分泌することも知られている (Neurology 13 Suppl 1: S207-12, 2012)。

幹細胞の自己増殖能と多分化能、栄養因子分泌能などの機能は、虚血性脳血管障害の治療に有用と考えられている。例えば ES 細胞や神経幹細胞の脳梗塞巣への移植が脳虚血障害の治療に有効 (Brain 129:3238-48, 2006) であることが報告されている。また脳虚血により、内在性の神経幹細胞が活性化し、増殖すること (Mol Cell Neurosci, 23,292-301, 2003) も知られている。各種幹細胞のなかで、ES 細胞や iPS 細胞は発癌性という問題を抱えているが、組織幹細胞とは異なり、十分な量を確保することが可能である。従って、ES 細胞や iPS 細胞から神経前駆細胞 (= NP) への分化誘導を確実にし、発癌性を完全に制御することが可能になれば、両者は臨床上きわめて有用な幹細胞と考えられる。

2. 研究の目的

最近特殊コートをした培養プレートで ES 細胞を培養すると、浮遊した ES 細胞同士が凝集して浮遊 ES 細胞塊 (= EB) を形成し、約 8 割の細胞が NP に分化することが見いだされた。この手法は SFEB 法 (serum-free floating culture of embryoid body-like aggregate) と名付けられている (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 法を用いて作成した EB での 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 細胞を NP へ分化誘導できることが明らかとなった (PNAS USA 105: 11796-801, 2008)。

一方 Foxg1 は終脳 (= 大脳) の region specific marker (= 胎生期に Foxg1 が発現するすると大脳へ移動するマーカー) として知られている (Curr Opin Genet Dev. 22: 323-30, 2012)。そしてこの FoxG1 を発現している NP を FACS sorter にて選別することで、ES 由来の NP のうち、大脳皮質になることが運命づけられた大脳皮質神経前駆細胞 (= CNP) を単離し、腫瘍化する可能性のある未分化細胞を完全に除去することが可能となった (Dev Growth Differ 54: 349-57, 2012)。

そこで本研究は、上記改良型 SFEB 法を用いて作製した大脳皮質になることが運命づけられた CNP を、大脳皮質のみに脳梗塞を起こす脳虚血モデルマウスに移植し、その脳虚血保護効果を詳細に検討することで、脳血管障害に対する革新的な神経再生療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 動物:

本実験には 16 週齢の SCID マウス (CB17/lcr-Prkdc^{scid}/CriCrIj; 日本チャールスリバー) を使用した。実験動物を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。

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 (BF1::venus) から神経幹細胞への分化誘導を行なった。

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。

4) 右中大脳動脈の永久閉塞

ナイロン栓子法により右中大脳動脈起始部を閉塞させた。手術中は直腸温を 37.0 ± 0.2 に保った。その後麻酔から覚醒していることを確認後、室温の飼育ケージに戻した。

5) 大脳皮質特異的神経幹細胞の移植

右中大脳動脈閉塞後 3 日目に、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、開頭後、脳梗塞部周辺に注入した。

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 とし暗室とし同様に活動性を検討した。

7) 免疫染色:

行動評価終了後、マウスを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 ミクロンの冠状断切片を作成した。そして caudate-putamen のうち Ventroposterior (VP) nucleus を含む断面を用いて以下の免疫染色を行った。まず、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:

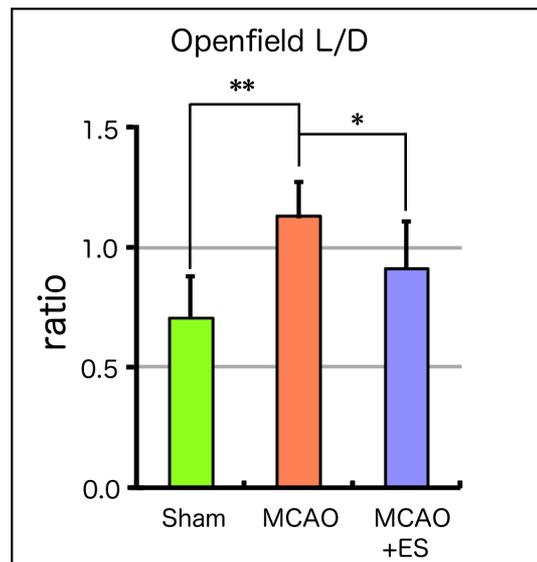
各分析データは One way analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparison test にて評価し、p 値が 0.05 以下を有意とした。全てのデータは mean \pm SD にて表記した

