

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26501005

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来神経細胞移植による認知症回復期における遺伝子発現制御

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of the restoration of human APP transgenic mouse cognitive dysfunction after transplant of human iPS cell-derived neural cells

研究代表者

有光 なぎさ (Arimitsu, Nagisa)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：40408688

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)：神経細胞の新生を利用した中枢神経系の再生と再生医療の適用を検討した。hiPS細胞から分化誘導した神経細胞を認知症モデルマウスPDAPPマウスの海馬両側に移植し、移植マウスにおいて、移植細胞の定着が確認され、さらにネガティブコントロールに比べ、水迷路記憶の改善兆候が見られた。回復したマウス大脳皮質及び海馬において移植細胞はコリン作動性神経及びGABA作動性神経に分化し局在していることを見出した。移植細胞の遺伝子発現を調べた結果、神経細胞マーカーの発現上昇と分泌性因子(リーリン等)の発現増加が見られた。移植によるホスト神経(前駆)細胞に対しても何らかの作用を及ぼすことが予想される。

研究成果の概要(英文)：We examined the molecular mechanisms involved in the alleviation of cognitive dysfunction in transplanted Alzheimer's disease model mice. Neural cells derived from hiPS cells were transplanted to the hilus of the dentate gyrus. After transplant, mice showed improvement in cognitive function. Human choline acetyltransferase (ChAT)-positive cholinergic neurons and small number of vesicular GABA transporter (VGAT)-positive neurons were distributed throughout the cortex of the grafted mice. Human and mouse ChAT and GABA-positive neurons and their receptors of both human origin and mouse origin were significantly increased in the cortex and hippocampus. The receptor-positive neurons expressed phosphorylated Akt and c-fos in the cortex. And we also confirmed that paracrine factors such as Reelin expressed in the injected area. These suggest that the grafted and host neurons may form positive feedback loops via neurotransmitter secretion in both the cerebral cortex and hippocampus.

研究分野：分子生物学

キーワード：再生医療

### 1. 研究開始当初の背景

認知症は脳神経細胞の変性と組織萎縮（アルツハイマー型）や、脳血管障害などにより死滅することにより、発症し、後天的に知覚機能が失われ、物忘れといった記憶障害や行動・心理症状（徘徊、攻撃的言動、抑うつ、妄想）といった周辺症状をはじめとするいくつかの症状によって日常生活に支障を来す状態をいう。認知症では特に、記憶に関係している海馬の萎縮が早期から起こる。また、発症後の細胞消失の進行機構はまだ不明な点が多く、さらに中枢神経組織は有効な神経再生が生じ難いため、治療及び、発症後期に対する有効な治療法は乏しい。

近年、難治性神経疾患の新規治療法として再生医療が注目されている。実際に試験的に中絶胎児脳組織を用いた移植治療、パーキンソンモデルラット、アルツハイマーモデルマウスでの治療が試みられている。

これまでに、ヒト Induced Pluripotent Stem Cells (hiPS 細胞)から分化誘導した細胞を認知症モデルマウス PDAPP マウスの海馬両側に移植し、モリスの水迷路テストを用いて移植の効果判定し、誘導神経（前駆）細胞の移植と認知症の改善効果の評価を行った結果、移植マウスにおいて、移植した神経細胞の定着が確認され、さらにネガティブコントロールに比べ、水迷路記憶の改善兆候が見られたことから神経細胞の新生を利用した中枢神経系の再生のメカニズムの解明を検討した。

### 2. 研究の目的

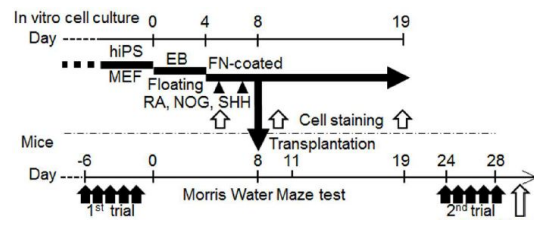
hiPS 細胞由来神経細胞移植マウスにおける移植細胞の認知症改善に与える影響について移植神経細胞の組織での定着、神経回路形成を介して神経再生するメカニズムに関わる因子を解析する事を目的とした