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(MCAO+ES 群)は非移植群(MCAO 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

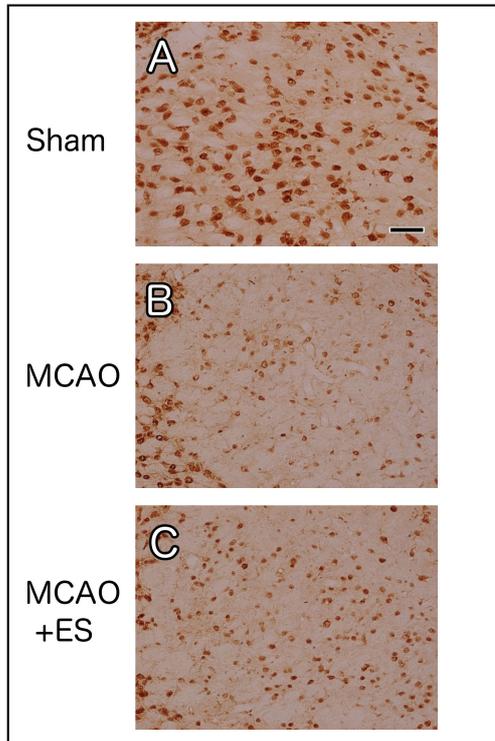
図 1: 昼夜の自発運動活性比:



2) 線条体における神経障害

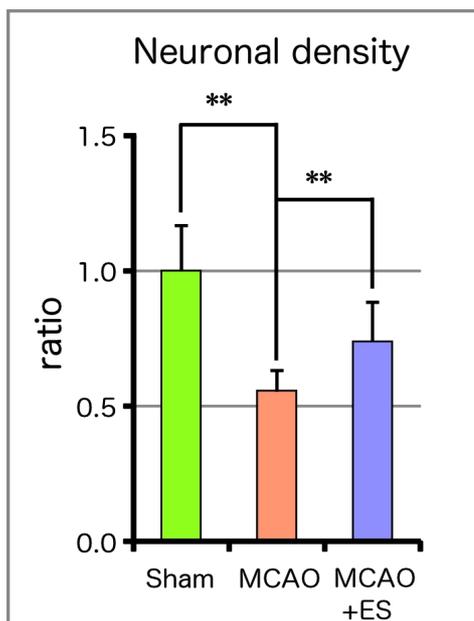
図 2 に示す様に、移植後 1 ヶ月目に線条体での神経細胞数を MAP2 染色にて確認した。その結果大脳皮質特異的神経幹細胞移植群(MCAO+ES 群)は非移植群(MCAO 群)に比して明らかに神経細胞傷害が軽減していることが明らかとなった。scale bar = 50 μ m sham: sham-operated control 群

図 2 : caudate-putamen 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(MCAO+ES 群)は非移植群 (MCAO 群) に比して、有意に神経細胞密度比の改善を認めた。sham: sham-operated control 群

図 3 : caudate-putamen における神経密度



3) 結語 :

脳血管障害における再生医療の可能性を検討するために、局所性脳虚血モデルマウスにマウス 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。その結果治療群では非治療群に比して、有意に自発運動活性が改善し、脳虚血による 2 次性神経細胞死が抑制された。以上の結果は虚血性脳血管障害に対して、神経幹細胞を用いた再生医療法が有用であることが示唆された。さらに ES 細胞または iPS 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、臨床応用が可能であることが示唆された。。

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 9 件)

1). Tomino A, Tsuda M, Aoki R, Kajita Y, Hashiba M, Terajima T, Kano H, Takeyama N. Increased PD-1 Expression and Altered T Cell Repertoire Diversity Predict Mortality in Patients with Septic Shock: A Preliminary Study. PLoS One. 12:e0169653, 2017