### 3. 研究の方法

(1)ヒト iPS 細胞誘導神経（前駆）細胞の性状解析と分化誘導因子同定

我々の扱う hiPS 細胞は RIKEN Cell Bank から既に購入している (cell name : 253G1, cell number : HPS0002)。培養方法は RIKEN Cell Bank の方法に従い、フィーダー細胞としてマウス繊維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast : MEF)を用いる。塩基性繊維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF)を添加することで未分化な状態を保持しつつ培養を行っている。hiPS 細胞を培養ディッシュから解離した後、bFGF を除いた培地に懸濁し、4 日間の浮遊培養によって胚様細胞塊 (embryoid body : EB)を作製する。bFGF の除去が分化への引き金となる。次に EB をフィブロネクチンでコートした培養ディッシュに播種する。24 時間後培地を分化培地に交換し、同時にレチノイン酸 (retinoic acid : RA)、ノジン (noggin : NOG)、ソニックヘッジホック (sonic hedgehock : SHH)を加える (1 次刺激)。48 時間培養後、

再度 RA、SHH、NOG を加える (2 次刺激)。24 時間後細胞を回収し、RNA を抽出する。RT 反応の後、PCR を行い神経分化関連遺伝子の mRNA の発現量を検討する。細胞の分化誘導及び移植のスケジュールについては以下参照。



分化誘導と移植後解析のスケジュール

細胞はトリプシン、コラゲナーゼではがした後にシングル化し、PBS に濃度  $1.0 \times 10^5 / \mu\text{l}$  懸濁して  $2 \mu\text{l}$  移植した。

(2) 分化誘導後の細胞染色及び遺伝子発現  
分化誘導した際のプレートに PFA 固定した後、各種神経マーカー抗体を用いて染色し、共焦点顕微鏡にて観察後陽性細胞数をカウントした。逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 全 RNA を RNeasy キット (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて細胞から単離した。相補的 DNA (cDNA) を、cDNA 逆転写キットを用いて合成した。全 RNA 抽出、cDNA 合成および PCR 増幅を Taqman probe を用いて既存の方法にて行った。

### (3) 神経細胞移植

PDAPP マウスは NIH PDAPP line109 を購入した。マウスの飼育維持は聖マリアンナ医科大学動物指針に従って行った。移植前にデキサメタゾン ( $2\text{mg} / \text{kg}$ ) を投与し、シクロスポリン ( $3\text{-}8\text{mg} / \text{kg}$ ) を毎日投与した。麻酔下にて bregma から両側  $2.4\text{mm}$  posterior,  $2.0\text{mm}$  lateral,  $1.25\text{mm}$  depth に移植した。

### (4) Morris water maze test

Morris water maze test は Chen et al. 2000 に従って行った。具体的には不透明な色の水で満たした  $1\text{m}$  プールにプラスチック製の大型プラットフォームを水中に配置し最大 90 秒間自由に泳がせ、プラットフォームへの到達時間を測定した。初日にはプラットフォームが水面上に見えるように配置し、またプールの周り四方に空間的な手がかりになるものを配置した状態にて訓練を行う。翌日から 4 日プラットフォームを見えなくして到達時間を測定し、最終日にはプラットフォームをなくし、プラットフォームの存在していた領域を横切る回数を計測した。動物の動きは Image J を元にしたソフトを用いて解析した。

### (5) 脳組織解析

マウスは麻酔後 4% パラホルムアルデヒドを用いて還流固定を行い、脳組織を取り出し厚

さ 30 $\mu$ m の冠状凍結切片を作成し、各神経マーカーに対する免疫組織化学染色を行った。

#### 4. 研究成果

hiPS 細胞からレチノイン酸 (RA)、ソニックヘッジホック (SHH)、ノジン (NOG) の 3 因子を用いて、神経細胞の分化誘導に成功した。分化誘導した細胞は移植時には神経細胞マーカーを発現しており、コリン作動性神経及びまた非常に少ない割合ではあったが VGAT 陽性細胞も分化誘導されていた(図 1)。