2). Sakai K, Senda T, Hata R, Kuroda M, Hasegawa M, Kato M, Abe M, Kawaguchi K, Nakai S, Hiki Y, Yuzawa Y, Kitaguchi N: Patients that have Undergone Hemodialysis Exhibit Lower Amyloid Deposition in the Brain: Evidence Supporting a Therapeutic Strategy for Alzheimer's Disease by Removal of Blood Amyloid. J Alzheimers Dis. 51: 997-1002, 2016

3). Hashiba M, Tomino A, Takenaka N, Hattori T, Kano H, Tsuda M, Takeyama N. Clostridium Perfringens Infection in a Febrile Patient with Severe Hemolytic Anemia. Am J Case Rep. 17:219-23, 2016

4). Fujishima S, Gando S, Daizoh S, Kushimoto S, Ogura H, Mayumi T, Takuma K, Kotani J, Yamashita N, Tsuruta R,

Takeyama N, Shiraishi S, Araki T, Suzuki K, Ikeda H, Miki Y, Suzuki Y, Yamaguchi Y, Aikawa N; Japanese Association for Acute Medicine Sepsis Registry (JAAM SR) Study Group. Infection site is predictive of outcome in acute lung injury associated with severe sepsis and septic shock. *Respirology*. 21:898-904, 2016

5). Kano H, Aminul Huq M, Tsuda M, Noguchi H, Takeyama N: Sandwich ELISA for circulating myeloperoxidase- and neutrophil elastase-DNA complexes released from neutrophil extracellular traps. *Advanced Techniques in Biology & Medicine* 5: 1. 2016

6). Zhu P, Hata R, Nakata K, Cao F, Samukawa K, Fujita H, Sakanaka M: Intravenous infusion of ginsenoside Rb1 ameliorates compressive spinal cord injury through upregulation of Bcl-xL and VEGF. *International Journal of Neurology and Neurotherapy*. 2: 2-7, 2015

7). Hashiba M, Huq A, Tomino A, Hirakawa A, Hattori T, Miyabe H, Tsuda M, Takeyama N. Neutrophil extracellular traps in patients with sepsis. *J Surg Res*. 194:248-54, 2015

8). Takagi T, Yoshida T, Okada M, Hata R, Hato N, Gyo K, Hakuba N.: Intravenous administration of bone marrow mononuclear cells alleviates hearing loss after transient cochlear ischemia through paracrine effects. *Neuroreport*. 25: 807-813, 2014

9). Ogura H, Gando S, Saitoh D, Takeyama N, Kushimoto S, Fujishima S, Mayumi T, Araki T, Ikeda H, Kotani J, Miki Y, Shiraishi S, Suzuki K, Suzuki Y, Takuma K, Tsuruta R, Yamaguchi Y, Yamashita N, Aikawa N; Japanese Association for Acute Medicine Sepsis Registry (JAAMSR) Study Group. Epidemiology of severe sepsis in Japanese intensive care units: a

prospective multicenter study. *J Infect Chemother*. 20:157-62, 2014.

10). Kano H, Hirakawa A, Miyabe H, Hattori T, Mikamo H, Yoshida S, Takeyama N.: Successful treatment of septic shock due to New Delhi metallo-beta-lactamase -1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a patient transferred from India to Japan. *Acute Medicine & Surgery* 1: 181-185: 2014

11). Fujishima S, Gando S, Saitoh D, Mayumi T, Kushimoto S, Shiraishi S, Ogura H, Takuma K, Kotani J, Ikeda H, Yamashita N, Suzuki K, Tsuruta R, Takeyama N, Araki T, Suzuki Y, Miki Y, Yamaguchi Y, Aikawa N; Japanese Association for Acute Medicine Sepsis Registry (JAAM SR) Study Group. A multicenter, prospective evaluation of quality of care and mortality in Japan based on the Surviving Sepsis Campaign guidelines. *J Infect Chemother*. 20:115-20, 2014

〔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.fujita-hu.ac.jp/lecture/ana_tomy1/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秦 龍二 (Hata Ryuji)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：90258153

(2) 研究分担者

武山 直志 (Takeyama Naoshi)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：00155053