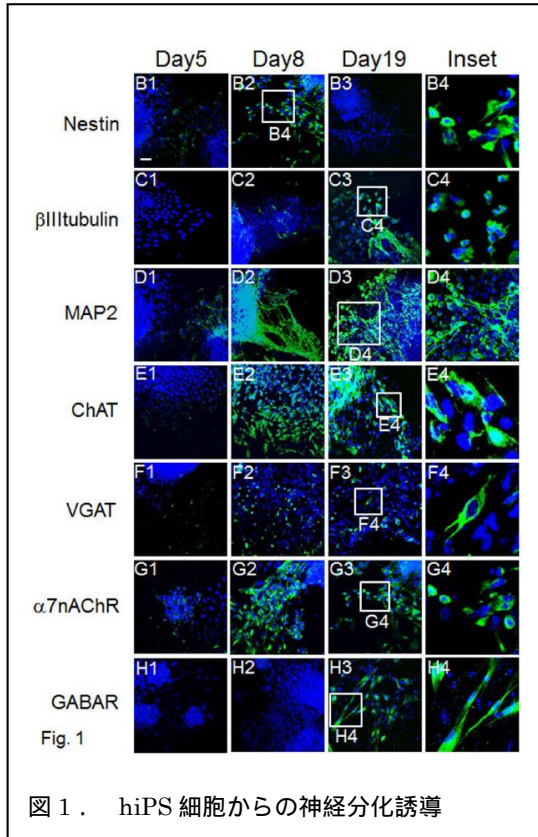


図 1. hiPS 細胞からの神経分化誘導

分化誘導した細胞を認知症モデルマウス PDAPP マウスの海馬両側に移植した。移植後、認知機能を確認した後に還流固定を行い、マウス脳切片に対して免疫染色を行って移植

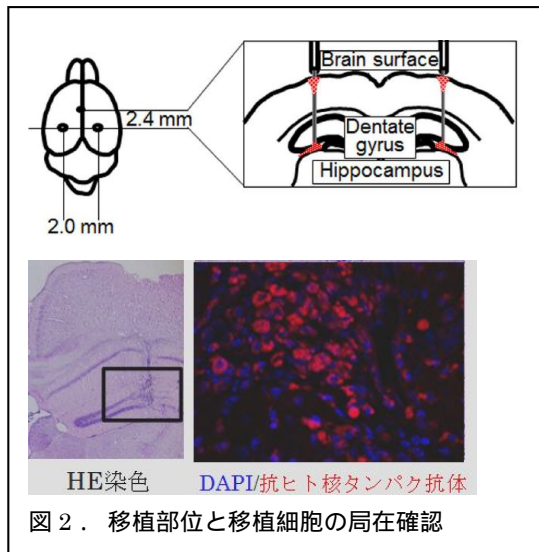


図 2. 移植部位と移植細胞の局在確認

細胞の局在を観察した(図 2)。

モリスの水迷路テストを用いて移植の効果を判定し、誘導神経(前駆)細胞の移植と認知症の改善効果の評価を行った結果、移植マウスにおいて、移植した神経細胞の定着が確認され、さらにネガティブコントロールに比べ、水迷路記憶の改善兆候が見られた(図 3)。

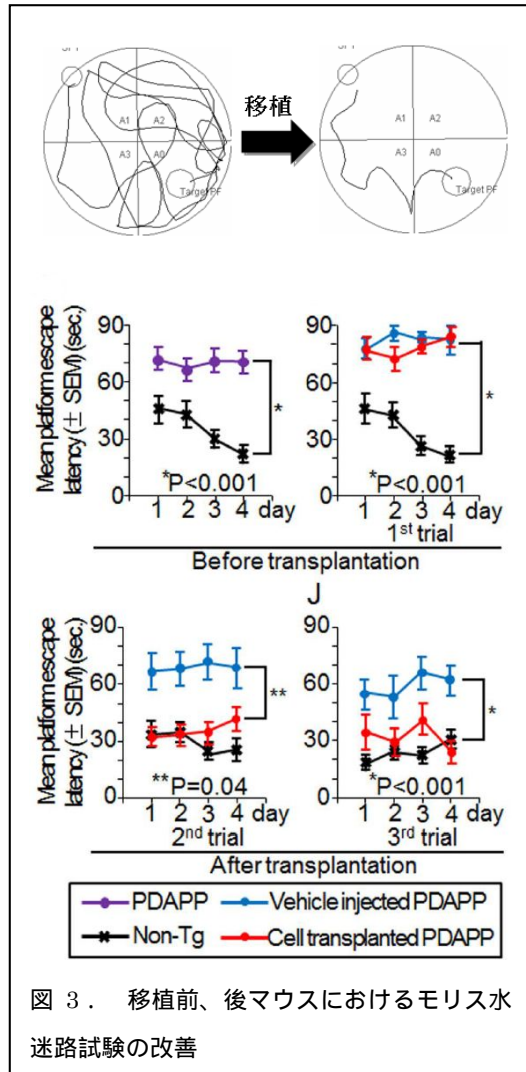


図 3. 移植前、後マウスにおけるモリス水迷路試験の改善

移植マウスにおいて各種マーカー抗体により染色を行った。移植神経からは軸索が伸長しており、移植神経間、移植神経-宿主神経間の神経回路形成が示唆された。

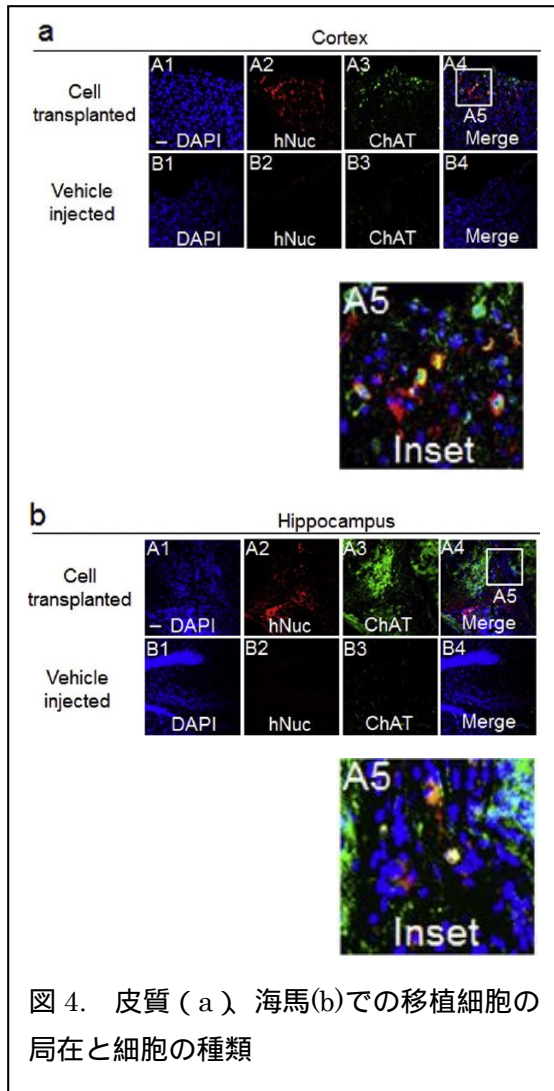
さらに、大脳皮質及び海馬においてコリン作動性神経と  $\alpha$ 7 ニコチン性アセチルコリン受容体陽性細胞及び GABA 作動性神経と GABA 受容体 (GABAR) 発現細胞に分化し局在していることを見出した(図 4)。

さらに、それぞれの局在に応じた細胞の種類をカウントした。その結果、Cortex に局在する ChAT は Vehicle injected mice ではほとんど存在しなかったのに対して、移植マウスでは  $27.1 \pm 5.1\%$

(Human origin =  $13.1 \pm 4.9\%$ , mouse origin =  $14.0 \pm 2.3\%$ )、海馬でも移植マウスにおいて



6.6 ± 1.7%  
 (Human origin = 1.6 ± 0.7%, mouse origin = 5.0 ± 1.1%)と上昇した。また、VGAT は逆に cortex では Vehicle injected mice において 1.2 ± 0.7% と移植マウスの 2.1 ± 2.1% (Human origin = 0.7 ± 0.7%, mouse origin = 1.4 ± 1.4%)とわずかな差であった。海馬において VGAT は Vehicle injected mice において 6.7 ± 3.2%、移植マウスにおいて 10.6 ± 3.0% (Human origin = 3.7 ± 1.1%, mouse origin = 6.9 ± 2.0%)となった。また、それぞれの神経伝達物質レセプターも発現が見られた。さらに alpha7nAChR 陽性細胞も有意に増加しており、移植によるホストに対する作用があることが示唆された。alpha7nAChR 及び GABAR の下流の Akt のリン酸化が観察されており、受容体が生理学的にも機能していることも確認した。また c-fos の発現も亢進しており、神経細胞として神経伝達もされていると考えている。



移植細胞の遺伝子発現を調べた結果、神経細胞マーカーの発現上昇とともに、神経発生期の遊走の関与が示唆される分泌性因子(リ

ーリン、SDF1 等) MCP1 の発現増加が見られた。さらに移植細胞周辺にリーリン受容体下流に位置する細胞内蛋白 Dab1 が発現し、リン酸化による Dab1 活性化が損傷脳移植細胞によって増加すること、ホストの alpha7nAChR 陽性細胞も有意に増加しており、移植によるホスト神経(前駆)細胞に対しても何らかの作用を及ぼしていることが示唆された。コリン作動性神経に加えて GABA 作動性神経の欠落やリーリン発現低下による認知症の報告も見られており、移植によるコリン細胞性神経と GABA 神経、リーリン量の補充による認知機能改善効果も考えられる。

## 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 10 件)

Arimitsu N, Shimizu J, Inuma M, Umehara T, Fujiwara N, Takai K, Wakisaka S, Hirotsu C, Suzuki T, Beppu M, Niki H, Suzuki N. Human iPS cell derived neural cell sheets exhibit mature neural and extendable scaffold functions and promote recovery in injured mouse spinal cords. *J Stem Cell Res Med.* 2016; 1:41-47. doi: 10.15761/JSCRM.1000106 査読あり

Suzuki N, Shimizu J, Fujiwara N and Arimitsu N. Cellular Transplantation as the Treatment of Alzheimer's Disease in Mouse Models. *J Alzheimers Dis Parkinsonism.* 2016; 6: 219. 査読あり

Shimizu J, Kubota T, Takada E, Takai K, Fujiwara N, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Bifidobacteria Abundance-Featured Gut Microbiota Compositional Change in Patients with Behcet's Disease. *PLoS One.* 2016; 11: e0153746. 査読あり

Shimizu J, Takai K, Takada E, Fujiwara N, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Possible association of proinflammatory cytokines including IL1β and TNFα with enhanced Th17 cell differentiation in patients with Behcet's disease. *Clin Rheumatol.* 2016; 35:1857-1863. 査読あり

Shiratsuch T, Misawa H, Saito A, Shimizu J, Inuma M, Fujiwara N, Takai K, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Beppu M, Suzuki N. Sonic Hedgehog Supplementation Rapidly induces Myogenesis in Human Induced Pluripotent

Stem Cells. *St. Marianna Med. J.* 2015; 6: 225-233. 査読あり

Fujiwara N, Shimizu J, Takai K, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Cellular and molecular mechanisms of the restoration of human APP transgenic mouse cognitive dysfunction after transplant of human iPS cell-derived neural cells. *Exp Neurol.* 2015; 271: 423-431. 査読あり

Iinuma M, Umehara T, Arimitsu N, Shimizu J, Misawa H, Takai K, Fujiwara N, Fujii A, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Hirotsu C, Beppu M, Suzuki N. Induction of neural cells with spinal motoneuron phenotype from human iPS cells and the transplantation to totally transected spinal cords in mice. *Inflamm Regen.* 2015; 35: 154-163. 査読あり

Suzuki N, Shimizu J, Hirotsu C, Takada E, Arimitsu N, Ueda Y, Fujiwara N, Suzuki T and Takai K. Generation of Retinal Progenitor Cell Sheets which Differentiate into Rhodopsin Positive Photoreceptors from Mouse iPS Cell Derived Retinal Progenitor Cell Clones. *Int J Ophthalmol Clin Res.* 2015; 2: 1. 査読あり

Misawa H, Saito A, Shimizu J, Iinuma M, Shiratsuchi T, Fujiwara N, Takai K, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Beppu M, Suzuki N. Pax7 Gene Induction Rapidly Regulates Myocyte Homeostasis in Human Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells. *St. Marianna Med. J.* 2014; 5: 59-67. 査読あり

Baba T, Kashiwagi Y, Arimitsu N, Kogure T, Edo A, Maruyama T, Nakao K, Nakanishi H, Kinoshita M, Frohman MA, Yamamoto A, Tani K. Phosphatidic acid (PA)-preferring phospholipase A1 regulates mitochondrial dynamics. *J Biol Chem.* 2014; 289: 11497-11511. 査読あり

〔学会発表〕(計 8件)

有光なぎさ, 廣津千恵子, 高井憲治, 藤原成芳, 岡田容子, 清水潤, 鈴木登. 幹細胞由来神経細胞移植による脳損傷マウスにおける神経再生. 第16回日本再生医療学会総会 仙台市(仙台国際センター) 2017.3.7-9

藤原成芳, 岡田容子, 高井憲治, 廣津千

恵子, 有光なぎさ, 高田えりか, 清水潤, 鈴木登. ヒト iPS 由来神経細胞移植による認知機能改善と改善メカニズムについての検討 第16回日本再生医療学会総会 仙台市(仙台国際センター) 2017.3.7-9

有光なぎさ, 廣津千恵子, 高井憲治, 藤原成芳, 清水潤, 鈴木登. 脳損傷マウスに対する幹細胞由来神経細胞移植による神経再生. 第39回日本分子生物学会 横浜市(パシフィコ横浜) 2016.12.2.

Fujiwara Naruyoshi, Kenji Takai, Chieko Hirotsu, Erika Takada, Nagisa Arimitsu, Jun Shimizu and Noboru Suzuki. RESTORATION OF HUMAN APP TRANSGENIC MOUSE COGNITIVE DYSFUNCTION AFTER TRANSPLANT OF HUMAN IPS CELL-DERIVED NEURAL STEM/PRECURSOR CELLS. International society for stem cell research 12th annual meeting CALIFORNIA USA 22-25 JUNE 2016.

Naruyoshi Fujiwara, Kenji Takai, Erika Takada, Chieko Hirotsu, Nagisa Arimitsu, Jun Shimizu and Noboru Suzuki. Human iPS derived neural stem/precursor improved spatial memory learning of dementia model mice. International Society for Stem Cell Research 2015 Annual Meeting Stockholm, Sweden 2015.6.24-27. (24)

藤原成芳, 鈴木千佳, 高井憲治, 廣津千恵子, 有光なぎさ, 高田えりか, 清水潤, 鈴木登. ヒト iPS 由来神経細胞移植による認知機能改善と改善メカニズムについての検討. 第15回日本再生医療学会総会 大阪市(大阪国際会議場) 2016.3.17-19.

藤原成芳, 高井憲治, 鈴木千佳, 廣津千恵子, 高田えりか, 有光なぎさ, 白土崇輝, 清水潤, 鈴木登. ヒト iPS 細胞から誘導した神経細胞移植による認知機能の改善とそのメカニズムについての検討. 第111回日本精神神経学会学術総会 大阪市(大阪国際会議場) 2015.6.4-6.

藤原成芳, 高井憲治, 鈴木千佳, 廣津千恵子, 高田えりか, 有光なぎさ, 白土崇輝, 清水潤, 鈴木登. ヒト iPS 由来神経細胞移植による空間記憶能の改善と改善メカニズムについての検討. 第14回日本再生医療学会総会 横浜市(パシフィコ横浜) 2015.3.19-21.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

有光 なぎさ (Arimitsu, Nagisa)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40408688

### (2) 研究分担者

藤原 成芳 (Fujiwara, Naruyoshi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号: 50365425